



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**SISTEMA DE APAREAMIENTO DE LA TORTUGA GOLFINA,
Lepidochelys olivacea, QUE ANIDA EN LA COSTA SUR DE
SINALOA, DETERMINADO POR MICROSATÉLITES
NUCLEARES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

B.A. ANDREA GUADALUPE COLIO ALATORRE

TUTOR:

DR. FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA,
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. FAUSTO ROBERTO MÉNDEZ DE LA CRUZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

DR. PÍNDARO DÍAZ JAIMES
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

DR. JOSÉ ANTONIO CRUZ BARRAZA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA,
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN, UNAM

DRA. SILVIA ALEJANDRA GARCÍA GASCA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.,
UNIDAD MAZATLÁN

CD. MX., DICIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**SISTEMA DE APAREAMIENTO DE LA TORTUGA GOLFINA,
Lepidochelys olivacea, QUE ANIDA EN LA COSTA SUR DE
SINALOA, DETERMINADO POR MICROSATÉLITES
NUCLEARES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

B.A. ANDREA GUADALUPE COLIO ALATORRE

TUTOR:

DR. FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA,
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. FAUSTO ROBERTO MÉNDEZ DE LA CRUZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. PÍNDARO DÍAZ JAIMES
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

DR. JOSÉ ANTONIO CRUZ BARRAZA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA,
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN, UNAM

DRA. SILVIA ALEJANDRA GARCÍA GASCA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.,
UNIDAD MAZATLÁN

MÉXICO, CD. MX., DICIEMBRE 2018

Agradecimientos

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por permitirme realizar esta tesis como estudiante de maestría y por la formación recibida durante los últimos dos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante los cuatro semestres de maestría.

A mi director de tesis el Dr. Federico Alberto Abreu Grobois por darme la oportunidad y la confianza para formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo incondicional durante los muestreos, trabajo de laboratorio, análisis de datos y proceso de escritura de esta tesis. Porque sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A los miembros de mi comité tutorial: la Dr. Silvia Alejandra García Gasca, el Dr. José Antonio Cruz Barraza, el Dr. Píndaro Díaz Jaimes y el Dr. Fausto Roberto Méndez de la Cruz, por sus valiosos comentarios, observaciones y aportaciones a este proyecto, así como por el tiempo dedicado para la revisión de mi manuscrito de tesis.

A la Dra. Silvia Alejandra García Gasca y a la Cand. Dra. Anelisse Bárcenas Ibarra por la donación de las muestras de El Verde Camacho. Porque el gran esfuerzo realizado por Anelisse para la colecta de dichas muestras, al igual que las experiencias compartidas sobre su trabajo de campo y laboratorio fueron de suma importancia para esta investigación.

A los investigadores que me brindaron su ayuda a lo largo de este proyecto: al Dr. Raúl Llera Herrera por su apoyo en laboratorio para la optimización de nuestro protocolo de extracción de ADN. A la Dra. Nancy Saavedra Sotelo por el tiempo para instruirme en el uso de GeneMarker. Al Dr. Omar Chassin Noria por la asesoría brindada sobre los softwares y metodologías para la detección de paternidad múltiple.

A la M.C. María de los Ángeles Vega Herrera, por el entrenamiento recibido para el procesamiento del material biológico. Por haberme enseñado las técnicas de laboratorio que ahora conozco y por supuesto por su amistad.

A la M.C. Raquel Briseño Dueñas y a todo el equipo de trabajo del campamento FONATUR-SINALOA por recibirnos siempre con las puertas abiertas.

A mis compañeras de laboratorio Yazmín Segura, Julieta Álvarez y Miriam Müller por su amistad, consejos y experiencias compartidas. Especialmente

quisiera agradecer a Yazmín Segura por su gran apoyo para la colecta de muestras sanguíneas de tortugas golfinas en playa Las Cabras, así mismo por la atención y cuidados brindados a los nidos y crías.

A mis compañeras y amigas del posgrado Lilí e Ivonne por su amistad y por las vivencias compartidas en tan poco tiempo.

A las personas que estuvieron conmigo a lo largo de esta experiencia. Porque tuve la enorme fortuna de contar con alguien con quien compartir día a día lo vivido y aprendido.

Quisiera agradecer especialmente a la Dra. Alejandra, porque gracias a ella hace cinco años durante mi estancia en su laboratorio pude adentrarme al mundo de las tortugas marinas.

Finalmente quisiera agradecer a mis padres porque sin su apoyo y confianza incondicionales no hubiese podido lograr esta meta. Porque de la manera más amorosa y respetuosa me enseñaron que el estudio es el mejor camino para la superación.

Este logro no puedo considerarlo solamente mío porque cada uno de ustedes colaboró en él.

Muchísimas gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1. Tortugas marinas: aspectos generales de su reproducción	1
1.2. Tortuga golfina <i>Lepidochelys olivacea</i>	4
1.2.1. Morfología.....	4
1.2.2. Alimentación	5
1.2.3. Reproducción	5
1.2.4. Distribución.....	6
1.3. Anidación de tortugas marinas en el sur de Sinaloa, México	6
1.4. Microsatélites	7
2. Antecedentes	8
3. Justificación	10
4. Preguntas de investigación	13
5. Objetivos.....	13
6. Área de estudio.....	14
6.1. Playa El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa	15
6.2. Playa Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa	15
7. Materiales y Métodos	16
7.1. Infraestructura y Recursos Materiales.....	16
7.2. Trabajo de campo	16
7.2.1. Muestreo de hembras anidantes.....	16
7.2.2. Muestreo de crías	19
7.3. Extracción de ADN.....	21
7.4. Análisis del ADN con microsatélites nucleares.....	23
7.4.1. Amplificación de microsatélites para la colonia de El Verde.....	24
7.4.2. Amplificación de microsatélites para la colonia de Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.....	28
7.5. Genotipificación	33
7.6. Análisis estadístico	34
7.6.1. Cálculo de $P_{(ID)}$ y Probabilidad de exclusión.....	34
7.6.2. Análisis de paternidad.....	35
7.6.3. Proporción de crías engendradas por padre/nido	37

7.6.4. Análisis de poliginia	37
7.6.5. Calculo de la proporción sexual operativa.....	38
7.7. Modelos de correlación: colonia de anidación de Las Cabras	39
7.8. Evaluaciones del efecto de tamaño de muestreo por bootstrap	40
8. Resultados	41
8.1. Datos de Campo: Colonia de anidación de Las Cabras	41
8.2. Cantidad y calidad de ADN: Muestras de Las Cabras.....	42
8.3. Genotipificación de madres y crías	45
8.3.1. El Verde.....	45
8.3.2. Las Cabras	46
8.4. Prueba de errores de genotipificación.....	47
8.5. Probabilidad de identidad entre genotipos $P_{(ID)}$	50
8.6. Probabilidad de exclusión	51
8.7. Calidad de amplificación de primers OR vs Cc	52
8.8. Análisis de Paternidad por nidada.....	54
8.9. Reconstrucción de genotipos paternos	57
8.10. Proporción de crías engendradas por padre/nido.....	57
8.11. Análisis de poliginia	60
8.12. Proporción sexual operativa.....	62
8.13. Correlación entre variables genéticas y fenotipo: colonia de anidación de Las Cabras.....	63
8.14. Efecto del tamaño de muestra sobre número de padres detectados.....	65
8.15. Análisis comparativo	67
9. Discusión	69
9.1. Paternidad múltiple	69
9.2. Contribución paterna por nido.....	74
9.3. Poliginia	75
9.4. Proporción sexual operativa.....	78
9.5. Relación entre rasgos de las hembras y paternidad múltiple	79
10. Conclusiones	81
11. Referencias.....	82
12. Anexos.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de los sitios de muestreo: El Verde Camacho, Mazatlán, Sin. y Las Cabras, Escuinapa, Sin.....	14
Figura 2. Procedimiento para el muestreo de hembras anidantes. A) Marcado con placas metálicas en aleta delantera izquierda. B) Registro de medidas morfométricas. C) Extracción sanguínea del seno cervical dorsal.....	17
Figura 3. Número de nidadas muestreadas por hembra para la colonia de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> , de El Verde.	19
Figura 4. Muestreo de neonatos vivos. A) Toma de la porción de carapacho con navaja de bisturí. B) Vista lateral de la zona de corte (incisión triangular del escudo marginal asociado al tercer escudo lateral).	20
Figura 5. Diagrama de marcado con fluorescencia de microsátélites. (Adaptada de Culley et al., 2013: Fig. 1).	24
Figura 6. Reacción "simplex" para el análisis de 4 loci.....	25
Figura 7. Reacción "Multiplex" para el análisis de 4 loci.....	29
Figura 8. Electroforesis en agarosa de ADN extraído de sangre de madres de Las Cabras, Escuinapa, Sin.....	43
Figura 9. Electroforesis en agarosa de ADN extraído de carapacho de crías de Las Cabras, Escuinapa, Sin.....	43
Figura 10. Bandas de ADN degradado extraído de tejidos putrefactos de crías pertenecientes a las nidadas 878, 879, 938 y 940 de la colonia de anidación de La Cabras, Escuinapa, Sinaloa.	44
Figura 11. Prevalencia de bandas de ADN degradado para muestras de tejidos putrefactos de las muestras de Las Cabras tras la re-extracción de ADN con el QIAamp® DNA Micro Kit (QIAGEN).	45
Figura 12. Comparación de frecuencias de homocigotos observadas y esperadas según MicroChecker para los loci OR11 y OR2 de la colonia de anidación de El Verde.....	48
Figura 13. Comparación de frecuencias de homocigotos observadas y esperadas según MicroChecker para los loci OR4, OR11, CcP7D04 y Cc1G02 de la colonia de anidación de Las Cabras.	49
Figura 14. Cromatogramas de individuos de la colonia de anidación de Las Cabras, Escuinapa, para los loci OR4 y OR11.	53
Figura 15. Cromatogramas de individuos de la colonia de anidación de Las Cabras, Escuinapa, para los loci CcP7D04 y Cc1G02.	53
Figura 16. Variación en el resultado del número de padres para nidadas de la colonia de El Verde con el uso de GERUD Vs COLONY Vs DADSHARE.....	54
Figura 17. Número de padres por nidada en la colonia de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> de El Verde.	55
Figura 18. Variación en el resultado del número de padres para nidadas de la colonia de Las Cabras con el uso de GERUD Vs COLONY Vs DADSHARE.	56
Figura 19. Número de padres por nidada en la colonia de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> de Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.	56
Figura 20. Histograma de frecuencias de la proporción de crías engendradas por padre/nido para la colonia de El Verde.	58

Figura 21. Histograma de frecuencias de la proporción de crías engendradas por padre/nido para la colonia de Las Cabras.....	58
Figura 22. Diversidad del N de padres/nido para la colonia de anidación de El Verde.....	59
Figura 23. Diversidad del N de padres/nido para la colonia de anidación de Las Cabras.....	59
Figura 24. Resultados de la poliginia para la colonia de El verde. Análisis desde el primer enfoque: hembras fecundadas/macho. Las bandas de distintos colores muestran la variación de los resultados con el uso de COLONY Vs DADSHARE.....	60
Figura 25. Resultados de la poliginia para la colonia de El verde. Análisis desde el segundo enfoque: nidadas engendradas/macho. Las bandas de distintos colores muestran la variación de los resultados con el uso de COLONY Vs DADSHARE.....	61
Figura 26. Resultados de la poliginia para la colonia de Las Cabras. Las bandas de distintos colores muestran la variación de los resultados con el uso de COLONY Vs DADSHARE, mientras que la variación de las tonalidades refleja la variación de los resultados al analizarse 2 y 4 loci.....	62
Figura 27. Matriz de correlación de variables biométricas (LCC, ACC, IGC, peso, # huevos, fecha de puesta) vs heterocigosidad individual (PHt, Hs_obs, Hs_exp, IR, HL) vs variables de paternidad múltiple (No. de machos/nidada, diversidad del N de padres/nido (DNM))	64
Figura 28. Relación entre el ancho curvo del caparazón Vs el número de machos con el que se dedujo que se apareo cada una de las hembras evaluadas para la colonia de anidación de Las Cabras.	65
Figura 29. Resultados de la simulación con el método Bootsrap. Simulación basada en el muestreo de 50, 30, 20, 10, 5 y 3 individuos de una nidada de 100 crías engendradas por 8 padres distintos.	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Panel de estudio 1 para el análisis de paternidad múltiple de <i>Lepidochelys olivacea</i> , en El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa.	26
Tabla 2. Panel de estudio 2 para el análisis de paternidad múltiple de <i>Lepidochelys olivacea</i> , en El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa.	27
Tabla 3. Programa de termociclador utilizado para la amplificación de los microsatélites de la serie OR de Aggarwal et al. (2004), para la colonia de anidación de El Verde.	28
Tabla 4. Panel de estudio para el análisis de paternidad múltiple de <i>Lepidochelys olivacea</i> , en Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.	31
Tabla 5. Programa de termociclador utilizado para la amplificación de los microsatélites de la serie OR de Aggarwal et al. (2004), para la colonia de anidación de Las Cabras.	32
Tabla 6. Programa de termociclador utilizado para la amplificación de los microsatélites de la serie Cc de Shamblin et al. (2008), para la colonia de anidación de Las Cabras.	33
Tabla 7. Variación de los parámetros de configuración de las corridas realizadas en COLONY 2.0.6.4.	36
Tabla 8. Matriz de datos de las hembras de la colonia de anidación de Las Cabras para el análisis de correlación con la librería Corrplot.	40
Tabla 9. Biometría promedio de las madres muestreadas para la colonia de anidación de Las Cabras, Escuinapa, Sin. (Información del trabajo de tesis doctoral de la Cand. Dra. Yazmín Segura García).	41
Tabla 10. Datos generales de las nidadas muestreadas para la colonia de anidación de Las Cabras, Escuinapa, Sin. (Información del trabajo de tesis doctoral de la Cand. Dra. Yazmín Segura García).	41
Tabla 11. Número de alelos encontrados por locus para la colonia de anidación de El Verde.	46
Tabla 12. Número de alelos encontrados por locus para la colonia de anidación de Las Cabras.	47
Tabla 13. Resumen de resultados de MicroChecker para los cinco loci empleado para las muestras de El Verde.	48
Tabla 14. Resumen de resultados de MicroChecker para los cuatro loci empleado para las muestras de Las Cabras.	49
Tabla 15. Valores de Probabilidad de identidad entre genotipos $P_{(ID)}$ por locus y para el conjunto de los 5 loci ($P_{(ID)}$ TOTAL) para la colonia de anidación de El Verde.	50
Tabla 16. Valores de Probabilidad de identidad entre genotipos $P_{(ID)}$ por locus y para el conjunto de los 4 loci ($P_{(ID)}$ TOTAL) para la colonia de anidación de Las Cabras.	50
Tabla 17. Valores de Probabilidad de exclusión por locus y con el conjunto de loci para la colonia de anidación de El Verde.	51
Tabla 18. Valores de Probabilidad de exclusión por locus y con el conjunto de loci para la colonia de anidación de Las Cabras.	52
Tabla 19. Proporción sexual operativa para las colonias de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> de El Verde y Las Cabras.	63

Tabla 20. Resultados de la prueba de significancia de la pendiente de regresión para los modelos de correlación establecidos para las variables de la colonia de anidación de Las Cabras. Para realizar esta prueba se utilizó un valor de alfa = 0.05.	64
Tabla 21. Análisis comparativo de estudios del sistema de apareamiento de diferentes especies de tortugas marinas en distintas regiones.	68
Tabla 22. Genotipos maternos de la colonia de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> de El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa.	88
Tabla 23. Genotipos de crías de la colonia de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> de El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa.	89
Tabla 24. Genotipos maternos de la colonia de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> de Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.	94
Tabla 25. Genotipos de crías de la colonia de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> de Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.	95
Tabla 26. Número de padres por nidada, de acuerdo a la estimación de 3 programas de análisis de paternidad. Información para la colonia de anidación de tortuga golfina, <i>Lepidochelys olivacea</i> , de El Verde Camacho, Mazatlán, Sin.	100
Tabla 27. Número de padres por nidada, de acuerdo a la estimación de 3 programas de análisis de paternidad. Información para la colonia de anidación de tortuga golfina, <i>Lepidochelys olivacea</i> , de Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.	102
Tabla 28. Genotipos paternos de la colonia de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> de El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa.	102
Tabla 29. Genotipos paternos de la colonia de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> de Las Cabras con el análisis del Escenario 1 (2 loci).	104
Tabla 30. Genotipos paternos de la colonia de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> de Las Cabras con el análisis del Escenario 2 (4 loci).	105

Resumen

Está bien documentado que las hembras de las siete especies de tortugas marinas son poliándricas y que en la fertilización de las nidadas participan varios machos (paternidad múltiple, PM) con frecuencias que varían entre poblaciones y especies. La frecuencia de PM es influenciada por dos tipos de procesos: 1) precopulatorios como la proporción sexual operativa y 2) postcopulatorios como la competencia entre espermias de los distintos machos. En este estudio se analizó el sistema de apareamiento dos colonias de tortuga golfina que anidan en el sur de Sinaloa, en las playas de El Verde Camacho, Mazatlán (EVC) y Las Cabras, Escuinapa (LC), mediante la estimación de la incidencia de paternidad múltiple utilizando marcadores microsatélites nucleares. Se encontró la presencia de múltiples padres en el 46% y 100% de las nidadas, de EVC y LC, respectivamente. En contraste con la mayoría de los resultados previos, en nidadas con PM no se detectó la presencia de un macho dominante y se detectaron varios machos que fertilizaron más de una nidada cada uno. La reconstrucción de los genotipos paternos adicionalmente permitió estimar la proporción sexual operativa, de 1.5 machos por hembra en EVC y 4.2 machos por hembra en LC. Estos resultados contrastan con la proporción sexual primaria fuertemente sesgada hacia las hembras en la etapa de cría (típicamente >80% hembras). Simulaciones de remuestreo con diferentes tamaños de muestra indican que las diferencias en estimaciones obtenidas en las dos playas se puede explicar por los tamaños de muestra (para EVC se analizaron 52 nidadas y un promedio de cuatro crías por nido, para LC se 13 nidadas y un promedio de 16 crías por nido) por lo que si bien los valores para el primero deben ser considerados como mínimos mientras que los segundos serían confiables. Los valores de PM, número promedio de machos y la ausencia de padres dominantes en nidadas con PM ha sido reportado en muy pocos casos de tortugas marinas y sugiere que en estas colonias el comportamiento copulatorio de las hembras involucra una sucesión rápida entre la cópula con un macho y otro, y el de los machos una ausencia de defensa de su pareja para evitar la cópula de otros machos. El marcado contraste entre la proporción sexual primaria y la que en este estudio se estimó para la reproducción, es compatible con la existencia de contrastantes comportamientos migratorios de los adultos, involucrando a los machos con residencia cercana a las playas de anidación y a través de temporadas de reproducción, mientras que las hembras realizarían extensas migraciones de alimentación y con períodos variables y multi-anales de remigración.

Palabras clave: sistema de apareamiento, paternidad múltiple, proporción sexual operativa, tortugas marinas, *Lepidochelys olivacea*.

Abstract

It is well documented that the females of the seven species of marine turtles are polyandrous and that multiple males are typically involved in the fertilization of each clutch (multiple paternity, PM) but with variation in the PM frequency between populations and species. The frequency of PM is influenced by two types of processes: 1) pre-copulatory such as the operational sex ratio and 2) post-copulatory such as the competition between sperm from different sires. In this study we analyzed the mating system of two olive ridley turtle colonies that nest in southern Sinaloa at El Verde Camacho, Mazatlán (EVC) and Las Cabras, Escuinapa (LC), by estimating the incidence of multiple paternity using nuclear microsatellite markers. The presence of multiple sires was found in 46% and 100% of the nests from EVC and LC, respectively. In contrast to most of the previous studies, in progeny from PM nests, the presence of a dominant male was not detected and several males were detected fertilizing more than one clutch each. The reconstruction of the paternal genotypes additionally allowed estimates for the operational sex ratio for these rookeries, of 1.5 males per female in EVC and 4.2 males per female in LC. These estimates contrast with the primary sex ratio strongly biased towards the females in the hatchling stage (typically > 80% females). Resampling simulations using our data with different sample sizes demonstrate that the difference in estimates obtained at the two rookeries can be explained by the contrasting sample sizes (for EVC, 52 nests were analyzed and an average of four pups per nest, for LC there were 13 nests and a average of 16 pups per nest) so although the values for the first can be considered minimum estimates, the latter can be considered reliable. Our PM values, number of males and the absence of dominant parents in clutches with PM which have been reported in very few cases of sea turtles suggest that, at least in sampled rookeries, the copulatory behavior of the females involves a rapid succession between the copula with successive males, and an absence of mate defense by the males. The very large skew in favor of males in the operational sex ratio obtained could be explained by the existence of contrasting migratory behaviors between the two sexes; while all males could remain resident near nesting beaches across breeding seasons, females would partake in extensive foraging migrations of food with variable, multi-annual remigratory cycles.

Keywords: mating system, multiple paternity, operative sex ratio, sea turtles, *Lepidochelys olivacea*.

1. Introducción

1.1. Tortugas marinas: aspectos generales de su reproducción

Las tortugas marinas forman parte del grupo más antiguo de reptiles; de acuerdo con registros fósiles aparecieron en la Tierra hace 200 millones años aproximadamente, durante el periodo Jurásico (Márquez, 2002). Actualmente poseen el rango más amplio de distribución de todos los reptiles, encontrándose en aguas tropicales o subtropicales costeras, templadas y subárticas de todo el mundo (Pritchard, 2003). A la fecha se reconocen siete especies vivas agrupadas en dos familias: Dermochelyidae, con una sola especie, la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) y Cheloniidae con seis especies, tortuga golfinia (*Lepidochelys olivacea*), tortuga boba o caguama (*Caretta caretta*), tortuga verde (*Chelonia mydas*) con su subespecie la tortuga prieta (*Chelonia mydas agassizii*), tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), tortuga lora (*Lepidochelys kempi*) y la tortuga plana (*Natator depressus*), esta última especie endémica de Australia.

Al igual que el resto de los reptiles, las tortugas marinas son animales vertebrados con respiración pulmonar, poiquilotermos o de “sangre fría”. Son ovíparas y el tipo de huevos que producen se denomina amniótico debido a que poseen varias capas embrionarias llenas de líquido amniótico de viscosidades variables así como una alta cantidad de vitelo, lo que le permite al embrión alcanzar un desarrollo más completo en un ambiente más estable; por su parte, el cascarón se constituye por una resistente membrana calcificada de apariencia apergaminada, lo que les brinda una mayor protección contra daños físicos como la deshidratación (Márquez, 2002). Son organismos heterosexuales; el dimorfismo se define claramente durante la edad adulta a través de caracteres sexuales secundarios presentes en los machos, tales como la cola que sobresale del límite inferior del carapacho (en algunos casos alcanza a sobrepasar ligeramente el borde de las aletas posteriores) y uñas más largas y arqueadas en comparación con las de las hembras (Márquez, 1976), que durante la cópula sirven a los machos para sujetar con firmeza a su pareja.

Las tortugas marinas son organismos longevos y de maduración sexual tardía, puesto que un individuo puede alcanzar entre los 20 y 40 años antes de madurar sexualmente (Frazier, 1999). Se piensa que en sus primeros años de vida son solitarias, pero de juveniles y adultas se congregan en los sitios de forrajeo (alimentación), apareamiento y anidación. La cópula ocurre a lo largo de los corredores migratorios, en sitios de cortejo o de apareamiento y en las inmediaciones de las playas de anidación. Durante la época de reproducción, se puede encontrar tanto hembras como machos en áreas mar adentro frente de la playa de anidación, en

áreas a las que también se les refiere como “hábitats interanidatorios” (Eckert *et al.*, 1999).

Durante el cortejo, una vez que la hembra ha aceptado al macho dominante, del cual recibe mordidas en el cuello y extremidades anteriores, ésta toma una postura horizontal y pasiva, entretanto, el macho se coloca por encima y la retiene clavándole las uñas de sus aletas anteriores, mientras se auxilia con las aletas posteriores de la hembra; una vez que se encuentran en esta posición da inicio el apareamiento. La fecundación es interna; los machos poseen un hemipene, un órgano que presenta un surco medio longitudinal que durante la cópula se convierte en un tubo que dirige el esperma hacia el fondo de la cloaca de la hembra (Márquez, 2002). Aunque la pareja puede permanecer en la posición de la cópula durante horas, arrastrada por la corriente, la transferencia de esperma puede no requerir el lapso completo. Las parejas se ven con mayor frecuencia en la superficie, pero el apareamiento puede tener lugar en cualquier punto de la columna de agua (Márquez, 1976; Lutz y Musick, 1997). Por otra parte, cuando una hembra no tiene interés en el apareamiento, toma un comportamiento más activo y se torna agresiva frente a los machos, de esta manera evita la cópula y se aleja del sitio.

En el proceso cortejo-apareamiento tanto hembras como machos resultan con heridas que pueden tardar semanas en sanar; por un lado las hembras sufren desgarres en la piel de la cabeza, cuello y aletas delanteras, así como rasguños en el carapacho, provocados por las largas uñas de los machos quienes resultan con escoriaciones en los escudos del plastrón debido al roce con el carapacho de la hembra; no obstante, las heridas más graves en los machos no son las provocadas por este roce, ya que una vez que un macho dominante ha montado a una hembra, éste es atacado por otros machos cortejantes, los cuales muerden con fuerza principalmente los bordes posteriores de sus aletas y la parte dorsal de la cola. Estas mordidas pueden desmontar o no al macho que lleva delantera sobre la cópula, sin embargo, reducen su aptitud para intentar aparearse con otras hembras debido al daño severo causado en sus extremidades (Lutz y Musick, 1997). Cuando las hembras son observadas durante la anidación, el progreso de cicatrización de sus heridas puede brindar información acerca de la temporada de apareamiento de la colonia de reproducción, así como del grado de agresividad de sus miembros.

Luego de aparearse, los machos regresan a las zonas de forrajeo y las hembras migran hacia las playas de anidación, generalmente al mismo sitio en donde nacieron (Spotila, *et al.*, 1997), de esta manera únicamente las hembras emergen a la playa para la construcción de sus nidos. Las tortugas marinas típicamente ovopositan más de una vez por temporada y la mayoría no lo hace en años consecutivos. Después de

ovopositar, las hembras retornan a las áreas de forrajeo para el siguiente periodo reproductivo (Palacios, 2012).

El sexo de las tortugas marinas se determina por la temperatura a la que el embrión es incubado. De este modo, las temperaturas más frías, con rangos de 26-28°C (temperatura promotora de macho, MPT por sus siglas en inglés) favorecen la producción de un mayor número de machos, y las temperaturas más cálidas, con rangos de 32-33°C (temperatura promotora de hembra, FPT por sus siglas en inglés) propician un mayor número de hembras. Para cada especie hay una temperatura pivote (29°C aproximadamente) en la que cada embrión tiene la misma probabilidad de ser macho o hembra. Se sabe que la temperatura influye en la determinación de sexo durante el segundo tercio de la incubación, lo que se conoce como período termosensible (PST) (Pieau, 1996; Wibbels, 2003). En estas condiciones, la proporción de sexos de una población de tortugas marinas sólo sería 1:1 si las hembras distribuyeran los nidos homogéneamente dentro de la totalidad del rango térmico donde la incubación es viable. Sin embargo, la mayor parte de las poblaciones de tortugas marinas presentan una proporción de sexos muy sesgada a favor de las hembras, encontrándose proporciones sexuales en neonatos de hasta 5 hembras por cada macho. Esta desproporción está asociada a la elección del sitio para anidar de las hembras grávidas, en la que influyen dos conductas características: 1) Filopatría, es decir, el arraigo a la playa donde nacieron; hecho que implica que las condiciones medio ambientales de la playa donde eclosionaron pudieron haber cambiado drásticamente durante los años transcurridos hasta volverse sexualmente activas y 2) Preferencia de playas cálidas sobre playas frías, puesto a que a nivel mundial en las playas cálidas se registra un número mayor de hembras que emergen para anidar. No obstante, en estudios de proporción sexual operativa, es decir, de adultos sexualmente activos en la reproducción, se ha encontrado una relación próxima de 1.5 machos por hembra, es decir, muy diferente de la proporción de sexos fuertemente sesgada a las hembras observada entre los neonatos. La explicación a esta paradoja no se halla en una mayor mortalidad de las hembras durante la fase juvenil, sino en la propia biología reproductiva y en el sistema de apareamiento de las tortugas marinas.

Está bien documentado que las hembras de las siete especies de tortugas marinas son poliándricas, es decir, suelen aparearse con varios machos (FitzSimmons, 1998; Zbinden *et al.*, 2007; Mudsuk *et al.*, 2004; Moore y Ball, 2002), probablemente para reducir el acoso por parte de otros machos (Joblonski y Vepsalainen, 1995; Kempeaners *et al.*, 1992), asegurar la fertilización en caso de que algún macho posea espermatozoides de baja calidad (Wagner 1992), o bien para incrementar la diversidad genética de la descendencia en caso de que más de un macho fertilice

los huevos (Wesneat *et al.*, 1984). Por otro lado, las hembras son capaces de almacenar esperma en su oviducto, al menos en el corto plazo, es decir, lo largo de una temporada de anidación, así como de utilizar esperma almacenado de temporadas anteriores (Pearse *et al.*, 2002), lo que se ha sugerido representa un beneficio para las hembras al tener disponible el semen de distintos machos, independientemente del número de cópulas durante el período de apareamiento. Estas peculiaridades pueden contribuir a la presencia de más de un padre entre las crías de una misma nidada, fenómeno conocido como paternidad múltiple. Se habla de paternidad múltiple cuando los huevos de un mismo nido han sido fertilizados por distintos machos.

La frecuencia de paternidad múltiple es influenciada por dos tipos de procesos; 1) Procesos precopulatorios como la proporción sexual operacional y 2) Procesos postcopulatorios que incluyen almacén de semen, elección críptica, así como la competencia espermática (Palacios 2012), y ésta varía según las especies y entre las poblaciones de la misma especie, siendo el número más común de dos padres (Pearse y Avise, 2001). En el caso de las tortugas golfinas, *Lepidochelys olivacea*, Jensen *et al.* (2006) sugieren que la paternidad múltiple depende en gran medida de los patrones reproductivos, con tasas mucho más altas en anidaciones masivas que en anidaciones solitarias, además de sugerir que la frecuencia de paternidad múltiple depende principalmente de la abundancia de individuos en el sistema de apareamiento.

1.2. Tortuga golfina *Lepidochelys olivacea*

1.2.1. Morfología

La tortuga golfina (*L. olivacea*) posee un carapacho casi circular, de amplitud y longitud similar, tectiforme (en forma de carpa), márgenes ligeramente levantados y con más de 15 escudos mayores: 5-7 dorsales y 5-7 pares laterales, el par lateral anterior está en contacto con el escudo precentral. El plastrón cuenta con cuatro escudos inframarginales, cada uno con un poro muy conspicuo en su margen posterior, los cuales son la salida externa de la glándula de Rathke (Márquez, 2002); esta glándula secreta una sustancia de función desconocida, aunque se ha hipotetizado que podría estar relacionada con la comunicación intraespecífica para la anidación masiva y sincronizada o “arribada” –característica de las especies de este género–, actuar como anti-fouling o tener una función antimicrobiana (Wyneken, 2001; Bernardo y Plotkin, 2007). La cabeza es ligeramente triangular, mide en promedio 13 cm y presenta dos pares de escamas prefrontales, el pico córneo no es aserrado, pero tiene un reborde alveolar interno (Márquez, 1990). Los juveniles presentan dos uñas

en cada aleta, la distal durante el crecimiento se reduce en tamaño hasta hacerse casi imperceptible en los adultos (Márquez, 1976). En los adultos, el carapacho y el plastrón presentan una coloración verde olivo medio a oscuro y amarillo crema, respectivamente; por su parte la coloración en los individuos inmaduros es dorsalmente gris y ventralmente blanca. La longitud recta del caparazón (LRC) en adultos es en promedio de 72 cm y el peso típicamente va de 35 a 50 kg (Eckert *et al.*, 1999).

1.2.2. Alimentación

La tortuga golfina tiene una dieta oportunista y omnívora, dependiente del hábitat usado para alimentarse y de la localización. Entre los alimentos descritos en su dieta se encuentran medusas, ctenóforos, salpas, gasterópodos, bivalvos, peces y algas (Varo-Cruz *et al.*, 2015).

1.2.3. Reproducción

Aunque no se conoce con precisión la edad a la que *L. olivacea* madura sexualmente, se sabe que las hembras generalmente alcanzan una longitud de 60 cm antes de volverse sexualmente activas y que la edad varía entre 10 y 18 años con un promedio de 13 años (Zug *et al.*, 2006). La anidación en la costa americana se desarrolla de julio a febrero, con el pico en septiembre u octubre. A diferencia de otras tortugas marinas, la tortuga golfina se reproduce casi anualmente, ya que más del 60% de las tortugas desovan todos los años (Márquez 1990). El comportamiento reproductivo en esta especie presenta dos estrategias: 1) anidación solitaria, que es la forma más común e involucra de 40 a 50 hembras anidantes en la playa y 2) anidación masiva, una conducta única de esta especie, que llega a reunir a más de 100 000 hembras durante 2 o 3 noches comúnmente cercanas al cuarto menguante (Márquez, 2002); este fenómeno, le confiere el ser considerada la especie de tortuga marina más espectacular en cuanto a sus hábitos reproductivos.

Las hembras de tortuga golfina, generalmente cavan nidos de 30-55 cm de profundidad, en donde depositan una media de 110 huevos con un diámetro y peso promedio de 39.7 mm y 34.2 g, respectivamente; ovopositan por lo menos dos o tres veces en la misma temporada, disminuyendo la cantidad de huevos entre su primer y último desove; por lo general el primero es mayor a 100 huevos y el último menor que 80 (Herbst, 1999; Márquez, 1976, 2002). El periodo de incubación tiene una duración de 45-50 días, según la temperatura del nido. Esta especie presenta una tasa de eclosión típicamente alta, que ronda el 75% (Frazier, 1991).

1.2.4. Distribución

La tortuga golfina es la especie de tortuga marina más abundante en la actualidad; habita en los mares tropicales y subtropicales de todo el mundo y es abundante en las costas de los océanos Pacífico, Índico y Atlántico sur. Esta especie posee un ámbito de distribución geográfica amplio en el Pacífico Oriental, que cubre desde la Patagonia hasta Alaska, con áreas de concentración en el suroeste de Baja California, sur de Sinaloa, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, en México; así como en Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica. Esta última, junto con México, cuenta con las poblaciones reproductoras más importantes del continente americano (Pritchard, 1979; Márquez, 2002).

Las playas de anidación más importantes en la actualidad son las de La Escobilla y Morro Ayuta, Oaxaca, México, las de Ostional y Nancite en Costa Rica, las de Guiana y Surinam y la de Gahimarta, en el distrito de Orissa en la India (Márquez, 2002).

1.3. Anidación de tortugas marinas en el sur de Sinaloa, México

En la costa sur de Sinaloa, México, se encuentran las zonas con mayor registro de anidación de tortugas marinas del estado, en donde arriban tres de las siete especies que habitan aguas mexicanas: la tortuga golfina (*L. olivacea*), la tortuga prieta (*C. mydas agassizi*) y la tortuga laúd (*D. coriácea*). Entre las playas de anidación del litoral sur de Sinaloa destacan El Verde Camacho, en Mármol de Salcido, dentro del municipio de Mazatlán y Las Cabras, en el municipio de Escuinapa, al ser áreas en las que se realizan trabajos de monitoreo, conservación y manejo de las colonias reproductoras durante todo el año, gracias al establecimiento de campamentos especializados para la protección de estas especies.

Con trabajos de investigación sostenida y actividades para la protección de nidos de tortugas marinas desde 1975, El Verde Camacho representa la playa más importante para la reproducción de la tortuga golfina en Sinaloa. En 1986, el área fue decretada por la CONANP como Zona de Reserva para la Tortuga Marina y en 2002 se recategorizó a Área Natural Protegida, con la designación de Santuario de Tortugas Marinas; posteriormente, en 2004 fue decretada como sitio Ramsar bajo el nombre de Playa Tortuguera El Verde Camacho. Ésta es una playa índice para áreas de no arribada de la tortuga golfina (Briseño-Dueñas, 1980), en donde también anidan la tortuga prieta y de manera esporádica la tortuga laúd; además, es un hábitat de alimentación y corredor migratorio de juveniles, subadultos y adultos de la tortuga Carey. Por otro lado, como parte de un esfuerzo por conocer la situación actual de las tortugas marinas, Márquez-Millán *et al.* (2004) realizaron un diagnóstico de las playas

de anidación en el noroeste de México. En éste, se documenta a playa Las Cabras, como “área con potencial para la anidación de tortugas marinas” debido a la escasa anidación que se registraba en la zona, lo que ha aumentado en los últimos diez años a raíz de los esfuerzos de conservación liderados por la UNAM. En esta playa están documentadas anidaciones de tortuga golfina, tortuga prieta, y en menor medida de tortuga laúd, cuya presencia se registra ocasionalmente. La época de mayor abundancia de desoves para ambas playas inicia en julio y termina en noviembre, aunque pueden ocurrir desoves puntuales esporádicos a lo largo de todo el año.

1.4. Microsatélites

Los microsatélites (SSR o STR por sus acrónimos en inglés para *simple sequence repeat* y *short tandem repeat*) son secuencias de ADN constituidas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases. Debido a su abundancia, alto contenido de polimorfismo, codominancia, fácil detección y la transferibilidad entre los estudios, los microsatélites son marcadores moleculares ideales para estudios de paternidad (Aggarwal *et al.*, 2004). Algunas de las principales características que hacen que los marcadores microsatélites sean de gran utilidad en el estudio de genotipificación es que son abundantes en todos los genomas eucariotas y que se encuentran distribuidos de manera regular a lo largo del genoma en regiones no codificantes o intergénicas. Además, son codominantes y segregan de manera mendeliana, es decir, cada individuo presenta un patrón simple de dos secuencias: una heredada del padre y otra de la madre. Los microsatélites son de especial utilidad debido a que son altamente polimórficos, lo que facilita la identificación de individuos y a que poseen un elevado grado de variabilidad entre poblaciones (Goldstein y Schlotterer, 2000). La arquitectura de los microsatélites permite su fácil análisis mediante PCR ya que las secuencias no repetitivas flanqueantes permiten diseñar iniciadores específicos para cada locus y el tamaño del fragmento amplificado indicará el número de veces que se repite la secuencia conocida.

Una vez que los alelos maternos para cada microsatélite se han identificado en las crías de tortugas marinas, los alelos restantes constituyen la contribución paterna. La paternidad múltiple se puede inferir en la nidada de una hembra por medio de la presencia de más de dos alelos paternos, con tres alelos que significa la presencia de por lo menos dos padres, y cinco alelos que evidencian la presencia de por lo menos tres padres.

Con este estudio se pretende determinar el sistema de apareamiento de la tortuga golfina, *L. olivacea*, en dos playas de anidación de la costa sur de Sinaloa: El Verde Camacho, Mazatlán y Las Cabras, Escuinapa, mediante el uso de 5 y 4

microsatélites nucleares, respectivamente, los cuales han mostrado altos niveles de polimorfismo en estudios previos con poblaciones de tortugas marinas, éstos serán amplificados a partir de muestras de ADN de hembras anidantes y su descendencia. Este análisis permitirá la reconstrucción del genotipo paterno y con ello evaluar los niveles de paternidad múltiple en las nidadas de estas dos colonias de tortugas marinas, al mismo tiempo permitirá estimar la proporción sexual en los sitios de cópula mediante la identificación de los machos sexualmente activos en el sistema. La información recabada se empleará para la comparación de los niveles de estos parámetros para esta y otras especies de tortugas marinas estudiadas en distintas áreas.

Para el estudio de la colonia de anidación de El Verde Camacho, el trabajo de campo para la colecta del material biológico, así como el trabajo de laboratorio para la amplificación de los microsatélites fue realizado por la Cand. Dra. Anelisse Bárcenas Ibarra como parte de su proyecto de tesis doctoral titulado: Malformaciones congénitas en embriones y neonatos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) y su relación con factores ambientales; dirigido por la Dra. Alejandra García Gasca. Posteriormente a que fue realizado el análisis de fragmentos, los archivos en bruto del secuenciador fueron donados para su seguimiento en esta investigación. Mientras que, para el estudio de la colonia de anidación de Las Cabras, el trabajo fue realizado desde la colecta de muestras hasta el análisis estadístico por los responsables del presente proyecto.

2. Antecedentes

Los marcadores moleculares se han utilizado en las tortugas marinas para describir el sistema de apareamiento de las siete especies existentes, mediante el análisis de la paternidad múltiple y el almacenaje de esperma en el oviducto caracterizado para seis de ellas: *C. mydas*, *C. caretta*, *L. kempii*, *L. olivacea*, *D. coriacea*, y *N. depressus* (Pearse y Avise 2001; Bowen y Karl 2007; Lee 2008; Jensen *et al.*, 2013).

La presencia de paternidad múltiple ha sido documentada en las crías de todas las especies de tortugas marinas de la familia Cheloniidea (Kichler *et al.*, 1999; Moore y Ball, 2002; Ireland *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2006; Joseph y Shaw, 2011), con niveles tan altos como del 92% en arribadas de anidación masiva de tortugas golfinas (Jensen *et al.*, 2006).

Stewart y Dutton (2011), evaluaron el nivel de paternidad múltiple en las nidadas de 12 hembras de tortuga laúd que ovopositaron en más de una ocasión a lo largo de

una temporada de anidación en el Refugio de Vida Silvestre de Sandy Point en St. Croix, Islas Vírgenes, E.U.A; estas hembras habían anidado en St. Croix por cantidades variables de tiempo (1 a 19 años). Para el análisis genómico se utilizaron siete marcadores polimórficos para determinar el genotipo de las hembras y 1,019 crías en representación de 38 nidos (3 a 4 nidadas de cada hembra). Se encontró que las nidadas de siete hembras (58.3%) no mostraron evidencia de paternidad múltiple, mientras que las cinco hembras restantes (41.7%) se aparearon con dos machos cada una, al evidenciarse por lo menos dos padres entre sus crías. La poliandria en estas cinco hembras quedó demostrada en todas sus nidadas a lo largo de la temporada de anidación. Además, se demostró la viabilidad de la utilización de la reconstrucción del genotipo paterno para caracterizar el componente masculino de la población de neonatos, así como para evaluar la proporción sexual operacional de esta especie durante las cópulas.

Duran *et al.* (2015) demostraron que con dos marcadores microsatélites (Cm84 y Or1) es posible evaluar efectivamente el nivel de paternidad múltiple; esto después de estudiar una población de tortuga golfina con anidación solitaria en el Golfo de Fonseca, Honduras. Posterior al análisis evidenciaron la paternidad múltiple en seis de cada ocho nidos muestreados (75%), con un número mínimo de dos padres en cuatro nidos, y un mínimo de tres padres en los dos nidos restantes. Este alto nivel de paternidad múltiple en una pequeña población con anidación solitaria observable sugirió que las hembras que anidan en Honduras pudieran venir de playas nicaragüenses proximales de anidación masiva. Además, se mostró que los estudios de paternidad múltiple se pueden llevar a cabo con eficacia en ausencia de muestras maternas, y que las muestras mezcladas de ADN de los neonatos de un nido pueden ser utilizadas como resultados comparables con las muestras individuales de ADN de cada cría.

Figgner *et al.* (2015) utilizaron tres marcadores microsatélites para evaluar los niveles de paternidad múltiple de una población de tortuga laúd, *Dermochelys coriacea*, con anidación en playa Gandoca, Costa Rica. Con sus análisis no sólo estimaron que la paternidad múltiple es más común que en otras poblaciones (22% de las nidadas), sino también identificaron la presencia de “nuevos” padres en nidadas sucesivas, lo que sugiere la existencia de cópulas durante la temporada de anidación.

González-Garza *et al.* (2015) genotificaron 12 loci microsatélites de hembras anidantes de tortugas carey y sus crías, en la península de Yucatán, México, para evaluar los niveles de paternidad múltiple, la variación genética, y la relación de los niveles individuales de homocigosis con el éxito reproductivo. De los nidos analizados, solo el 6% presentó paternidad múltiple. En las nidadas donde se presentó la

paternidad múltiple, un solo progenitor (el padre primario) tendió a ser el responsable de la mayoría de las fertilizaciones (54-60%); mientras que el padre secundario contribuyó en 28-46% de las fertilizaciones. En los nidos engendrados por tres padres, el tercero contribuyó con el 12% de las muestras analizadas.

Los estudios de telemetría en el género *Lepidochelys* se han concentrado en la tortuga lora (*L. kempii*). Shaver *et al.* (2005) analizaron los movimientos de 11 machos de esta especie rastreados por telemetría satelital en las zonas de reproducción de Rancho Nuevo, Tamaulipas; y tras observar que solo uno de los 11 machos monitoreados se desplazó a grandes distancias una vez concluida la temporada de anidación en la zona estudiada, mientras que los diez restantes nadaron multidireccional y linealmente sin alejarse de la costa a no más de 37 metros de profundidad, concluyeron que una proporción significativa de la población masculina adulta probablemente reside en las proximidades de las playas de anidación durante todo el año y no migra grandes distancias. Esto ocurre en contraste con las hembras que realizan migraciones reproductivas entre las zonas de alimentación y anidación, comúnmente a distancias de varios cientos o miles de kilómetros, en busca de sitios con mayor abundancia de alimento, requerido para acumular la suficiente energía para el proceso de producción de huevos. Este fenómeno se ha demostrado por telemetría satelital con hembras adultas de tortuga lora, golfina, verde, caguama, laúd y Carey (Byles, 1989; Mysing y Vanselous, 1989; Balazs, 1994; Byles y Swimmer, 1994; Plotkin *et al.*, 1995; Renaud *et al.*, 1996; Schroeder *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 1998; Luschi *et al.*, 1998; Shaver, 2001).

Tras estudiar la paternidad múltiple de una población de Salmón del Atlántico, *Salmo salar*; Morán y García-Vázquez (1998), concluyen que la paternidad múltiple es una manera de aumentar el tamaño efectivo en una población y en consecuencia una forma para mantener la variabilidad genética en las poblaciones con un número reducido de adultos.

3. Justificación

Con el fin de tomar decisiones eficaces en el manejo de recursos naturales y mejorar los proyectos actuales de conservación de tortugas marinas en las playas de anidación, es importante estimar con precisión el tamaño de la población, su estructura, y el comportamiento reproductivo. Los estudios de paternidad múltiple proporcionan información valiosa con respecto a patrones de apareamiento y ayudan en el entendimiento de la estructura de la población (Jensen *et al.*, 2006).

Tener la capacidad de conocer la dinámica y abundancia relativa de los machos de tortugas marinas en el sistema de apareamiento en una población ofrece importantes ventajas para la determinación de la viabilidad de la población. Este elemento es relevante, ya que en la producción de crías en la mayoría de las playas de anidación se ha encontrado un fuerte sesgo hacia el sexo femenino (Godfrey *et al.*, 1996; Hawkes *et al.*, 2007), por lo tanto, es fundamental comprender si esta proporción de sexos se mantiene durante el desarrollo y también se expresa en los sitios de reproducción.

Contrario a lo que se podría esperar, la proporción sexual entre los adultos que participa en la cópula puede ser afectada de manera significativa por asimetrías de comportamientos entre los sexos. Por ejemplo, la proporción de hembras y machos que están listos para reproducirse en cualquier temporada de anidación puede variar. En especies como el petrel azul (*Halobaena caerulea*) y el albatros de ceja negra (*Thalassarche melanophrys*), las hembras pueden omitir la anidación en algunos años dependiendo de su condición corporal (Chastel *et al.*, 1995) y su experiencia (Nevoux *et al.*, 2007) y mientras que los machos estén activos todos los años se modifica la proporción sexual “operativa” durante la cópula. De manera análoga las hembras de tortugas marinas anidan sólo cada dos o tres años. Este patrón de anidación se cree que está relacionado con la energía; las hembras requieren acceso a sitios ricos en alimento para almacenar suficiente energía para llevar a cabo su migración reproductiva, así como producir cientos de huevos ricos en lípidos. Los machos, sin embargo, no están limitados por el requerimiento de energía masiva para la producción de huevos, y sólo necesitan almacenar suficiente energía para desplazarse a las áreas de reproducción, que suelen ser distancias mucho más cortas que las recorridas por las hembras, debido a que se mantienen en sitios más cercanos a las zonas de apareamiento durante todo el año. La consecuencia de estos requerimientos energéticos menores se manifiesta en que en las tortugas verde, laúd y caguama, los machos son capaces de regresar a la zona de reproducción anualmente (Godley *et al.*, 2002; James *et al.*, 2005; Hays *et al.*, 2010), con implicaciones para las proporciones de sexos en la reproducción. Por ejemplo, la más corta periodicidad de los ciclos reproductores en machos puede compensar los efectos de una población de subadultos sesgada a las hembras, y resultar en una proporción de sexos operacional cercana a 1:1. Tener una estimación más exacta de la proporción operacional de sexos para las poblaciones de tortugas marinas, ayudará en el desarrollo de planes de gestión y recuperación basados en un mejor conocimiento científico, al tiempo que permitirá evaluar mejor las amenazas a la viabilidad de la población.

Las técnicas con marcadores moleculares microsatélites, conocidas popularmente como huellas de identificación individual del ADN, se han usado para evaluar la genealogía y la posibilidad de paternidad múltiple en las nidadas de diferentes especies de tortugas marinas (FitzSimmons, 1998). Las comparaciones en secuencias de ADN pueden aportar datos importantes sobre la historia de las tortugas marinas y varios aspectos de su comportamiento reproductivo y ecología. Por ejemplo, los marcadores moleculares basados en ADN mitocondrial (ADNmt) proporcionan datos sobre el linaje materno y dispersión de poblaciones. Los análisis de ADN nuclear (ADNn) pueden revelar el nivel de flujo genético proporcionado por los machos y sus hábitos reproductivos con hembras de diferentes zonas de anidación. También dan luz sobre el tema de la variación de paternidad en cada nido (Kichler y Holder, 2007). Los datos genéticos aportan información de conductas difíciles de observar en las tortugas marinas, por ejemplo, el hecho de encontrar diferentes perfiles genéticos entre las crías de un mismo nido permite inferir que las hembras se aparean con más de un macho (FitzSimmons, 1998) e inclusive permitirían mediante pruebas de paternidad, rastrear a los machos y el origen de estos.

Por lo anterior y puesto que el objetivo principal de esta investigación es determinar el sistema de apareamiento de la tortuga golfina en dos colonias de anidación de la costa sur de Sinaloa: El Verde Camacho, Mazatlán y Las Cabras, Escuinapa, mediante el uso de microsatélites nucleares, se contribuirá en el entendimiento de los hábitos reproductivos de esta especie. Será posible determinar la incidencia de paternidad múltiple en las crías durante una temporada de anidación y los genotipos paternos deducidos podrán aportar datos concernientes a la proporción de machos que participan en la fecundación. Los resultados obtenidos para estas colonias de tortuga golfina, podrán ser comparados con los datos existentes para la misma especie estudiada en distintas zonas y extrapolados a otras especies, con lo que esta investigación podrá convertirse en un punto de referencia para estudios similares futuros, lo que coadyuvará a llenar los vacíos en el conocimiento sobre la proporción sexual operativa en las tortugas marinas.

La información obtenida con este estudio permitirá una mejor comprensión de la dinámica poblacional de las tortugas golfinas, e invariablemente tales acciones se traducirán en un beneficio para la especie; debido a que los planes de manejo actuales están basados en la protección de los nidos y en la obtención de un mayor número de individuos, sin tomar en cuenta el estado y origen de estos. Las herramientas moleculares, en particular el uso de microsatélites, han demostrado ser muy efectivas en estudios poblacionales de especies silvestres, por lo que su uso en la presente

investigación permitirá ampliar la información actual sobre la tortuga golfina, *L. olivacea*.

4. Preguntas de investigación

En las colonias de tortuga golfina que anidan en la costa sur de Sinaloa, específicamente en las playas de conservación El Verde Camacho, Mazatlán y Las Cabras, Escuinapa:

- ¿Cuál es la incidencia global de paternidad múltiple en sus nidadas?
- ¿Cuál es el número promedio de padres por nido entre las nidadas de estas colonias?
- ¿Cuál es la proporción sexual operacional?
- ¿Cómo se comparan los resultados para estas playas con los de estudios previos con la misma y otras especies estudiadas en distintas áreas?

5. Objetivos

General:

Determinar el sistema de apareamiento de la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*, en dos colonias de anidación de la costa sur de Sinaloa: El Verde Camacho, Mazatlán y Las Cabras, Escuinapa, mediante el uso de marcadores microsatélites nucleares.

Específicos:

- Determinar la incidencia de paternidad múltiple en las nidadas de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* durante una temporada de anidación en las playas de conservación El Verde Camacho, Mazatlán y Las Cabras, Escuinapa, ambas pertenecientes al litoral sur de Sinaloa.
- Determinar la variación en el número de padres que contribuyen a las nidadas con paternidad múltiple.
- Utilizar los genotipos paternos deducidos para estimar la proporción sexual en la reproducción de estas colonias de tortugas marinas.
- Comparar los niveles de paternidad múltiple y proporción de sexos para ambas colonias de tortuga golfina con los de la misma y otras especies estudiadas en distintas zonas.

6. Área de estudio

Las actividades de campo para la ejecución de este proyecto se llevaron a cabo de en dos playas de conservación de tortugas marinas de la costa sur del estado de Sinaloa, al noroeste de México: El Verde Camacho, en la sindicatura de Mármol de Salcido, municipio de Mazatlán y Las Cabras, en el municipio de Escuinapa. Estas playas de anidación se encuentran separadas por una distancia aproximada de 109 km (Figura 1). Ambas zonas forman parte de la Llanura Costera del Pacífico, provincia geológica caracterizada por el desarrollo de una planicie construida por la modificación de deltas que avanzan paulatinamente hacia el oeste formados en las desembocaduras de los ríos Mayo, Fuerte, Sinaloa, Culiacán, San Lorenzo y Mocorito; este relieve se compone de grandes llanuras de inundación, lagos y pantanos alineados paralelamente a la costa.

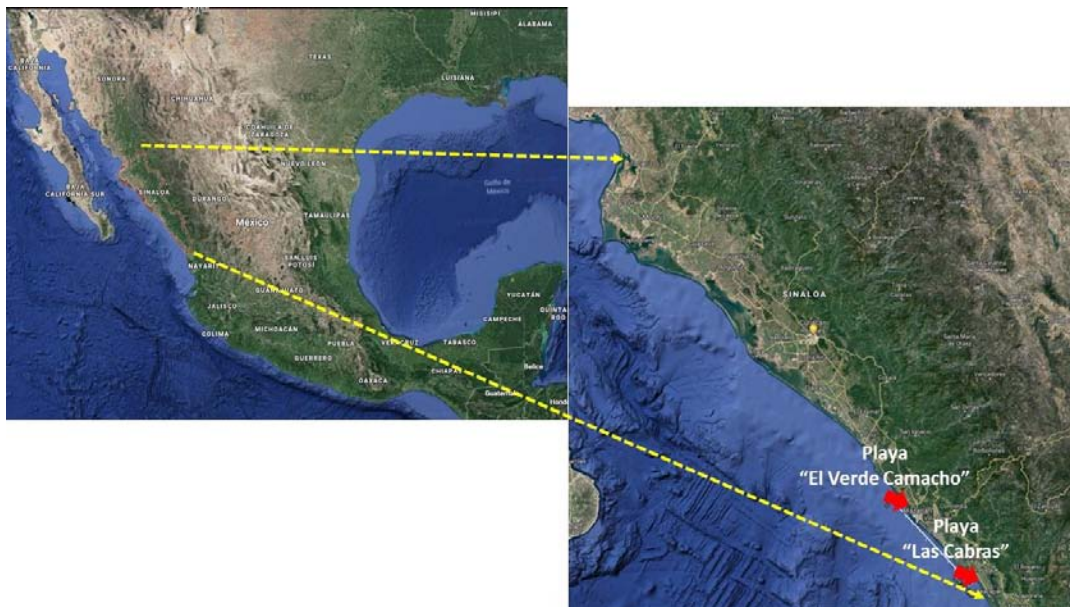


Figura 1. Localización de los sitios de muestreo: El Verde Camacho, Mazatlán, Sin. y Las Cabras, Escuinapa, Sin.

El trabajo de campo para el estudio de ambas colonias de anidación incluyó patrullajes nocturnos para la localización de las hembras grávidas durante su arribo a la playa, la toma de muestras sanguíneas a las mismas una vez completada la ovoposición, el transporte de los huevos de cada madre a nidos protegidos (cajas de poliestireno o nidos de arena resguardados dentro de un corral protegido con alambrada) y el muestreo de las crías una vez completado el periodo de incubación.

A continuación, se describe la ubicación exacta, así como aspectos generales de cada playa de anidación.

6.1. Playa El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa

El Santuario de tortugas marinas El Verde Camacho, se ubica en la sindicatura de Mármol de Salcido, perteneciente al municipio de Mazatlán, Sinaloa. El centro aproximado de esta playa se encuentra en las coordenadas 23°22'10"N, 106°30'52"W; y se delimita desde Punta Cerritos a Punta Gruesa (Mármol), de oeste a este abarca desde la isolínea batimétrica de las 5 brazas al contorno de la maxipista Mazatlán-Culiacán. Cuenta con una superficie aproximada de 6,450.26 ha y 25 km en el perímetro costero, correspondientes al 31% de la extensión litoral del municipio de Mazatlán. El área contigua a la playa de anidación cuenta con nueve sistemas estuarinos y marismas de tamaño variable, que al conectarse temporalmente al mar aportan un pulso significativo de energía a la zona costera adyacente. El humedal costero de mayor tamaño es El Verde, alimentado por el flujo estacional del Río Quelite. Esta gran riqueza de humedales de agua dulce, salobre y marina, son utilizados como área de reproducción, crecimiento, refugio y alimentación por una alta diversidad de especies, entre las que destacan: aves residentes y migratorias, otros reptiles además de las tortugas y mamíferos terrestres clasificados como especies en riesgo (CONANP). En el perímetro de esta playa se encuentra el campamento de Conservación de tortugas marinas que lleva el mismo nombre, ubicado en las coordenadas 23°26'33"N, 106°34'57"W. Las instalaciones de este campamento fueron utilizadas para la incubación de las nidadas pertenecientes a las madres bajo estudio de esta colonia de tortugas golfinas, *L. olivacea*.

6.2. Playa Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa

La playa de anidación de tortugas marinas Las Cabras, se localiza en el municipio de Escuinapa, al sur de Sinaloa. Se encuentra ubicada en las coordenadas 22°42'19"N, 105°51'59"W; limitada al norte por la boca del Río Baluarte y al sur por la boca del estero de Teacapán. Se constituye por una barra arenosa de 40 km de extensión; y aunque tradicionalmente se le conoce como playa Las Cabras, la zona también es conocida como Barra de Teacapán. Dentro de este espacio se encuentra el campamento FONATUR-SINALOA ubicado en el Centro Integralmente Planeado (CIP), en el predio denominado Las Cabras, el cual tiene una extensión de 12 km de costa, cuenta con una superficie de 2,381 hectáreas y se sitúa en las coordenadas 22°44'45"N, 105°54'35"W; en dicho campamento se efectuó la incubación y monitoreo de los huevos cuyas madres fueron muestreadas para el análisis de esta colonia de anidación.

7. Materiales y Métodos

7.1. Infraestructura y Recursos Materiales.

Los campamentos tortugeros El Verde Camacho y FONATUR-SINALOA, cuentan con un corral y una sala equipada con cajas de poliestireno para la incubación y protección de los huevos colectados durante los patrullajes de búsqueda de hembras anidantes y nidos; en dichos espacios los nidos de las hembras muestreadas para este estudio fueron incubados con la finalidad de esperar el momento de la eclosión y proceder a la toma de las muestras de tejido con el equipo pertinente para tal tarea (jeringas, navajas para bisturí, pinzas, guantes de látex, agentes desinfectantes y hemostáticos, etc.).

El trabajo de laboratorio para la muestras de la colonia de anidación de El Verde se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología Molecular del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) bajo la supervisión del investigador responsable de este laboratorio, el Dr. Axayacatl Rocha; mientras que las actividades de laboratorio para las muestras de Las Cabras fueron ejecutadas en el laboratorio de Genética, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Mazatlán, a cargo del Dr. Alberto Abreu Grobois; en ambos laboratorios se contó con el equipo y los materiales necesarios para conservar, extraer y amplificar el ADN por medio de PCR (Polymerase Chain Reaction), con el uso de microsatélites nucleares. Los productos de la PCR fueron enviados a los laboratorios de *Macrogen* (Seúl, Corea del Sur), en donde llevaron a cabo el análisis de fragmentos de ADN; *Macrogen* es una empresa global de ingeniería científica que ofrece servicios de análisis de ADN en alta calidad utilizando tecnología de punta en robótica e instrumentación, a un costo accesible y con un tiempo de respuesta muy competitivo.

7.2. Trabajo de campo

7.2.1. Muestreo de hembras anidantes

Para la obtención del material biológico de la colonia de El Verde, los muestreos se realizaron durante la temporada de anidación 2012, entre los meses de julio y diciembre, mientras que para la colonia de Las Cabras el muestreo se efectuó a lo largo de la temporada de anidación 2016, comprendida de junio a diciembre bajo los permisos de colecta científica No. SGPA/DGVS/04218/12 y SGPA/DGVS/06615/14 de la Dirección General de Vida Silvestre, de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), para El Verde y Las Cabras, respectivamente.

Diariamente se realizaron recorridos entre las 20:00 y 04:00 hrs con el propósito de localizar hembras en proceso de desove; una vez terminada la ovoposición se

examinaron las aletas delanteras en busca de marca de identificación y en caso de presentarla se registraba el código. Para aquellas hembras sin marca, fue colocada una placa de titanio de numeración ascendente en la aleta delantera izquierda, con el fin de identificarlas en próximas anidaciones; las marcas fueron obtenidas mediante la CONANP. Posteriormente para cada hembra se tomaron medidas morfométricas, entre ellas largo curvo del caparazón (LCC, cm), ancho curvo del caparazón (ACC, cm) y peso (kg), así como otros datos pertinentes a la nidada tales como número de huevos, ubicación del nido, hora de puesta, etc.

Para la toma de muestra de las madres se extrajeron de 5 a 7 ml de sangre del seno cervical dorsal, la vena yugular externa se encuentra relativamente dorsal y superficial en el cuello. El músculo cervical (= esplenio de la cabeza) y los músculos cervicales transversales son buenos puntos de referencia dorsales para la yugular externa. Estos músculos son evidentes desde el exterior y están a cada lado de los vasos; la yugular externa se encuentra al fondo y entre ellos, y medial al músculo cervical transversal. Esta zona fue previamente lavada con agua y limpiada con etanol. Para las hembras de El Verde la extracción se realizó de acuerdo con Owens y Ruiz (1980) mediante jeringas desechables de 21" de dos extremos (BD Vacutainer®) y tubos Vacutainer con heparina de sodio (BD Vacutainer®). Por su parte, para las hembras de Las Cabras se utilizaron jeringas esterilizadas de 10 ml con aguja 20G de 0.9 mm X 32 mm. Una vez insertada la aguja en la zona se procedió a la extracción. Al finalizar, a cada hembra se le aplicó violeta de genciana sobre la herida para reducir el riesgo de infección. La sangre se diluyó en 8.6 ml de buffer lítico y se preservó a temperatura ambiente hasta su almacenamiento bajo congelación de acuerdo con White y Densmore, 1992; cada tubo se etiquetó con la marca de identificación de la hembra. En la Figura 2, se presenta parte del procedimiento para el muestreo de las hembras anidantes.



Figura 2. Procedimiento para el muestreo de hembras anidantes. A) Marcado con placas metálicas en aleta delantera izquierda. B) Registro de medidas morfométricas. C) Extracción sanguínea del seno cervical dorsal.

Del total de sangre extraída para cada hembra de Las Cabras 2 ml fueron almacenados para el desarrollo de este proyecto y el resto se preservó para el proyecto de tesis doctoral de la Cand. Dra. Yazmín Segura García, titulado “Efectos de la contribución materna, la temperatura y el método de incubación sobre la biometría y el desempeño locomotor en crías de tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*”; puesto a que esta actividad se ejecutó en conjunto para ambos proyectos, igualmente desarrollados en el laboratorio de Genética, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Mazatlán. El propósito de muestrear a los mismos individuos (tanto madres como crías) es que la presente investigación pueda contribuir con información sobre posible efecto de la contribución paterna sobre las características biométricas y de desempeño locomotor de las crías, aspectos que son analizados en el estudio de tesis de doctoral de la Cand. Dra. Yazmín Segura.

Posteriormente a que las hembras fueron muestreadas, los nidos fueron colectados y transportados a los campamentos de conservación. En el caso de las nidadas de El Verde estas fueron depositadas en cajas de unicel de acuerdo con Mortimer (1999). La caja de unicel fue etiquetada con la marca de identificación de la hembra (p. ej. EV1081-I) y colocada en la sala de incubación hasta su eclosión y análisis. Por su parte para las nidadas de Las Cabras los huevos de cada nido fueron distribuidos en tres distintos métodos de incubación: corral, cajas de poliestireno y playa (nidos *in situ*).

Para la colonia de El Verde se colectaron en total muestras de 37 madres; si una hembra era avistada por segunda y/o tercera vez, de ser posible, los nidos se colectaron y etiquetaron con el mismo sistema, pero indicando si era la segunda o tercera puesta de la madre (p. ej. EV1081-II o EV1081-III, respectivamente). De tal modo que de las 37 hembras muestreadas de 23 se colectó una nidada, de 13 hembras 2 nidadas y de una hembra se lograron colectar 3 nidadas (Figura 3), esto sumó un total de 52 nidadas muestreadas para esta colonia. El número de hembras para las que se colectaron más de una nidada resalta el esfuerzo de muestreo realizado en esta playa.

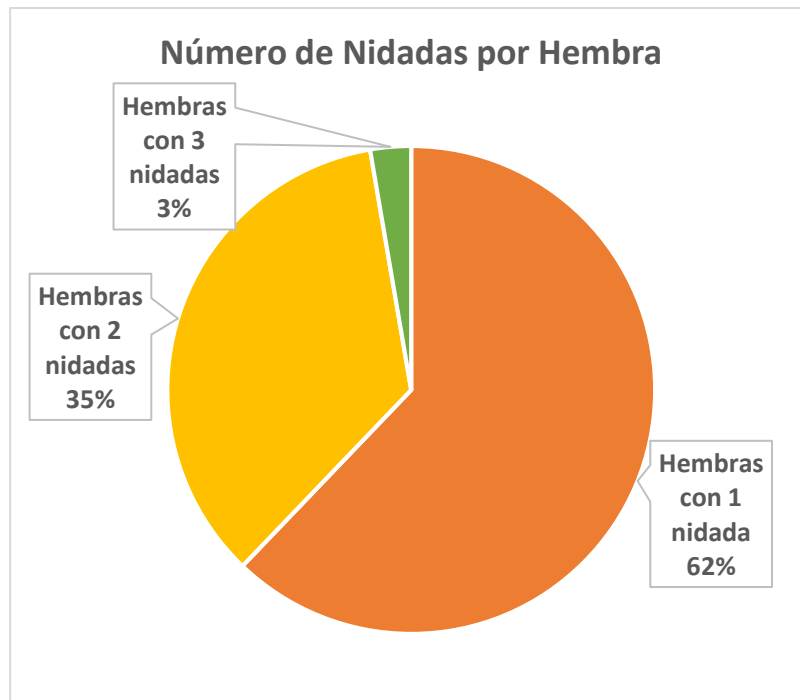


Figura 3. Número de nidadas muestreadas por hembra para la colonia de anidación de *Lepidochelys olivacea*, de El Verde.

De la colonia de anidación de Las Cabras se colectaron en total muestras de 18 madres, de las cuales se colectó una nidada, puesto a que estas 18 hembras anidaron una sola vez durante la temporada.

7.2.2. Muestreo de crías

Para el muestreo de las crías de la colonia de El Verde, de cada nidada se tomaron todas las crías (neonatos o embriones) con malformaciones congénitas, así como los gemelos presentes, además de dos controles que consistieron en neonatos y/o embriones muertos por causa natural y sin malformaciones externas; de esta manera el número de individuos muestreados en cada nido fue variable. En total se colectaron muestras de 189 crías (dispersas en 1 a 3 nidadas por hembra). Las crías se colectaron completas con excepción del vitelo; para la extracción de ADN, de cada una se tomó una porción de tejido de la parte posterior del cuello y se almacenó en una bolsa de plástico sellada. Los tejidos restantes se dividieron en dos partes y se distribuyeron en bolsas separadas para otros análisis. Una vez que los tejidos fueron separados se preservaron a -20°C hasta su análisis.

La etiqueta de identificación de las crías de El Verde quedó compuesta de la marca de identificación de la madre, seguido de un número romano que indicó el número de puesta de la hembra y una clave de referencia al estado de cría (Ej. EV1811-I_E38M).

Por su parte para la colonia de Las Cabras, una vez cumplido el período de incubación (45 días aproximadamente), se seleccionaron al azar de 20 a 30 neonatos vivos de cada nido, no obstante, para las nidadas de algunas hembras también se hizo uso de crías que murieron en distintas fases embrionarias, así como de neonatos muertos durante la emergencia del nido; de esta manera se colectaron muestras de 314 crías vivas y 85 muertas, sumando un total de 399 crías muestreadas para esta colonia.

Para el muestreo de crías vivas, los neonatos seleccionados fueron colocados sobre un tablero de polietileno desinfectado, manteniendo las aletas delanteras apoyadas en posición horizontal contra el tablero. Los ojos de los neonatos fueron protegidos para aplicar alcohol isopropílico como agente desinfectante en el punto de extracción de tejido. Para la biopsia se utilizaron navajas de bisturí No. 11 estériles; la porción de tejido fue tomada del escudo marginal asociado al tercer escudo lateral (Figura 4). Inmediatamente

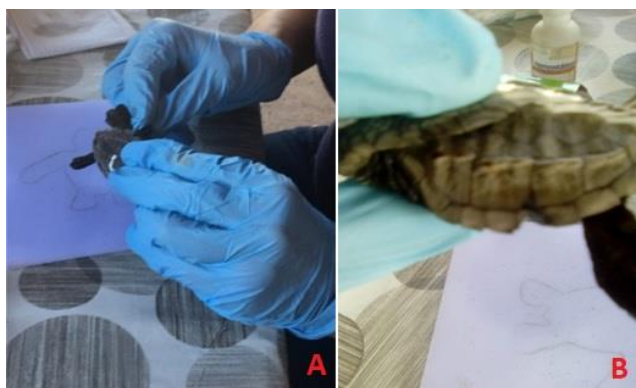


Figura 4. Muestreo de neonatos vivos. A) Toma de la porción de carapacho con navaja de bisturí. B) Vista lateral de la zona de corte (incisión triangular del escudo marginal asociado al tercer escudo lateral).

después de la biopsia se aplicó un agente hemostático (sulfato de aluminio al 56%) en la zona del corte para prevenir el sangrado. Los neonatos se mantuvieron bajo observación por aproximadamente 1 hora para descartar anomalías en el comportamiento y posteriormente fueron liberados en la playa para su ingreso al mar. Por su parte para el muestreo de crías muertas, en el caso de neonatos muertos y de embriones con un estado de desarrollo avanzado se extirparon las aletas delanteras y traseras, y en el caso de embriones en etapa 1 y 2 se preservó al embrión completo. Cada muestra se almacenó en un tubo Eppendorf con solución SED (DMSO, sal saturada y EDTA).

La asignación de una etiqueta de identificación para los individuos de Las Cabras, comprendió en el caso las madres, la numeración de su nido, la cual fue establecida de acuerdo con el número de nido recolectado en el campamento de conservación FONATUR-SINALOA desde el inicio de la temporada de anidación, seguida la letra M (Madre) acompañada del número que le fue asignado a cada hembra del estudio (ej. 198-M5); por su parte para las crías la etiqueta quedó compuesta de la numeración correspondiente a su nido seguida del número de cría muestreada para esta investigación (ej. 198-1, 198-2, 198-3). Las muestras fueron

transportadas al laboratorio de Genética del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Mazatlán, donde fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis.

7.3. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN de las muestras colectadas de ambas colonias se utilizó el Protocolo de Extracción de ADN de sangre y tejidos de vertebrados, utilizando cloruro de litio (LiCl) de Gemmell y Akiyama (1996).

- 1) Cortar la biopsia con una navaja tan finamente como sea posible. En el caso de sangre en buffer de lisis, tomar 200 μl de sangre. Si la sangre está congelada será más sencillo tomar este volumen raspando el material congelado y transferirlo a un tubo vacío para medir el volumen aproximado contra las marcas a cada lado del tubo.
- 2) Colocar el tejido en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y agregar 350 μl de buffer de extracción (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0). Asegurarse de que no quede nada de tejido alrededor de la boca del tubo. Si es sangre, aforar a 400 μl con buffer de extracción.
- 3) Agregar 20 μl 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 le tejido esté suficientemente digerido.
- 5) Agregar 300 μl de LiCl 5M y agitar a temperatura ambiente por un minuto.
- 6) Agregar 600 μl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y agitar brevemente.
- 7) Mezclar en rotador a temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente.
- 8) Centrifugar a máxima velocidad por 15 minutos.
- 9) Extraer con pipeta 500 μl 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 interface (capa media).
- 10) Agregar 50 μl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 1000 μl de etanol al 100% frío.
- 11) Invertir el tubo varias veces y colocarlo en el congelador a -20° por lo menos una hora (o 30 minutos a -80°).
- 12) Centrifugar a máxima velocidad por 20 minutos. Para obtener mayor cantidad de ADN puede ponerse una centrífuga pequeña en el refrigerador (4°C).
- 13) Remover el líquido del tubo con cuidado de no perder el pellet de ADN formado.
- 14) Agregar 750 μl 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 TRIS pH 8.0 para resuspender el pellet. Si se nota que hay mucho ADN se debe aumentar la cantidad de TRIS.
- 19) Permitir que el pellet se resuspenda a 4°C durante la noche o 30 minutos a temperatura ambiente.
- 20) Mezclar la muestra para asegurar que el pellet está totalmente disuelto.
- 21) Calentar las muestras a 95°C por 4 minutos y al finalizar pasarlas inmediatamente a hielo o a su almacenamiento bajo congelación.

Como un procedimiento adicional y con el fin de potenciar la calidad de nuestros productos, algunas de las muestras fueron purificadas mediante el uso de sílica re suspendida; para este paso, en nuestro laboratorio se desarrolló un protocolo de purificación, mismo que fue realizado con el apoyo del Dr. Raúl Llera Herrera, quien nos brindó asesoría y proporcionó los reactivos necesarios para el desarrollo de esta técnica. Dicho protocolo es descrito a continuación:

- 1) Agregar 200 µl de Buffer GT (ver Anexo 1) y 5 µl de sílica resuspendida, agitar brevemente con ayuda de un vortex hasta disolver la sílica, y permitir que está ultima se re-suspenda por 3 -5 minutos.
- 2) Centrifugar de 4000 - 6000 RPM por 2 minutos o de 10000 - 13000 por 1 minuto o hasta observar un pellet de sílica al fondo del tubo.
- 3) Decantar el sobrenadante cuidadosamente con la finalidad de no perder el pellet.
- 4) Agregar 500 µl de Buffer de lavado (ver Anexo 1) y dar vortex por 5 segundos aproximadamente.
- 5) Centrifugar de 4000 a 13000 por 1-2 minutos (verificar que se forme el pellet de sílica al fondo del tubo).
- 6) Decantar el sobrenadante cuidadosamente.
- 7) Repetir lavados (paso 4 a 6); retirar todo residuo de buffer de lavado con pipeta de 100 µl.
- 8) Evaporar el etanol residual dejando el tubo abierto por 4-5 mins
- 9) Para la elución del ADN, agregar 15-30 µl (en muestras de tejido con abundante cantidad de ADN, se puede eluir en mayor volumen) de TRIS (pH 8.0) previamente equilibrado a temperatura ambiente (lo que maximizará la elución). Agitar con la ayuda de un vortex por 5 segundos aproximadamente.
- 10) Permitir que la mezcla repose 5 minutos.
- 11) Centrifugar de 4000 a 13000 por 2 minutos.

12) Tomar muy gentilmente el tubo de la centrífuga e inmediatamente transferir a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml la mayor cantidad de posible de sobrenadante teniendo sumo cuidado de no extraer restos del pellet de sílica (lo que podría interferir en reacciones futuras como PCRs).

Tras el proceso de extracción y purificación de ADN, los productos fueron corridos en geles de agarosa al 1% a un promedio de 50 mA durante una hora; posteriormente fueron analizados por transiluminación UV con un densitómetro fotográfico. Las fotografías obtenidas fueron editadas con el software ImageJ con el objetivo de realizar el análisis de densitometría. Para estimar la concentración de ADN en las muestras en ng/ μ l se empleó el modelo de regresión de Chapman-Richards.

La concentración de ADN se comprobó con lecturas de 1 μ l de muestra en un NanoDrop 200c espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific, MA), en donde también fue evaluada la pureza del ADN obtenido mediante el cálculo de la relación de absorbancia 260/280. Finalmente, las concentraciones fueron normalizadas a 25 ng/ μ l.

7.4. Análisis del ADN con microsatélites nucleares

Con la finalidad de optimizar la amplificación de los microsatélites empleados para el análisis de estas colonias, se optó por utilizar el sistema de marcado con fluorescencia de primers. Esta estrategia de PCR propuesta por Oetting *et al.*, 1995, promueve la utilización de primers con “cola”; en esta técnica se emplea un triplete de primers conformado por un primer forward específico para la especie estudiada con una cola oligonucleotídica en su extremo 5', un primer reverse específico no alterado y un oligonucleótido idéntico a la cola 5' del primer forward marcado con un fluoróforo. La cola es una secuencia de ADN universal que no forma parte del genoma del individuo examinado, razón por la cual no interfiere con los otros primers durante la amplificación.

Durante los primeros ciclos de la PCR, el fragmento deseado es amplificado con el primer forward con la cola oligonucleotídica y el primer reverse; así la secuencia de la cola queda incorporada en la reacción. Para esta primera fase, el primer forward es suministrado a una concentración reducida (1:4 aproximadamente) con relación al resto del triplete. En el siguiente conjunto de ciclos, cuando el primer forward se agota, la temperatura de hibridación desciende, lo que permite que la cola con el fluoróforo pueda hibridar con los productos de PCR presentes y actuar como primer; de esta manera se alinea con la secuencia de la cola del primer forward y, junto con el primer reverse, amplifica el fragmento y al hacerlo incorpora el marcador fluorescente asignado a los productos resultantes (Schuelke, 2000) (Figura 5).

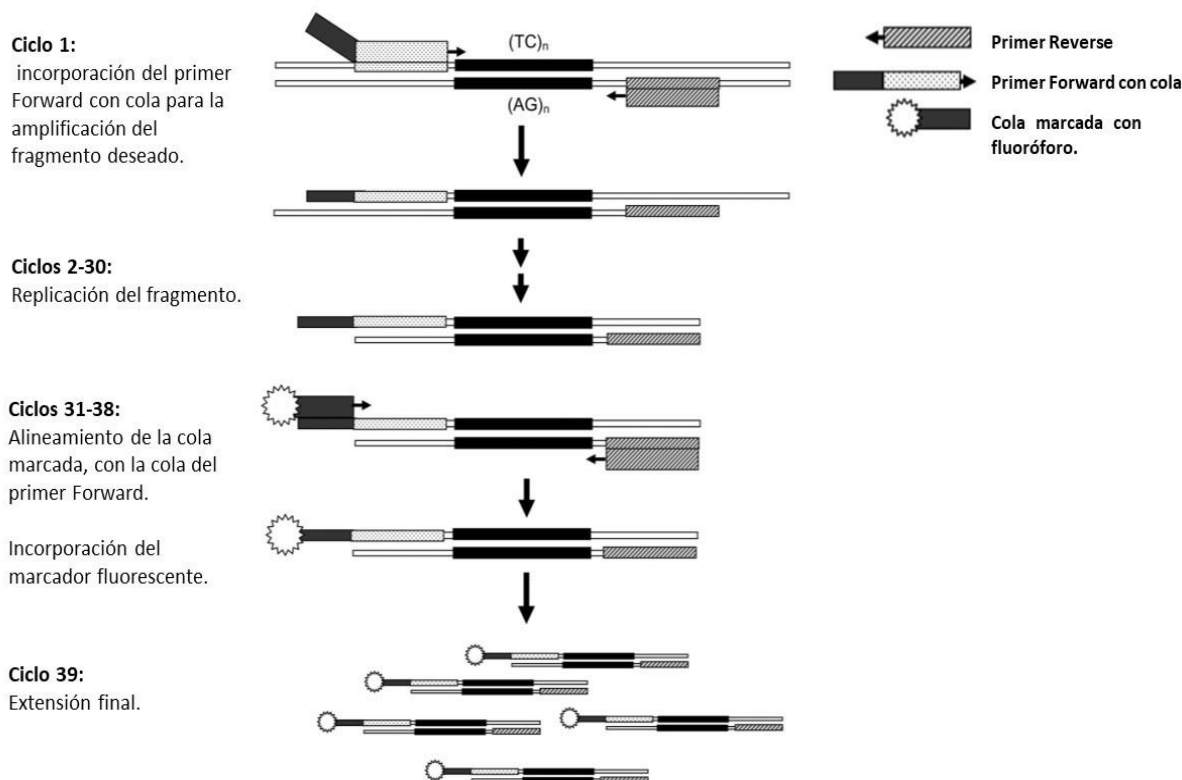


Figura 5. Diagrama de marcado con fluorescencia de microsatélites. (Adaptada de Culley *et al.*, 2013: Fig. 1).

Para cada colonia de anidación se utilizaron protocolos de amplificación con algunas variantes, los cuales se describen a continuación.

7.4.1. Amplificación de microsatélites para la colonia de El Verde

Para la colonia de Anidación de El Verde, se utilizó el protocolo amplificación de microsatélites marcados con fluorescencia propuesto por Arruda *et al.* (2010), quienes sugieren el uso del primer universal M13 (-21) (TGTAACGACGGCCAGT), una secuencia derivada de un bacteriófago que infecta a *Escherichia coli*, la cual presenta nula o poca homología con los genomas conocidos actualmente; este hecho reduce amplificaciones inespecíficas principalmente para genomas pequeños, los cuales puedan resultar en interpretaciones erróneas de los resultados. El uso de esta técnica tiene ventajas sobre otros protocolos porque provee la habilidad de trabajar únicamente con la cola M13, lo que evita la necesidad de usar diversas secuencias para el proceso de marcaje fluorescente. Así, para múltiples propósitos, la única condición necesaria es cambiar los tintes fluorescentes para marcar los diferentes productos de PCR de cada microsatélite. Arruda *et al.* (2010) proponen para este protocolo, la amplificación de diversos marcadores mediante reacciones “simplex”; método que implica la preparación de n reacciones individuales o “simplex” para los n loci que se desee amplificar. Posteriormente los productos resultantes de cada reacción “simplex” se mezclan en un mismo tubo. De esta manera se finaliza con una

sola reacción que contienen todos los loci amplificados de manera individual, cada uno etiquetado con su respectivo dye (Figura 6, ejemplo para la amplificación de 4 loci).

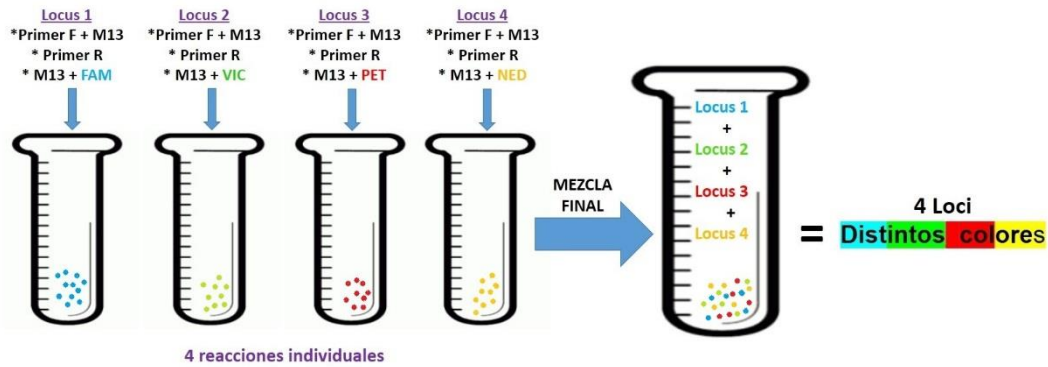


Figura 6. Reacción "simplex" para el análisis de 4 loci.

Para el estudio de la colonia de anidación de El Verde, se amplificaron 10 microsatélites dinucleótidos de la serie OR de Aggarwal *et al.* (2004), distribuidos en dos paneles de estudio: OR20, OR22, OR11, OR16 y OR14 asociados al panel 1 (Tabla 1) y OR9, OR7, OR1, OR2 y OR4 asociados al panel 2 (Tabla 2). La cola M13 fue marcada con cuatro fluoróforos en su extremo 5': FAM, VIC, PET y NED.

Los microsatélites se fueron amplificados, en reacciones de PCR de 10 μ l que contenían 2 μ l de dH₂O (*Milli-Q estéril*), 4 μ l de dNTPs, 1.5 μ l de 10x PCR buffer (1.5 mM MgCl₂) 0.3 μ l de Primer forward + cola M13 (10 Mm), 0.3 μ l de Primer reverse (10 Mm), 0.1 μ l de Taq y 1.4 μ l del template de ADN.

Tabla 1. Panel de estudio 1 para el análisis de paternidad múltiple de *Lepidochelys olivacea*, en El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa.

Dye	lus	cola 5'	F/R	Primer sequence (5' - 3')	Tm	%GC	long	pb
FAM	OR-20	M13	F	TGTAAAACGACGGCCAGTTCACGAACATCAGCAAATTATT	57.31	30	23	110 - 124†
			R	GTCCCATCCCCTCCACCA	62.58	67	18	
FAM	OR-22	M13	F	TGTAAAACGACGGCCAGTAAGTCCTGTTGAATCCTGCCATAG	61.46	46	24	217 - 247†
			R	GGTTAGATATAGGAGGTGCTGATGTTA	58.94	41	27	
VIC	OR-11	M13	F	TGTAAAACGACGGCCAGTTGAGCACTGCAAATGGAGGATGGT	67.72	50	24	182 - 242†
			R	AGTGCCTGATTCTTCGAGTTGCTGAG	66.79	50	26	166 - 204*
PET	OR-16	M13	F	TGTAAAACGACGGCCAGTCAAGGTTAGATATAGGAGGTGCTGATGT	61.82	43	28	220 - 252†
			R	CCTGCTTTGAATCCTGCCATAGTAATC	64.68	44	27	136 - 264*
NED	OR-14	M13	F	TGTAAAACGACGGCCAGTAGTGCCAGGGAGGGTGATTG	63.12	60	20	147 - 201†
			R	CCCTGAGTTTTTCTGTTTCCCCTA	62.46	46	24	116 - 200*

† Información reportada por Aggarwal *et al.* (2004).

*Información obtenida en nuestro laboratorio para la colonia de El Verde.

Tabla 2. Panel de estudio 2 para el análisis de paternidad múltiple de *Lepidochelys olivacea*, en El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa.

Dye	locus	cola 5'	F/R	Primer sequence (5' - 3')	Tm	%GC	long	pb
FAM	OR-7	M13	F	TGTA AACGACGGCCAGTGGGTTAGATATAGGAGGTGCTTGATGT	61.7	44	27	185 - 219†
			R	TCAGGATTAGCCAACAAGAGCAAAA	63.88	40	25	
FAM	OR-9	M13	F	TGTA AACGACGGCCAGTGCCCCACCGAGGACAAAAG	66.74	65	20	150 - 174†
			R	TTTTCACTCAACCTGTAATCCACCTCAT	64.62	39	28	
VIC	OR-1	M13	F	TGTA AACGACGGCCAGTTCCCCTTGTTCTGAAATCCTATGA	64.6	42	26	150 - 202†
			R	CAGGCATAGGGAAAAATCAGAGGTA	62.4	44	25	212 - 244*
PET	OR-2	M13	F	TGTA AACGACGGCCAGTGCTCCTGCATCACTATTTCTGTT	61.59	46	24	153 - 185†
			R	TGCTGCCCCACACCCTCTG	69.72	70	20	162 - 198*
NED	OR-4	M13	F	TGTA AACGACGGCCAGTAGGCACACTAACAGAGAACTTGG	58.44	48	23	122 - 172†
			R	GGGACCCTAAAATACCACAAGACA	61.07	46	24	144 - 186*

† Información reportada por Aggarwal *et al.* (2004).

*Información obtenida en nuestro laboratorio para la colonia de El Verde.

El programa de termociclador que fue utilizado es una adaptación del programa de PCR de dos pasos empleado en el laboratorio del Dr. Axayacatl Rocha, el cual es detallado en la Tabla 3. Durante la ejecución de este programa, se siguió la recomendación sugerida por Arruda *et al.* (2010), que consistió en pausar el proceso de la PCR en los últimos 10 ciclos, momento en el cual se agregó a cada una de las reacciones el primer M13 marcado con los distintos fluoróforos; este paso resulta en una optimización considerable de la amplificación, la cual se logra debido a que en las ciclos finales existe poca competencia entre los primers y por ende el primer universal tiene poco tiempo para generar amplificaciones inespecíficas, debido a ello su uso se limita solamente a marcar con fluorescencia los fragmentos amplificados.

Tabla 3. Programa de termociclador utilizado para la amplificación de los microsatélites de la serie OR de Aggarwal *et al.* (2004), para la colonia de anidación de El Verde.

Programa PCR de 2 pasos			
ciclos	etapa	tiempo	temperatura
1	Desnaturalización	2 min	94°C
27	Desnaturalización	20 s	94°C
	acoplamiento	45 s	62 °C
	extensión	60 s	72°C
8	Desnaturalización	20 s	94°C
	acoplamiento	45 s	53 °C
	extensión	60 s	72°C
1	extensión final	10 min	72°C
pausa	soak	inf	4°C

7.4.2. Amplificación de microsatélites para la colonia de Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa

Para el estudio de la colonia de anidación de Las Cabras, inicialmente los microsatélites empleados fueron amplificados mediante reacciones “simplex”. En este caso, tras diversas pruebas de efectividad se seleccionaron dos microsatélites dinucleótidos de la serie OR de Aggarwal *et al.* (2004): OR4 y OR11, mismos que también fueron empleados para la colonia de anidación de “El Verde”, sin embargo, en este caso se hizo uso de dos colas distintas: CAG (CAGTCGGGCGTCATCA) y T7 (TAATACGACTCACTATAGGG), las cuales fueron marcadas con los dyes FAM y NED, respectivamente.

Para la técnica “simplex”, los marcadores fueron amplificados mediante reacciones de PCR de 12.5 µl que contenían 6.9 µl de H₂O destilada, 1.3 µl de dNTPs, 0.5 µl de MgCl₂, 0.3 µl de Primer forward + cola (0.05 µM), 0.1 µl de primer reverse (0.2 µM), 0.1 µl de la cola marcada (0.2 µM), 1.3 µl de 10x PCR buffer, 0.1 µl de Taq y 2 µl de template de ADN.

No obstante, con la finalidad de economizar tiempo, así como recursos materiales y monetarios, se buscó la amplificación de un mayor número de microsatélites por medio de kits para reacciones de PCR “multiplex” con la metodología propuesta por Culley, *et al.*, 2013. Esta técnica permite analizar múltiples loci en una misma reacción de PCR mediante el uso de distintos primers universales o “colas” etiquetadas con diferentes tintes fluorescentes (FAM, VIC, PET, NED etc.). Este proceso en comparación con la PCR convencional reduce la cantidad de reactivos necesarios y el tiempo de preparación de cada reacción individual (Figura 7, ejemplo para la amplificación de 4 loci).

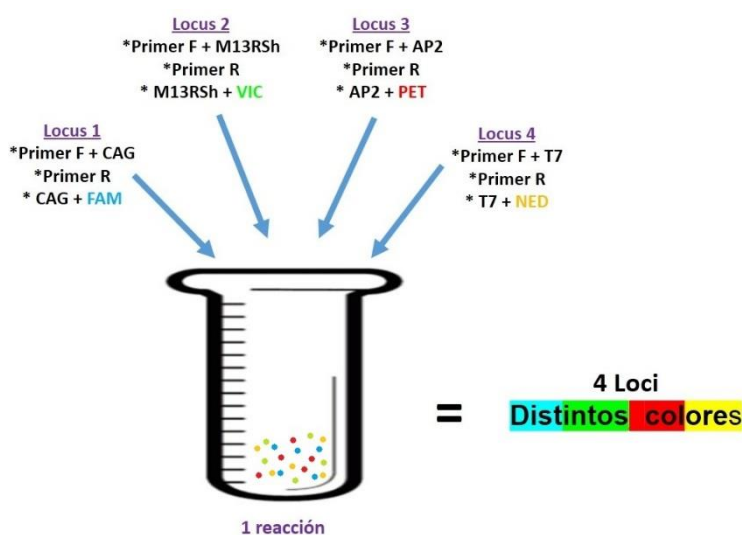


Figura 7. Reacción "Multiplex" para el análisis de 4 loci.

Para las PCR Multiplex se probaron mezclas variadas, que iban desde dos hasta seis tripletes de primers por reacción, sin embargo, tras diversos ensayos los mejores resultados se obtuvieron con la mezcla de dos marcadores. En base a esto se seleccionaron los dos microsatélites con los que se obtuvo la mejor amplificación en pareja: Cc7D04 y Cc1G02, pertenecientes a la serie Cc de marcadores tetranucleótidos de la de Shamblin *et al.* (2008). Para estos marcadores las colas empleadas fueron CAG (CAGTCGGGCGTCATCA) y M13RSh (GGAAACAGCTATGACCAT). En nuestro caso, estos oligos fueron marcados con los dyes FAM y VIC, respectivamente en su extremo 5'.

Para la técnica multiplex los microsatélites fueron amplificados con el QIAGEN® Multiplex PCR kit (QIAGEN), en reacciones de PCR de 10 µl que contenían 5 µl de Multiplex PCR Master Mix, 1 µl de Primer Mix (compuesto de 0.5 µM del primer forward + cola, 2 µM del primer reverse y 2 µM de la cola marcada con fluorescencia para cada triplete), 2 µl de H₂O y 2 µl del template de ADN.

Los productos obtenidos de ambas técnicas fueron mezclados en un mismo tubo. De tal forma, para la colonia de anidación de Las Cabras, el panel de estudio quedó conformado por dos microsatélites de la serie OR y dos microsatélites de la serie Cc (Tabla 4); amplificado con una combinación de los métodos “simplex” y “multiplex”.

Tabla 4. Panel de estudio para el análisis de paternidad múltiple de *Lepidochelys olivacea*, en Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.

Dye	locus	cola 5'	F/R	Primer sequence (5' - 3')	Tm	%GC	long	pb +
FAM	OR-4	CAG	F	CAGTCGGGCGTCATCA AGGCACACTAACAGAGAACTTGG	58.44	48	23	122 - 172 †
			R	GGGACCCTAAAATACCACAAGACA	61.07	46	24	144 - 180 *
NED	OR-11	T7	F	TAATACGACTCACTATAGGG TGAGCACTGCAAATGGAGGATGGT	67.72	50	24	182 - 242 †
			R	AGTGCCTGATTCTTCGAGTTGCTGAG	66.79	50	26	216 - 260 *
FAM	CcP7D04	CAG	F	CAGTCGGGCGTCATCA TGAGCAAAGTAACCCTAACA	52.07	40	20	336 - 418 †
			R	GTTTGGAGCCAAATTAGAGATCAAC	60.17	40	25	342 - 410 *
VIC	Cc1G02	M13RSh	F	GGAAACAGCTATGACCAT AGGTGCCTAACATTGATAGT	51.71	38	21	262 - 322 †
			R	GTTTATACTGTGCTCTTTCGTGTAAT	56.06	35	26	274 - 374 *

† Información reportada por Shamblin *et al.* (2008).

*Información obtenida en nuestro laboratorio para la colonia de Las Cabras.

Por otro lado, en relación con los ciclos de temperatura, para los marcadores de cada serie (OR y Cc) se emplearon distintos programas de termociclado que consistieron en una modificación del programa de PCR de dos pasos descrito por Shamblin *et al.* (2008), el cual utiliza un método “touchdown” para el primer paso; esta variante se basa en la utilización de una temperatura de hibridación decreciente a lo largo de ciclos sucesivos; su objetivo es generar un producto muy específico en los primeros ciclos y tener un mayor rendimiento en los últimos. La configuración dos pasos promueve la incorporación inicial del primer forward con cola aumentando la temperatura de anillamiento para el primer conjunto de ciclos de la reacción de PCR. Posteriormente la temperatura de alineamiento se reduce en el segundo conjunto de ciclos para facilitar el alineamiento de la cola marcada con el fluoróforo. Este arreglo de la temperatura es esencial para que el primer forward con cola se incorpore antes que la cola con fluorescencia (Schuelke, 2000).

El número de ciclos y las temperaturas empleadas para la amplificación de los microsatélites de la serie OR y Cc son detalladas en la Tabla 5 y Tabla 6, respectivamente.

Tabla 5. Programa de termociclador utilizado para la amplificación de los microsatélites de la serie OR de Aggarwal *et al.* (2004), para la colonia de anidación de Las Cabras.

Programa PCR de 2 pasos con “touchdown” serie OR			
ciclos	etapa	tiempo	temperatura
1	Desnaturalización	5 min	95°C
20	Desnaturalización	20 s	95°C
	acoplamiento	20 s	65 °C (↓0.5°C/ciclo)
	extensión	30 s	72°C
20	Desnaturalización	20 s	95°C
	acoplamiento	30 s	55 °C
	extensión	30 s	72°C
1	extensión final	10 min	72°C
pausa	soak	inf	4°C

Tabla 6. Programa de termociclador utilizado para la amplificación de los microsatélites de la serie Cc de Shamblyn et al. (2008), para la colonia de anidación de Las Cabras.

Programa PCR de 2 pasos con "touchdown" serie Cc			
ciclos	etapa	tiempo	temperatura
1	Desnaturalización	15 min	95°C
20	Desnaturalización	30 s	95°C
	acoplamiento	90 s	60 °C (↓0.5°C/ciclo)
	extensión	60 s	72°C
20	Desnaturalización	20 s	95°C
	acoplamiento	30 s	50 °C
	extensión	30 s	72°C
1	extensión final	30 min	60°C
pausa	soak	inf	4°C

Finalmente, una vez amplificados los paneles de estudio de ambas colonias de anidación, los productos de PCR fueron enviados a *Macrogen* (Seúl, Corea del Sur), en donde llevaron a cabo el análisis de fragmentos de ADN, servicio conocido en la compañía como Genescan Service.

7.5. Genotipificación

Una vez que en los laboratorios de Macrogen se concluyó el análisis de fragmentos, los archivos brutos del secuenciador de cada colonia fueron ingresados a la versión gratuita de GeneMarker 2.6.7 (SoftGenetics) para llevar a cabo la genotipificación de los individuos muestreados.

Con el fin de identificar errores potenciales de genotipificación, como presencia de alelos nulos, pérdidas alélicas (*allelic dropout*) y errores por amplificación (*stuttering*), las bases de datos generadas con el uso de GeneMarker fueron ingresadas a MicroChecker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). MicroChecker, usa información proveniente de los microsatélites para estimar la frecuencia de alelos nulos por locus; este cálculo lo realiza con los métodos de Oosterhout (Van Oosterhout *et al.* 2004), Chakraborty (Chakraborty *et al.* 1992) y Brookfield (Brookfield 1996), y para hacerlo ejecuta 10,000 aleatorizaciones. Este mismo software fue utilizado para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg y la heterocigosidad en los loci analizados.

Para cada colonia de reproducción se generó un archivo de frecuencias alélicas a partir de los genotipos compuestos de los individuos muestreados.

7.6. Análisis estadístico

7.6.1. Cálculo de $P_{(ID)}$ y Probabilidad de exclusión

Posteriormente a la genotipificación, se estimó la probabilidad de Identidad entre genotipos $P_{(ID)}$ (Waits *et al.*, 2001), cuya función es calcular la probabilidad de que dos o más individuos tomados al azar de una población tengan el mismo genotipo en múltiples loci. Este estimador teórico se usa cada vez más para tener una mayor confianza estadística para la identificación de individuos (Reed *et al.* 1997; Kohn *et al.* 1999; Mills *et al.* 2000; Waits y Leberg 2000) y para cuantificar los niveles de diversidad genética en poblaciones naturales (Jamieson 1965; Paetkau y Strobeck 1994). Las fórmulas utilizadas para calcular $P_{(ID)}$ se muestran a continuación:

$$P_{(ID)} = \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde p_i y p_j son las frecuencias del i -ésimo y j -ésimo alelo y $i \neq j$ (Paetkau y Strobeck 1994).

$$P_{(ID) \text{ sin sesgo}} = \frac{n^3 (2a_2^2 - a_4) - 2n^2 (a_3 + 2a_2) + n(9a_2 + 2) - 6}{(n-1)(n-2)(n-3)} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde n es igual tamaño de la muestra, a_i es igual a $\sum p_j^i$ y p_j es la frecuencia de j -ésimo alelo (Paetkau *et al.* 1998).

La ecuación 1 es una fórmula sesgada porque no corrige las diferencias del tamaño de la muestra, mientras que la ecuación 2 es una fórmula sin sesgo con una corrección del tamaño de la muestra. La $P_{(ID)}$ fue calculada para cada locus y después cada resultado multiplicado entre loci del de mayor valor de heterocigosidad esperada (H_e) al de menor valor, para así obtener la $P_{(ID)}$ total.

Una vez estimada la $P_{(ID)}$, se hizo uso de GERUD 2.0 (Jones, 2005), para calcular la probabilidad de exclusión de padres putativos, es decir, la probabilidad de excluir correctamente a presuntos padres entre un conjunto de crías. GERUD 2.0 calcula este estadístico de acuerdo con la ecuación de Dodds *et al.* (1996) y lo hace individualmente para cada locus, así como para el conjunto de loci, bajo tres escenarios distintos: un genotipo parental conocido con certeza y uno desconocido, ningún genotipo parental conocido y ambos genotipos parentales conocidos. El único requerimiento del software para realizar este cálculo es el ingreso de un archivo de frecuencias alélicas de la población analizada bajo los loci de interés.

7.6.2. Análisis de paternidad

Con la finalidad de tener una visión preliminar de la incidencia de paternidad múltiple dentro de cada nido, se realizó un ejercicio manual en el cual se hizo un análisis de los alelos presentes en cada locus. Dado que el genotipo materno fue conocido mediante la genotipificación en GeneMarker, se identificó la contribución alélica de las madres en los genotipos de las crías y los alelos restantes se infirieron como alelos paternos. En los casos en donde se encontraron más de dos alelos paternos distintos, se dedujo la presencia de más de un padre. De este modo, de 3 a 4 alelos distintos entre las crías significaron la presencia de 2 padres, de 5 a 6 alelos presencia de 3 padres, de 7 a 8 alelos la presencia de 4 padres y así sucesivamente. Para deducir la presencia de paternidad múltiple este patrón tuvo que repetirse en por lo menos en dos loci.

Para calcular de manera más exacta el número de padres por nidada, la base de datos de cada colonia se analizó mediante tres programas, los cuales utilizan enfoques estadísticos distintos para calcular el número de padres presentes en una colonia de reproducción.

Primeramente, la base de datos se ingresó a GERUD 2.0; en donde para cada hembra y sus crías se establecieron primero todos los alelos paternos y después se determinaron todas las posibles combinaciones de genotipos paternos a partir de los genotipos de la descendencia. Dentro del software se estableció el parámetro para el número máximo de padres cinco y para cada individuo se examinaron los paneles de estudio de sus respectivas colonias. En GERUD se ejecutó una corrida por cada nidada, que incluyó los datos del genotipo de la madre, el genotipo de las crías y las frecuencias alélicas de la población.

El segundo software utilizado fue COLONY 2.0.6.4 (Wang, 2004). Este software usa un algoritmo de máxima verosimilitud que incorpora el genotipo compuesto de cada descendiente y los genotipos paternos que reconstruye; con esto asigna grupos de "hermanos completos", es decir, crías que comparten a la misma madre y al mismo padre. Los cálculos de COLONY incluyen la posibilidad de dos clases de error: alelos nulos (Clase I) y errores de escritura y mutaciones (Clase II).

COLONY analiza en una misma corrida el genotipo de todas las madres y las crías muestreadas de una colonia, sin importar si éstas están emparentadas o no. De tal forma, este software es capaz de detectar en una sola ejecución si un macho se repite como padre en las nidadas de diferentes hembras.

La base de datos de ambas poblaciones fue corrida tres veces en COLONY como “proyectos de análisis de datos empíricos independientes”; cada población se analizó bajo el supuesto de un sistema de apareamiento poligámico y sin endogamia; las corridas se ejecutaron con el número máximo de iteraciones permitidas por el programa (denominado corrida de longitud muy larga) y con el máximo nivel de precisión para los resultados, además se utilizó la activación por defecto de una función denominada dentro del software como “*Sibship size scaling*”, la cual evita que un grupo grande de hermanos completos se fraccione erróneamente en dos grupos; para la operación de esta función, COLONY hace uso de la base de datos de frecuencias alélicas y tasas de error por locus. Para los errores de Clase I utilizó una tasa de 0, en consideración de los resultados obtenidos en la prueba de detección de alelos nulos realizada en MicroChecker, los cuales fueron negativos para todos los loci analizados. No obstante, con el objetivo de valorar la precisión de los resultados, cada corrida se ejecutó con variaciones en algunos de los parámetros de entrada que el software requiere para la configuración de un proyecto. Los parámetros de entrada solicitados y para los que se aplicaron estas variaciones fueron:

- tasa de errores por escritura y mutaciones (Clase II)
- Umbral de desajuste: para esta función se utiliza un número entero en el rango de 0 al número de loci analizados. Una vez que el software ha determinado parejas de hermanos que comparten al mismo padre, utiliza este umbral para determinar si el par de genotipos multilocus muestra desajustes (incompatibilidad mendeliana) mayor al valor asignado, de ser así rechaza esta presunta relación de hermanos paternos.

En la Tabla 7 se resumen las variaciones aplicadas en la configuración de entrada para las tres corridas realizadas en COLONY.

Tabla 7. Variación de los parámetros de configuración de las corridas realizadas en COLONY 2.0.6.4.

Corrida	Error Clase II	Mismatch threshold
a	0.0001	0
b	0.001	0
c	0.001	#Loci

Finalmente, con el propósito de respaldar y complementar los resultados de paternidad múltiple el tercer software utilizado fue DADSHARE (W. Amos, disponible en:

<http://www.zoo.cam.ac.uk/zoostaff/amos/>). DADSHARE es un programa escrito como una macro de Excel, el cual analiza en una misma ejecución el genotipo de todos los individuos muestreados; para esto toma los genotipos maternos asociados con la descendencia y deduce alelos paternos. Posteriormente, calcula la relación entre todas las comparaciones por pares y utiliza el método de agrupamiento UPGMA para generar un dendrograma que vincula a grupos de individuos con el mismo padre.

Para calcular el número total de padres por nidada, una vez que se obtuvieron los resultados de todos los programas, éstos se agruparon y se calculó la moda, siguiendo la recomendación propuesta por Howe *et al.*, 2017, quienes estimaron la incidencia de paternidad múltiple en una colonia de tortuga boba, *Caretta caretta*, en el sudeste de Queensland, Australia, y utilizaron este estadístico para establecer un consenso del número de padres por nidada en base a los resultados ofrecidos por los tres mismos programas utilizados en este estudio.

Simultáneamente al análisis de paternidad múltiple de cada colonia, los genotipos paternos fueron reconstruidos a partir de los genotipos de las crías en COLONY. El software está diseñado para asignar un porcentaje de probabilidad al genotipo paterno reconstruido en cada locus. Esta información sirvió para calcular la probabilidad global con el conjunto de loci empleados para cada colonia.

7.6.3. Proporción de crías engendradas por padre/nido

Una vez establecido el número total de padres por nido, se calculó la proporción de crías engendradas por cada padre en las nidadas donde se detectó paternidad múltiple, para esto se dividió el número de crías engendradas por padre entre el número total de crías muestreadas; posteriormente para cada colonia se creó un histograma de frecuencias el cual permitió observar si un macho dominante llevaba la delantera sobre las fertilizaciones o si bien los distintos machos presentes en cada nidada engendraban un número de crías equitativo.

Consecutivamente una vez obtenidas las frecuencias de cada padre por nidada se procedió a estimar la “diversidad del N de padres por nido”, la cual fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Diversidad del N de padres/nido (DNM)} = 1 - \sum(\text{Frec. de cada padre/nido})^2.$$

7.6.4. Análisis de poliginia

Con la finalidad de enriquecer el análisis de paternidad múltiple, así como de tener un resultado más concreto del número de machos activos en estas colonias de

reproducción, se realizó un análisis de la poliginia, es decir, se probó la posibilidad de que un mismo macho engendrara crías de más de una hembra de la colonia.

La poliginia se verificó mediante la comparación de todos los genotipos paternos generados por COLONY para cada nidada. Los genotipos se compararon primero en cada locus por separado y, en los casos donde hubo coincidencias, se examinó el genotipo compuesto de los padres sospechosos.

Como complemento a los resultados de COLONY, para este análisis también se hizo uso de la información generada por DADSHARE, puesto que el software también es capaz de identificar en una misma ejecución si un macho repite paternidad con distintas hembras (sin embargo, no reconstruye los genotipos paternos).

Debido a que para algunas de las hembras de la colonia de anidación de El Verde se contaban con muestras de crías provenientes de más de una nidada, el análisis de la poliginia se realizó desde dos enfoques:

- Número de hembras fertilizadas por macho
- Número de nidadas engendradas por macho

El primer enfoque tuvo por objetivo analizar si un macho fertilizó a distintas hembras de la colonia; para lo cual se contabilizó el número de madres distintas de las crías asignadas a cada padre. Por otro lado, el objetivo del segundo enfoque fue estimar el número total de nidadas (incluidas nidadas de una misma hembra) engendradas por cada padre; para tal fin se contabilizó el número de nidadas distintas de las cuales provenían las crías asignadas a cada padre.

En el caso de la colonia de reproducción de Las Cabras, la poliginia se analizó únicamente desde el primer enfoque, debido a que las hembras de esta colonia solo anidaron una vez en la temporada.

7.6.5. *Calculo de la proporción sexual operativa*

Una vez concluido el análisis de poliginia, se contabilizó el número total de genotipos paternos reconstruidos por COLONY, eliminando los genotipos paternos repetidos que fueron encontrados entre crías de distintas nidadas; posteriormente se calculó la proporción sexual operativa, es decir, la proporción de adultos sexualmente activos en el sistema, la cual estuvo dada por la siguiente fórmula:

Proporción sexual operativa = N total de machos identificados / N hembras muestreadas.

7.7. Modelos de correlación: colonia de anidación de Las Cabras

Con la finalidad de observar el posible efecto de determinadas características biométricas de las hembras sobre estimaciones de heterocigosidad individual, así como de paternidad múltiple, las relaciones entre variables se analizaron mediante modelos de correlación, para los que se utilizaron las diferentes estimaciones realizadas para la colonia de anidación de Las Cabras.

Primeramente, se seleccionaron las variables biométricas que serían tomadas en cuenta para este análisis, entre ellas quedaron incluidas las medidas del ancho y largo curvo del caparazón (ACC y LCC, respectivamente), peso, índice de masa corporal (IGC) y número de huevos. Dentro de este rubro también se incluyó la fecha de puesta, con el propósito de analizar el posible efecto de la fecha de anidación sobre la disponibilidad de machos a lo largo de la temporada.

El segundo paso, fue calcular la heterocigosidad individual con la ayuda de GENHET v2.3, función escrita para ambiente R, que realiza 5 estimaciones de heterocigosidad individual diferentes:

- 1) Proporción de loci heterocigotos por individuo (PHt): $PHt = \text{número de loci heterocigotos} / \text{número de loci genotipificados}$.
- 2) Heterocigosidad estandarizada basada en la heterocigosidad media esperada (Hs_exp) (Coltman *et al.*, 1999): $Hs_exp = PHt / \text{heterocigosidad esperada media de loci tipificados}$.
- 3) Heterocigosidad estandarizada basada en la heterocigosidad observada media (Hs_obs): $Hs_obs = PHt / \text{heterocigosidad observada media de loci tipificados}$.
- 4) Relación interna (IR) (Amos 2001): $IR = (2H - \sum fi) / (2N - \sum fi)$, donde H es el número de loci que son homocigotos, N es el número de loci y fi es la frecuencia del i-ésimo alelo contenido en el genotipo.
- 5) Homocigosidad por locus (HL) (Aparicio 2006): $HL = \sum Eh / (\sum Eh + \sum Ej)$, donde Eh y Ej representan el número esperado en un individuo de loci homocigotos (h) y heterocigotos (j), respectivamente.

Por otro lado, las variables de Paternidad múltiple que fueron seleccionadas para este análisis fueron el número de machos con los que se dedujo que se apareó cada hembra (Nmachos) y la diversidad del N de padres por nido (DNM).

El tercer paso, fue el análisis de los datos mediante la paquetería Corrplot, librería para R, la cual permite la visualización de una matriz de correlación, a través de gráficos que incluyen el intervalo de confianza y para los que se pueden seleccionar siete posibles

opciones de diseño: “círculos”, “cuadrados”, “elipses”, “números”, “sombreados”, “colores” y “pay”. Una representación de la matriz de datos ingresada a R, se presenta en la Tabla 8. **Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Tabla 8. Matriz de datos de las hembras de la colonia de anidación de Las Cabras para el análisis de correlación con la librería Corrplot.

Hembra	Huevos	ACC	LCC	Kg	IGC	Puesta (Día del año)	PHt	Hs_obs	Hs_exp	IR	HL	NMachos	DNM
N009-M1	135	75	67	45	49	201	1	1.1	1.1	0.0	0	3	0.5
N047-M2	101	67	64	38	43	219	1	1.1	1.1	-0.2	0	6	0.6
N074-M3	126	69	62	28	22	225	1	1.1	1.1	-0.1	0	5	0.6
N123-M4	90	73	65	37	50	232	0.8	0.8	0.8	0.2	0.2	4	0.7
N198-M5	46	67	63	36	40	239	0.8	0.8	0.8	0.1	0.2	3	0.2
N310-M6	73	66	58	30	23	250	1	1.1	1.1	-0.1	0	5	0.6
N345-M7	94	69	63	35	30	254	1	1.1	1.1	-0.1	0	4	0.5
N512-M8	96	70	63	32	40	269	1	1.1	1.1	-0.1	0	7	0.8
N654-M9	107	65	72	55	52	282	1	1.1	1.1	-0.1	0	5	0.7
N657-M10	94	67	73	38	42	282	0.8	0.8	0.8	0.2	0.3	5	0.8
N706-M11	117	71	64	38	41	289	1	1.1	1.1	-0.1	0	2	0.1
N772-M12	89	68	62.5	30	37	296	1	1.1	1.1	-0.1	0	7	0.8
N828-M13	102	70	65	37	41	304	0.8	0.8	0.8	0.2	0.2	2	0.5

Una vez que Corplot arrojó el gráfico de la matriz de correlación se identificaron aquellas variables relacionadas tanto positiva como negativamente, bajo la condición de que se tratara de una variable biométrica Vs valores de heterocigosidad individual, número de machos al que cada una quedo asociada o a la diversidad del N de machos por nido. Identificadas tales relaciones, como último paso se procedió a realizar una prueba de significancia de la pendiente de la regresión, para la que se utilizó un valor alfa = 0.05.

7.8. Evaluaciones del efecto de tamaño de muestreo por bootstrap

Con el fin evaluar la confiabilidad de nuestros tamaños de muestra para la detección del número real de padres por nido; se elaboró en Excel una matriz de remuestreo mediante el método “Bootstrap”. La matriz fue construida para remuestrear un número

determinado de crías 500 veces, a partir de un conjunto de 100 crías con siete padres cuya frecuencia es equilibrada acorde a lo observado en nuestros resultados. Se realizaron 500 muestreos con tamaños de muestra de 50, 30, 20, 10, 5 y 3 crías con el propósito de estimar el efecto del tamaño de muestra sobre la veracidad del número de padres detectados.

8. Resultados

8.1. Datos de Campo: Colonia de anidación de Las Cabras

De las 18 nidadas colectadas para la colonia de anidación de Las Cabras, solo en 17 se presentó eclosión. Los huevos de la catorceava madre muestreada aparentemente no estaban fertilizados lo que fue verificado al revisarlos y corroborar que no había desarrollo embrionario.

Los datos de biometría de las madres y de las nidadas muestreadas, respectivamente se muestra en la Tabla 9 y Tabla 10.

Tabla 9. Biometría promedio de las madres muestreadas para la colonia de anidación de Las Cabras, Escuinapa, Sin. (Información del trabajo de tesis doctoral de la Cand. Dra. Yazmín Segura García).

Huevos Promedio	100
ACC Promedio	69.83
LCC Promedio	65
Kg Promedio	36.17
IGC (mm) Promedio	39.17

Tabla 10. Datos generales de las nidadas muestreadas para la colonia de anidación de Las Cabras, Escuinapa, Sin. (Información del trabajo de tesis doctoral de la Cand. Dra. Yazmín Segura García).

Madre	Fecha de Eclosión	Método de incubación	Crías vivas	Crías muertas	Total de crías muestreadas
9-M1	08/09/2016	caja	20	0	20
47-M2	30/09/2016	corral	20	0	20
74-M3	30/09/2016 - 05/10/2016	caja / corral	20	0	20
123-M4	06/10/2016	caja	20	0	20

198-M5	15/10/2016 - 20/10/2016	caja / corral	20	0	20
310-M6	26/10/2016	caja / corral	20	0	20
345-M7	30/10/2016	caja	20	0	20
512-M8	17/11/2016	corral / caja	20	0	20
654-M9	10/12/2016	corral	30	0	30
657-M10	11/12/2016	corral	20	0	20
706-M11	19/12/2016	corral	23	0	23
772-M12	28/12/2016	corral	24	2	26
828-M13	03/01/2017	corral	16	6	22
862-M14	-	-	0	0	0
878-M15	27/01/2017	corral/ playa/ caja	25	5	30
879-M16	28/01/2017	corral/ caja	4	24	28
938-M17	25/02/2017	corral/ caja	9	21	30
940-M18	25/02/2017	corral/ caja	3	27	30
TOTAL					399

8.2. Cantidad y calidad de ADN: Muestras de Las Cabras

Del material biológico obtenido de las madres, así como de las crías vivas y parte de las muertas, se obtuvo ADN de calidad aceptable, con un promedio de 410 ng/μl para las muestras de tejido de las crías y 238 ng/μl para las muestras sanguíneas de las madres, con valores promedio de A260/A280 de 1.87 para las extracciones de carapacho y aletas y 1.90 para extracciones de sangre. En el caso de muestras de ADN las proporciones de absorbancia 260/280 de ~1.8 son generalmente aceptadas para considerar el ADN “puro” (Thermo Scientific, 2010).

En las siguientes figuras se presentan fotografías de geles de agarosa con muestras de ADN de crías y madres, editadas con ImageJ, la Figura 8 comprende extracciones de ADN de sangre de las madres analizadas, mientras que la Figura 9 comprende extracciones de ADN del carapacho de las crías vivas. En general se obtuvieron mayores concentraciones de ADN de las muestras de carapacho de neonatos vivos en comparación con las muestras sanguíneas extraídas de las madres. Además de valores de pureza dentro del rango admisible, sugiere que el carapacho es una excelente opción

para el muestreo de crías vivas de tortugas marinas en estudios de genética, al ser una fuente de alta cantidad y calidad de ADN.

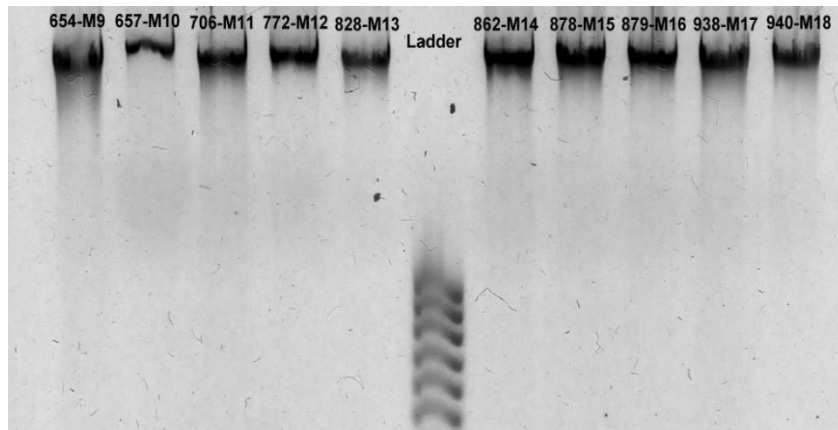


Figura 8. Electroforesis en agarosa de ADN extraído de sangre de madres de Las Cabras, Escuinapa, Sin.

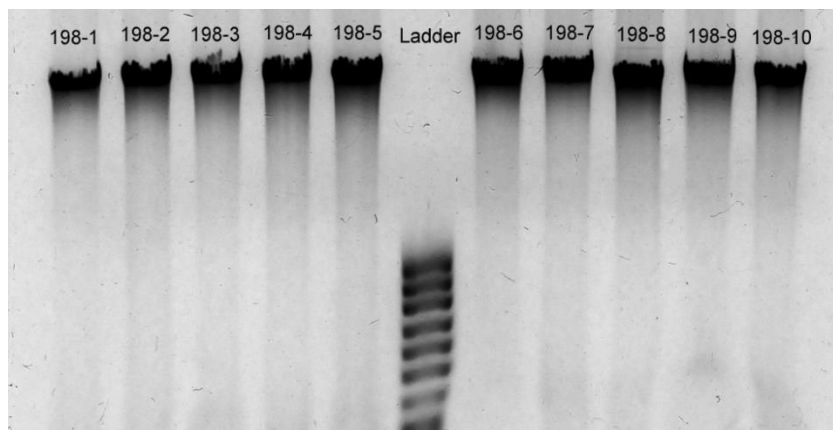


Figura 9. Electroforesis en agarosa de ADN extraído de carapacho de crías de Las Cabras, Escuinapa, Sin.

No obstante, a pesar de los buenos resultados obtenidos con la extracción de ADN de las muestras sanguíneas de madres y de carapacho de neonatos vivos; una vez ejecutadas todas las corridas de electroforesis, para 40 de las muestras obtenidas de aletas y otros tejidos de crías muertas incubadas en corral y pertenecientes a las nidadas 878, 879, 938 y 940, se observaron bandas de ADN degradado (Figura 10), además de lecturas inconstantes en Nanodrop 200c. Esto fue producto del avanzado estado de descomposición en el que se encontraban estas crías al momento de la toma de tejido; ya que se presume, las crías murieron ahogadas 2 o 3 días previos al monitoreo de los nidos dentro corral de incubación, en horas cercanas al momento de la eclosión. Esto fue el resultado de la inundación de varios nidos en el campamento de conservación provocado

por las fuertes lluvias que se presentaron en la zona sur de Sinaloa simultáneamente con las fechas de eclosión calculadas para las nidadas antes mencionadas. A esta situación se sumó la alta temperatura de la arena, lo que volvió aún más vulnerable el estado de conservación de los cadáveres de los neonatos ahogados y embriones que murieron durante las etapas de desarrollo 1 y 2.

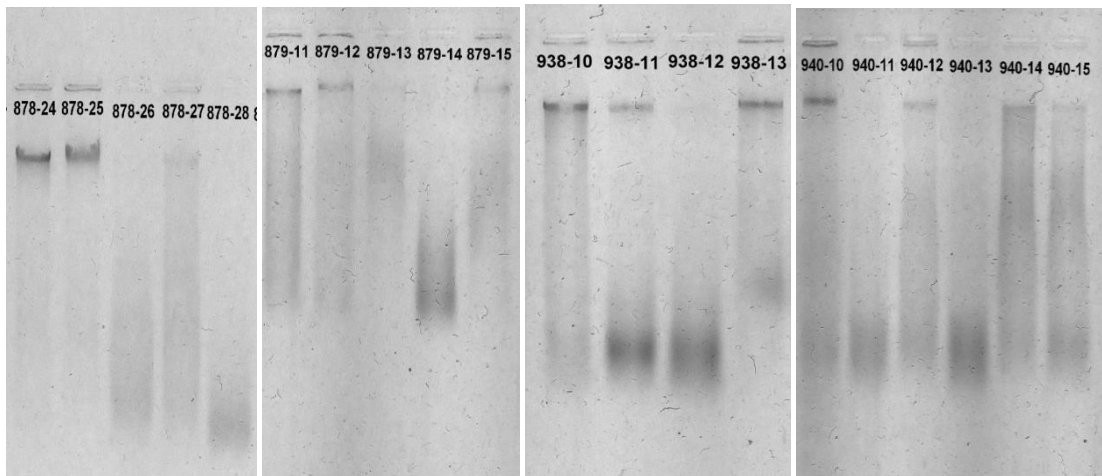


Figura 10. Bandas de ADN degradado extraído de tejidos putrefactos de crías pertenecientes a las nidadas 878, 879, 938 y 940 de la colonia de anidación de La Cabras, Escuinapa, Sinaloa.

Ante la presencia de ADN degradado en 40 de las 85 muestras colectadas de crías en estado de putrefacción, se optó por probar dos nuevos métodos de extracción de ADN como alternativa al protocolo de extracción con cloruro de litio (LiCl) de Gemmell y Akiyama (1996) (utilizado en este proyecto y con resultados eficaces para el resto de las muestras), con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de proteínas y otros contaminantes de los tejidos putrefactos, el primero fue una variación del protocolo de Gemmell y Akiyama (1996) antes mencionado, con la adición de la precipitación del pellet de ADN con isopropanol al 100%, en sustitución a la precipitación con etanol al 100%. Por otra parte, el segundo método con el que se buscó la limpieza de las muestras problemáticas fue la extracción de ADN por columnas con el *QIAamp® DNA Micro Kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Sin embargo, pese a las pruebas con dos estos nuevos protocolos no se consiguieron los resultados esperados, dado a que no se obtuvo la cantidad ni la limpieza suficiente del ADN de estos tejidos; esto fue comprobado con electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 11) y lecturas en Nanodrop 200c.

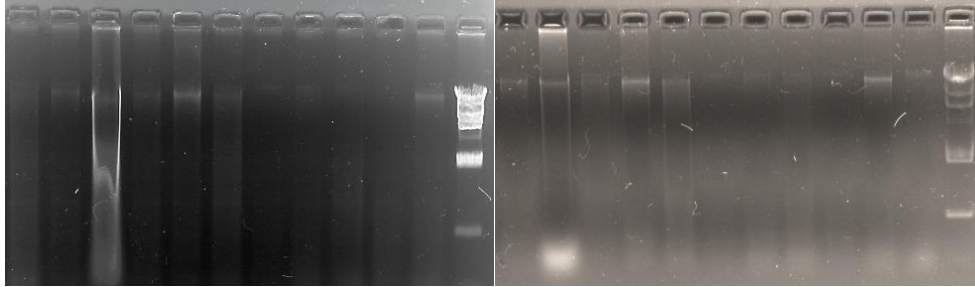


Figura 11. Prevalencia de bandas de ADN degradado para muestras de tejidos putrefactos de las muestras de Las Cabras tras la re-extracción de ADN con el QIAamp® DNA Micro Kit (QIAGEN).

Una vez que se comprobó la imposibilidad de la extracción de ADN de los tejidos putrefactos colectados, se tomó la decisión de dejar fuera de este estudio a las crías provenientes de estas nidadas, razón por la cual se concentró el esfuerzo en el procesamiento de las muestras provenientes de los nidos 9 a 828, pertenecientes a las 13 primeras hembras muestreadas para esta colonia.

8.3. Genotipificación de madres y crías

Los archivos brutos del secuenciador de las 226 muestras provenientes de El Verde (37 hembras y 189 crías) y de las 227 muestras de Las Cabras (13 hembras y 214 crías), se ingresaron a GeneMarker 2.6.7 en archivos de formato .fsa para proceder a la genotipificación.

8.3.1. El Verde

En GeneMarker 2.6.7 se pudo observar que para la colonia de El Verde los electromorfos para los loci OR20 y OR22 en panel 1 y OR9 y OR7 en el panel 2, la gama de tamaños (pb) se traslapaba. Esto representó un obstáculo para asignar los alelos en cada locus, debido a que ambas parejas de primers fueron etiquetados con el dye FAM en cada panel de estudio (Tabla 1 y Tabla 2). Este traslape impidió que los individuos pudieran ser genotipificados con dichos marcadores y, por consiguiente, fueron eliminados del análisis de paternidad múltiple. Por otra parte, para el locus OR14 perteneciente al panel 1 y marcado con el dye NED, se detectaron lecturas problemáticas en los cromatogramas de 58 muestras, debido a la presencia de ruido, así como por errores de amplificación o *stuttering*. El *stuttering* o *stutter band* son artefactos de la PCR que en algunos casos pueden llegar a confundir la interpretación de alelos reales; aparecen como un pico menor justo antes del alelo real y corresponden a una repetición menos; el proceso de formación del *stuttering* ocurre cuando una unidad de repetición queda mal emparejada y no interviene en la formación de la nueva cadena, generándose

así picos minoritarios con esta pérdida. Este fenómeno obstaculizó la genotipificación en este loci para los 58 individuos anteriormente mencionados y debido a que GERUD no acepta la entrada de datos faltantes, se tomó la decisión de eliminar también este locus del análisis. De manera que los cinco loci restantes que se incluyeron en el estudio de paternidad múltiple para El Verde fueron: OR11 y OR16 en el panel 1 y OR1, OR2, y OR4 en el panel 2.

Una vez realizadas todas las genotipificaciones con los cinco microsatélites tomados en cuenta para las pruebas de paternidad múltiple en El Verde, en los cromatogramas de 16 crías se identificaron alelos que no correspondían con los alelos maternos para uno o más loci. Por lo anterior, se consideró dejar fuera del análisis a estas crías, de modo que el número de descendientes evaluados para esta colonia quedó reducido a 173. Como se mencionó anteriormente, el número de crías analizadas por madre fue variable debido a que el muestreo de la descendencia se enfocó en la colecta de individuos con malformaciones y gemelos por nidada.

Los genotipos de las madres y las crías de El Verde son incluidos en la Tabla 22 y Tabla 23 del Anexo 2; mientras que la Tabla 11 contiene información del número de alelos distintos encontrados en cada locus para esta colonia.

Tabla 11. Número de alelos encontrados por locus para la colonia de anidación de El Verde.

Locus	No. alelos distintos
OR1	15
OR4	17
OR11	11
OR2	13
OR16	13

8.3.2. Las Cabras

Para las muestras de la colonia de anidación de Las Cabras se detectaron lecturas problemáticas para los marcadores de la serie OR en muestras pertenecientes a 102 crías, entre estas muestras en total se registraron 19 lecturas nulas para el locus OR4 y 99 para OR11, esto probablemente por amplificaciones fallidas o falta de incorporación de la marca fluorescente ya que solo se encontró ruido en los cromatogramas de tales muestras. Por otro lado, en los loci CcP7D04 y Cc1G02 se obtuvieron resultados excelentes en las lecturas de los cromatogramas lo que dio como resultado lecturas exitosas en el 87.3% de las muestras analizadas.

En contraste a la situación ocurrida con las muestras de El Verde, en los loci OR4 y CcP7D04, ambos asociados al mismo dye (FAM) para la colonia de Las Cabras, no se encontró traslape entre las gamas de tamaño (144 -180 pb y 342 - 410 pb, respectivamente) razón por la cual estos no representaron ningún inconveniente en cuanto a la superposición de picos en los cromatogramas de los individuos de esta colonia.

Para las crías de Las Cabras que no pudieron ser genotipificadas en los loci OR4 y OR11, los genotipos fueron reconstruidos con la ayuda de COLONY. En el caso de las crías, este software “rellena” la información de genotipos faltantes en base a las frecuencias alélicas de la población y al genotipo parental conocido, que en este caso fue el genotipo materno.

Tabla 12. Número de alelos encontrados por locus para la colonia de anidación de Las Cabras.

Locus	No. alelos distintos
OR4	14
OR11	19
CcP7D04	23
Cc1G02	22

Los genotipos de las madres y crías de Las Cabras se presentan en la Tabla 24 y Tabla 25 del Anexo 2, mientras que la Tabla 12 se presenta el número de alelos encontrados para cada uno de los loci analizados en esta colonia.

8.4. Prueba de errores de genotipificación

Tras una primera prueba en MicroChecker, para la colonia de anidación de El Verde, el locus OR2 mostró probabilidad de alelos nulos, sugerido por el exceso general de homocigotos para la mayoría de las clases de tamaño de alelo. Con este resultado las muestras se cargaron nuevamente en GeneMarker para hacer una re-revisión de las lecturas en este locus y hacer los ajustes necesarios mediante un binning.

Después de realizar el binning para las lecturas del locus OR2, la base de datos fue cargada por segunda vez en MicroChecker y esta vez los resultados arrojados por el software indicaron que en ninguno de los loci se evidenciaba presencia de alelos nulos además de sugerir que la población de El Verde se encontraba en equilibrio de Hardy Weinberg.

En la Tabla 13 se muestran el resumen de resultados arrojados por MicroChecker para El Verde, mientras que la Figura 12 contiene los gráficos de la frecuencia de homocigotos esperada y observada que fueron generados por el software para dos de los loci evaluados: OR11 y OR2.

Tabla 13. Resumen de resultados de MicroChecker para los cinco loci empleado para las muestras de El Verde.

Locus	Alelos nulos	Método Oosterhout	Método Chakraborty	Método Brookfield 1	Método Brookfield 2
OR11	no	0.0247	0.0241	0.0216	0.1018
OR16	no	0.0306	0.0287	0.0235	0.1269
OR1	no	-0.0038	-0.0034	-0.0032	0.1723
OR2	no	0.023	0.0177	0.015	0.1465
OR4	no	-0.051	-0.0451	-0.0441	0.0482

Conclusión:
 Ningún loci muestra evidencia de alelos nulos.
 Esta población está probablemente en equilibrio de Hardy Weinberg.

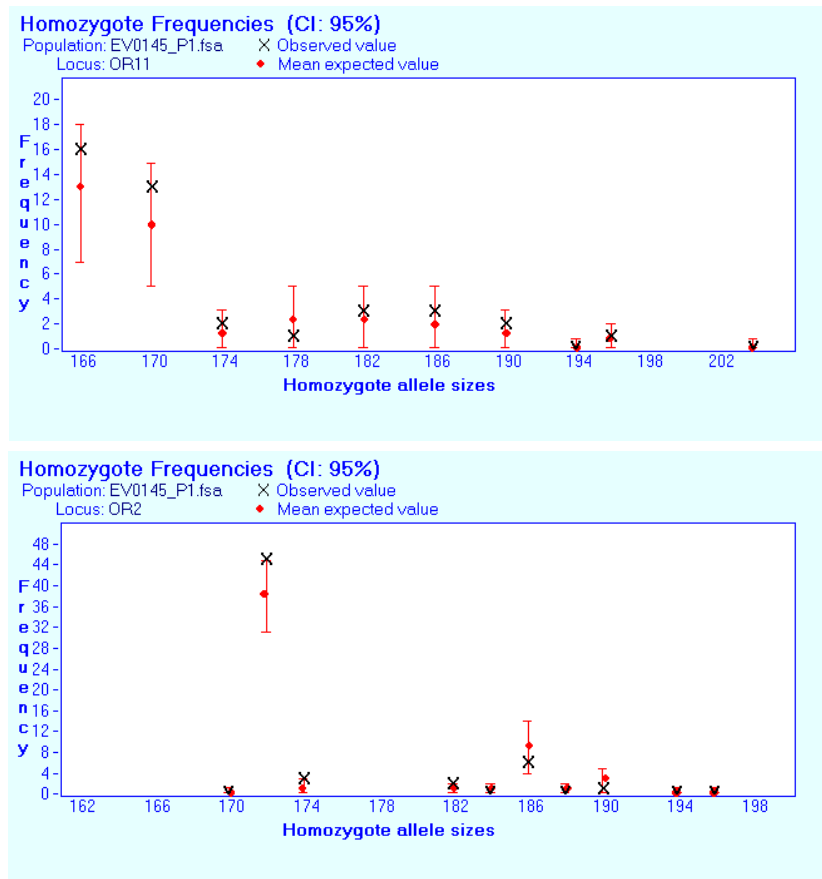


Figura 12. Comparación de frecuencias de homocigotos observadas y esperadas según MicroChecker para los loci OR11 y OR2 de la colonia de anidación de El Verde.

Por su parte, para la colonia de anidación de Las Cabras, los resultados de MicroChecker en la primera prueba mostraron que ninguno de los cuatro loci analizados

presentaba alelos nulos, además se aludió la probabilidad de que la población se encontrara en equilibrio de Hardy Weinberg. La Tabla 14 muestra el resumen de resultados arrojados por el software para esta colonia y la Figura 13 muestra los gráficos de las frecuencias de homocigotos (esperada y observada) para los cuatro loci analizados.

Tabla 14. Resumen de resultados de MicroChecker para los cuatro loci empleado para las muestras de Las Cabras.

Locus	Alelos nulos	Método Oosterhout	Método Chakraborty	Método Brookfield 1	Método Brookfield 2
OR4	no	-0.0468	-0.0434	-0.0428	0
OR11	no	-0.0404	-0.0378	-0.0371	0
CcP7D04	no	0.0124	0.0125	0.0119	0.0119
Cc1G02	no	-0.027	-0.0246	-0.0236	0

Conclusión:
Ningún loci muestra evidencia de alelos nulos.
Esta población está probablemente en equilibrio de Hardy Weinberg.

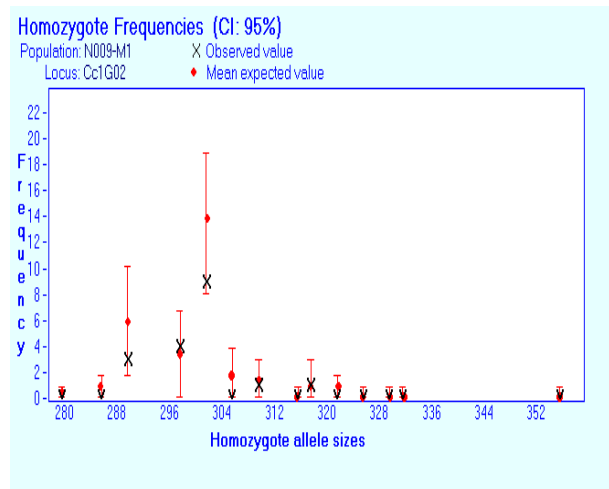
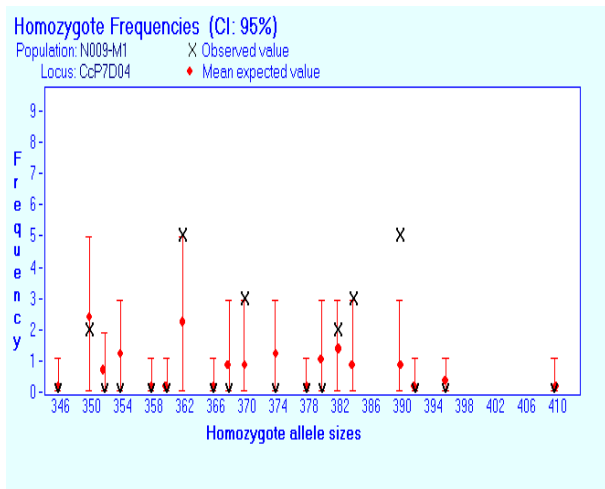
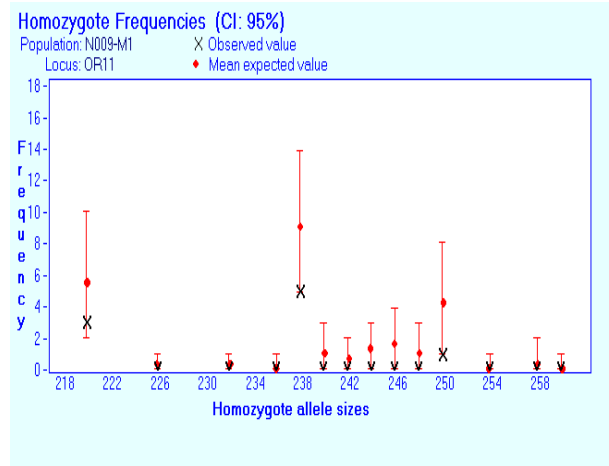
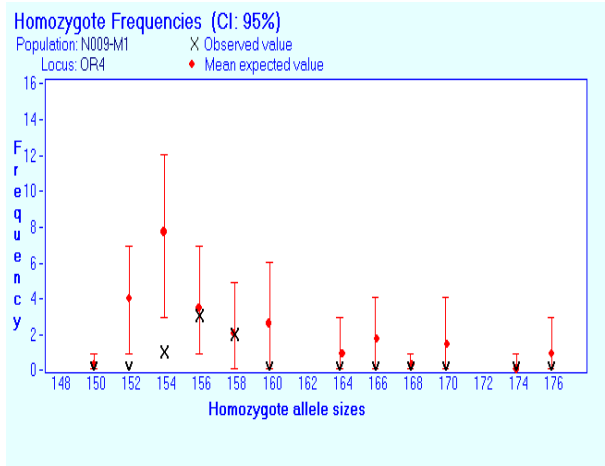


Figura 13. Comparación de frecuencias de homocigotos observadas y esperadas según MicroChecker para los loci OR4, OR11, CcP7D04 y Cc1G02 de la colonia de anidación de Las Cabras.

8.5. Probabilidad de identidad entre genotipos $P_{(ID)}$

Para calcular la probabilidad de que dos o más individuos tuvieran el mismo genotipo compuesto en los loci analizados, se estimó la probabilidad de Identidad entre genotipos $P_{(ID)}$ para cada colonia.

De acuerdo con las frecuencias alélicas para colonia de anidación de El Verde el resultado de $P_{(ID)}$ total fue de 2.313E-06, mientras que para $P_{(ID)}$ sin sesgo total fue de 1.277E-07. Los resultados de $P_{(ID)}$ y $P_{(ID)}$ sin sesgo de cada locus, así como el valor total con el uso de los cinco microsatélites analizados para esta colonia son mostrados en la Tabla 15, que también muestra los valores de heterocigosidad esperada (H_e) calculados.

Tabla 15. Valores de Probabilidad de identidad entre genotipos $P_{(ID)}$ por locus y para el conjunto de los 5 loci ($P_{(ID)}$ TOTAL) para la colonia de anidación de El Verde.

Locus	H_e	$P_{(ID)}$	$P_{(ID)}$ sin sesgo
OR1	0.904	0.033	0.017
OR4	0.876	0.052	0.027
OR11	0.851	0.071	0.038
OR2	0.757	0.134	0.082
OR16	0.731	0.140	0.093
		0.0000023	0.0000001
		$P_{(ID)}$ TOTAL	$P_{(ID)}$ sin sesgo TOTAL

Por otro lado, para la colonia de anidación de Las Cabras, los resultados de $P_{(ID)}$ total y $P_{(ID)}$ sin sesgo total fueron de 1.098E-06 y 7.298E-08, respectivamente. Los resultados obtenidos de $P_{(ID)}$ y $P_{(ID)}$ sin sesgo para cada uno de los cuatro loci analizados, así como el resultado total al ser evaluados en conjunto se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de Probabilidad de identidad entre genotipos $P_{(ID)}$ por locus y para el conjunto de los 4 loci ($P_{(ID)}$ TOTAL) para la colonia de anidación de Las Cabras.

Locus	H_e	$P_{(ID)}$	$P_{(ID)}$ sin sesgo
CcP7D04	0.937	0.01	0.007
OR4	0.893	0.04	0.020
OR11	0.891	0.04	0.021
Cc1G02	0.878	0.05	0.024
		0.0000011	0.0000001
		$P_{(ID)}$ TOTAL	$P_{(ID)}$ sin sesgo TOTAL

Una $P_{(ID)}$ dentro de un rango de 0.001-0.0001 sería suficiente baja para la mayoría de las aplicaciones forenses que requieren la identificación de individuos en poblaciones naturales (J. Coffin, S. Fain, información personal. Visto en: Waits *et al.*, 2001).

En los casos de las colonias de anidación de El Verde y Las Cabras se encontraron valores de $P_{(ID)}$ lo suficientemente bajos para asegurar distinguir entre dos o más individuos con un genotipo idéntico en los loci seleccionados para el análisis de cada colonia.

8.6. Probabilidad de exclusión

Para el caso de esta investigación en donde uno de los genotipos parentales fue conocido (materno), la probabilidad de exclusión calculada en GERUD para colonia estuvo por encima del 99%.

Con el empleo de los cinco loci tomados en cuenta para el estudio de la colonia de anidación de El Verde, la probabilidad de exclusión calculada para esta colonia fue de 0.997, lo que se traduce en una probabilidad de 99.7% de excluir correctamente a presuntos padres. Los resultados arrojados por GERUD para esta colonia son mostrados en la Tabla 17, que muestra la probabilidad de exclusión individual por locus y la probabilidad de exclusión global al agruparse los cinco loci.

Tabla 17. Valores de Probabilidad de exclusión por locus y con el conjunto de loci para la colonia de anidación de El Verde.

Probabilidad de Exclusión Esperada	
Un genotipo parental conocido, uno desconocido	
OR11	0.706
OR16	0.545
OR1	0.804
OR2	0.572
OR4	0.753
Todos los loci	0.997

Por su parte, para la colonia de Las Cabras con el uso de los cuatro loci seleccionados para el análisis de esta colonia, la probabilidad de exclusión fue de 0.999, dicho de otra manera, se estima un 99.9% de probabilidad de excluir correctamente a padres putativos en esta colonia. Los resultados de este cálculo por locus y con los cuatro loci en conjunto son reflejados en la Tabla 18.

Tabla 18. Valores de Probabilidad de exclusión por locus y con el conjunto de loci para la colonia de anidación de Las Cabras.

Probabilidad de Exclusión Esperada	
Un genotipo parental conocido, uno desconocido	
OR4	0.783
OR11	0.783
CcP7D04	0.872
Cc1G02	0.761
Todos los loci	0.999

8.7. Calidad de amplificación de primers OR vs Cc

En este estudio se encontraron diferencias claras en la calidad de amplificación usando los primers de la serie OR y Cc. Una posible explicación es que la serie de primers Cc diseñados por Shamblin *et al.* (2007) logran resolver el problema de “tartamudeo” de la amplificación por la polimerasa Taq que cataliza adiciones erráticas de un nucleótido (principalmente adenosina) a posiciones sin correspondencia en el template al extremo 3' de los productos amplificados. Este fenómeno, que es primer-específico, presenta una posible fuente de error en los estudios de genotipificación basados en el uso de microsatélites. Los reverse primers de Shamblin incorporan la secuencia GTTT en el extremo 5' conocida como *pigtail* (cola de puerco), la cual obliga la misma adición de una adenosina que si bien son inexistentes en el template asegura que la longitud de los productos es constante y por consiguiente promueve una genotipificación más precisa (Brownstein *et al.*, 1996).

En la Figura 14 se muestran los cromatogramas de algunas muestras para los loci de la serie OR; mientras que a modo comparativo la Figura 15 ilustra algunos cromatogramas para los loci de la serie Cc.

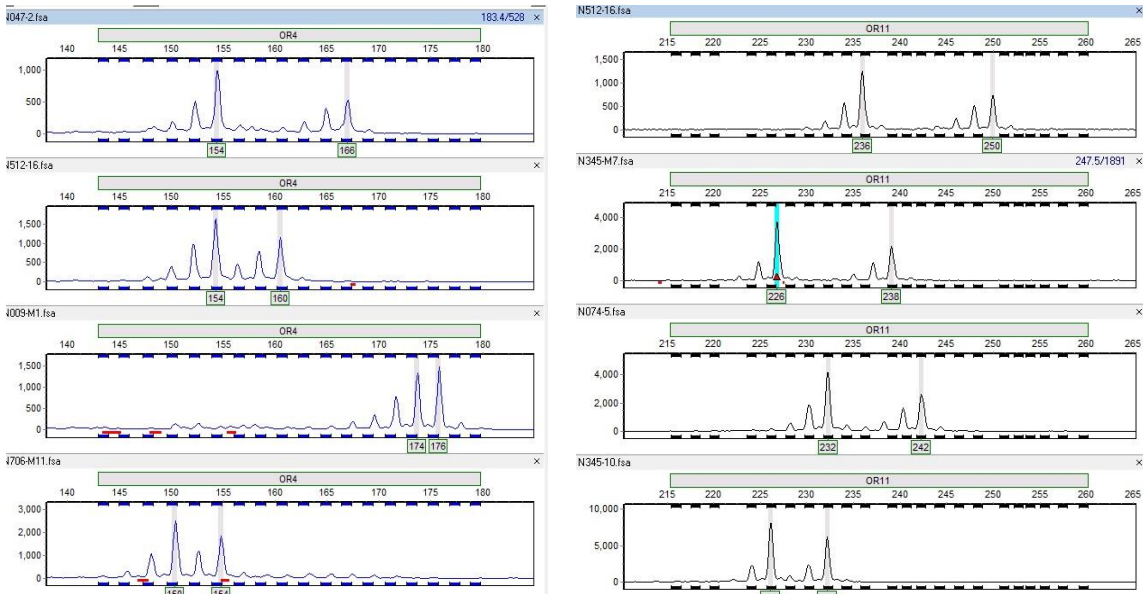


Figura 14. Cromatogramas de individuos de la colonia de anidación de Las Cabras, Escuinapa, para los loci OR4 y OR11.

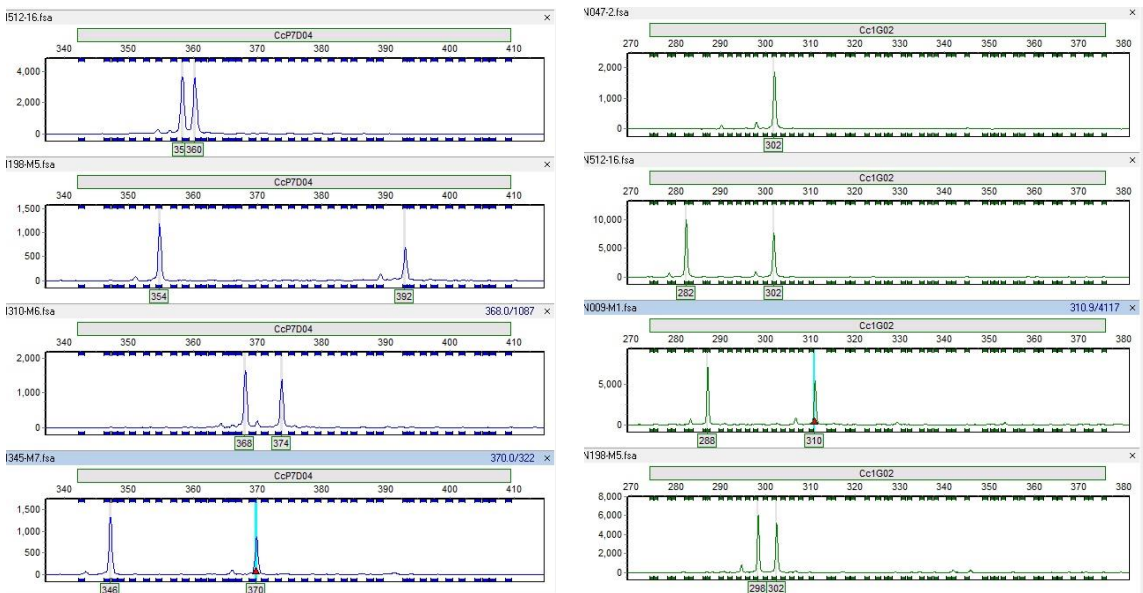


Figura 15. Cromatogramas de individuos de la colonia de anidación de Las Cabras, Escuinapa, para los loci CcP7D04 y Cc1G02.

Las diferencias son claras, los primers de la serie Cc arrojan lecturas más limpias, con picos de mejor calidad y de mayor intensidad. La escala de intensidad observada para los picos de la serie OR va de 200 – 4,000, con un promedio de 1,000; mientras que para los picos de la serie Cc va de 500 – 10,000 con un promedio de 3,000.

No obstante, estudios previos como los de Duran *et al.* (2015) y Dima *et al.* (2015) han utilizado con éxito marcadores de la serie OR para estimar la presencia de paternidad

múltiple en colonias de tortuga golfina, *L. olivacea*; por lo que aún falta definir las condiciones óptimas de amplificación en nuestro laboratorio para esta serie de primers.

8.8. Análisis de Paternidad por nidada

Debido a que los resultados generados por los tres programas propuestos para el análisis de paternidad variaron para algunas nidadas de ambas colonias, como se mencionó en la sección 7.6.2 se calculó la moda de los resultados de GERUD + COLONY + DADSHARE (siguiendo la recomendación propuesta por Howe *et al.*, 2017) para establecer un consenso del número de padres por nido y de esta manera calcular la incidencia de paternidad múltiple en estas colonias de anidación.

En total para cada colonia se realizó una corrida por nidada en GERUD (52 ejecuciones para El Verde y 13 para Las Cabras), tres corridas en COLONY con las distintas configuraciones establecidas en esta investigación y una corrida en DADSHARE.

En la Tabla 26 del Anexo 3 se presenta el resultado del número de padres por nidada arrojado por cada software así como el consenso determinado con el cálculo de la moda; mientras que en la Figura 16 se muestra la variación en el número de padres con el uso de GERUD Vs COLONY Vs DADSHARE para la colonia de El Verde. De acuerdo con GERUD el porcentaje de nidadas con dos padres no alcanza el 20%, mientras que en base a los análisis con COLONY y DADSHARE el porcentaje con dos padres fluctúa alrededor de 29 - 35%.

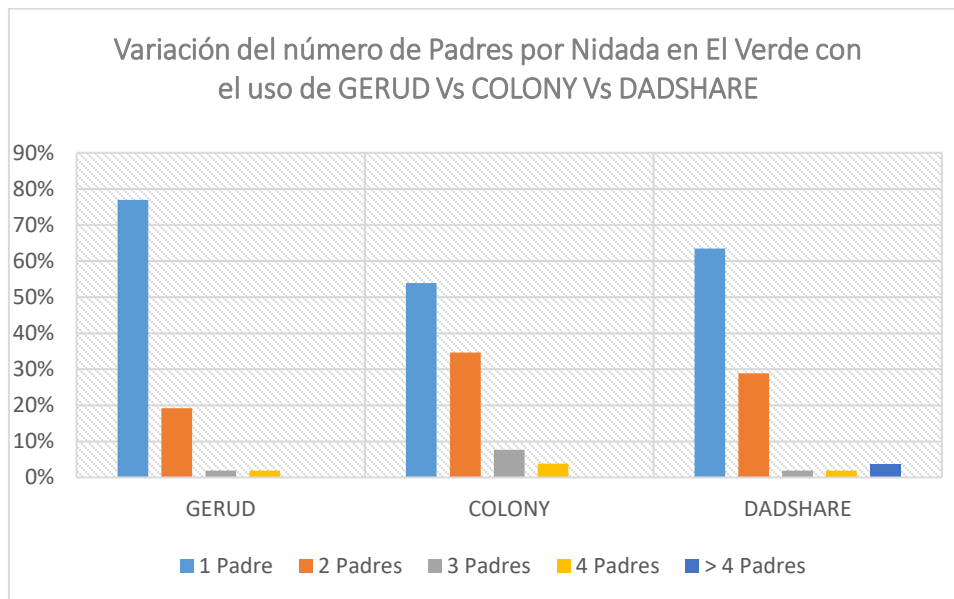


Figura 16. Variación en el resultado del número de padres para nidadas de la colonia de El Verde con el uso de GERUD Vs COLONY Vs DADSHARE.

Posteriormente a que se empleó la moda para establecer el consenso del número de padres por nidada, en El Verde se detectó la presencia de más de un padre en 24 de las 52 nidadas analizadas, lo que representa presencia de múltiples padres en el 46% de las nidadas muestreadas, 18 nidadas con dos padres (35%), cuatro con tres padres (8%) y dos con cuatro padres (2%) (Figura 17).

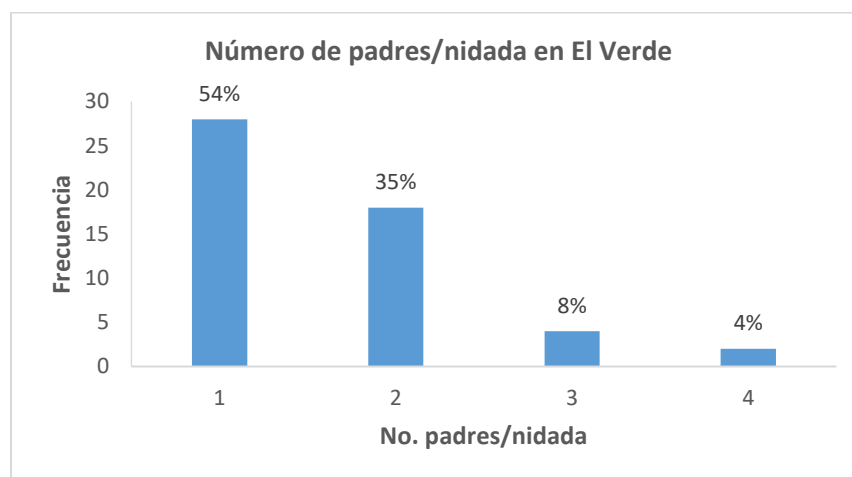


Figura 17. Número de padres por nidada en la colonia de anidación de *Lepidochelys olivacea* de El Verde.

Por otra parte, para la colonia de anidación de Las Cabras el análisis de paternidad de las 214 crías muestreadas se realizó con los tres programas bajo dos escenarios:

Escenario 1) Análisis con 2 loci (CcP7D04 y Cc1G02)

Escenario 2) Análisis con 4 Loci (OR4, OR11, CcP7D04 y Cc1G02).

Esta decisión fue tomada para asegurar un resultado conservador con los dos loci Cc de resultados consistentes y uno con mayor posibilidad de ambigüedades debido a las lecturas problemáticas de algunos cromatogramas en los loci de la serie OR.

En la Tabla 27 del Anexo 3 se presenta el número de padres por nidada calculado por los tres programas con el análisis de dos y cuatro loci, así como el consenso establecido a partir de la moda; en complemento en la Figura 18 se muestra la variación del número de padres por nidada en la colonia de Las Cabras de acuerdo con la información generada por los tres programas para cada escenario.

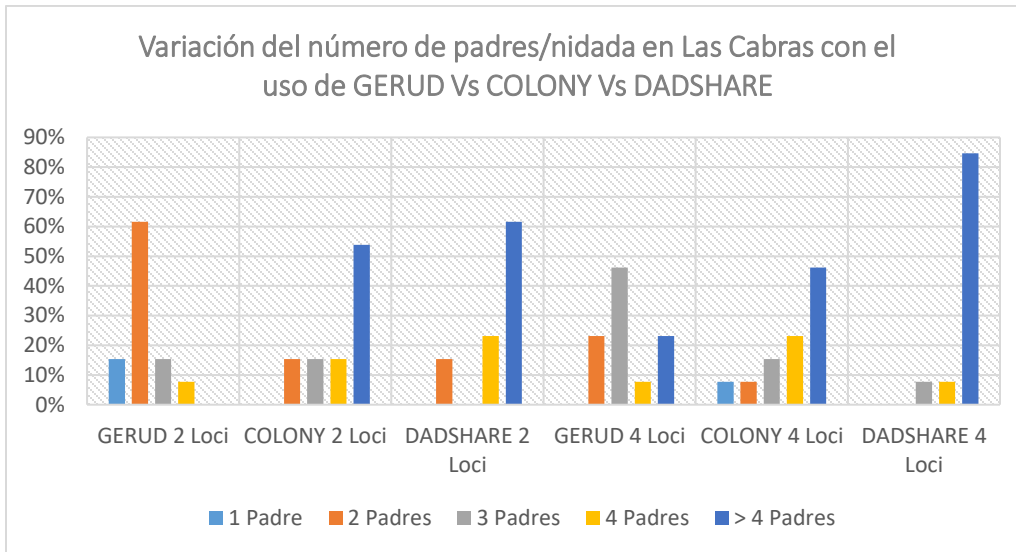


Figura 18. Variación en el resultado del número de padres para nidadas de la colonia de Las Cabras con el uso de GERUD Vs COLONY Vs DADSHARE.

Una vez aplicada la moda para definir el consenso del número de padres por nidada, en la colonia de Las Cabras se detectó paternidad múltiple en el 100% de las nidadas analizadas, la presencia de 2, 3 y 4 padres se detectó en dos de las 13 nidadas evaluadas (15%), mientras que cuatro nidadas se identificó la presencia de cinco padres (31%), en una se identificaron a seis padres (8%) y finalmente el número máximo de padres detectado fue siete, los cuales se registraron en dos de las 13 nidadas (15%) (Figura 19).

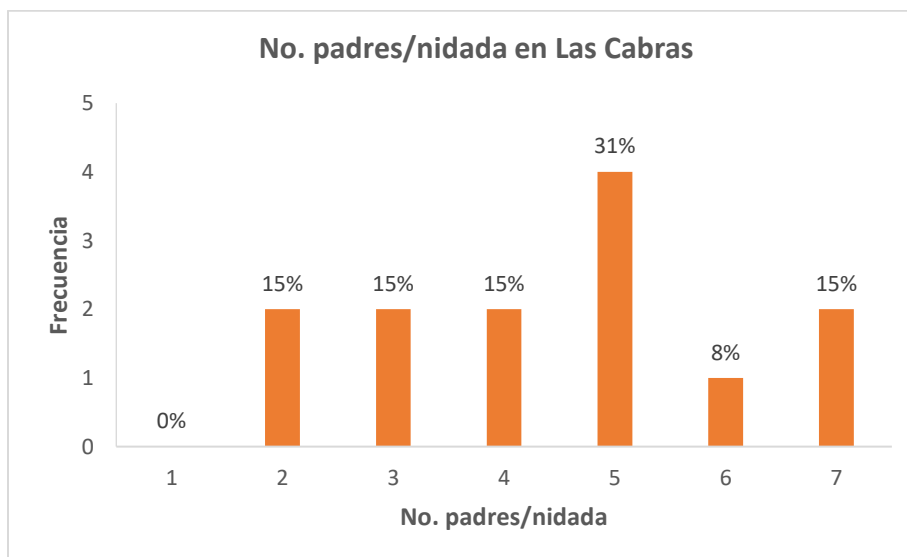


Figura 19. Número de padres por nidada en la colonia de anidación de *Lepidochelys olivacea* de Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.

8.9. Reconstrucción de genotipos paternos

De acuerdo con COLONY para la colonia de El Verde se identificaron genotipos de 57 padres diferentes para el total de las 173 crías analizadas de esta colonia. En promedio, para los genotipos paternos generados se obtuvo una probabilidad global de acierto de 80%, con una mínima de 58% y una máxima de 100%.

Los genotipos paternos reconstruidos para la colonia de reproducción de El Verde, así como la probabilidad global para cada genotipo compuesto, son enlistados en la Tabla 28 del Anexo 4.

A su vez, para la colonia de Las Cabras, en base a las corridas del *Escenario 1* (2 loci) realizadas en COLONY se caracterizaron los genotipos de 49 padres distintos para las 214 crías evaluadas de esta colonia; por otro lado, al realizar las corridas del *Escenario 2* (4 loci) se identificaron a 55 padres distintos. Esto habla del efecto del tamaño de muestra de loci sobre la identificación del número de machos que participan en la reproducción de una colonia, ya que al añadir al análisis de paternidad dos loci extra, en el *Escenario 2* pudieron ser identificados seis machos más en comparación con el *Escenario 1*. En promedio, para los genotipos paternos generados bajo el *Escenario 1* se obtuvo una probabilidad global de acierto de 81%, con una mínima de 47% y una máxima de 100%. Por otro lado, para los genotipos paternos generados con el *Escenario 2* se obtuvo una probabilidad global de acierto de 74%, con una mínima de 26% y una máxima de 100%.

Los genotipos paternos reconstruidos por COLONY para cada escenario de la colonia de Las Cabras, se enlistan en la Tabla 29 y Tabla 30, del Anexo 4.

8.10. Proporción de crías engendradas por padre/nido

Para evaluar si predominaba un macho en las fertilizaciones de las distintas nidadas evaluadas para las colonias de anidación de El Verde y Las Cabras, se calculó la proporción de crías engendradas por padre en cada nidada.

Para la colonia de anidación de El Verde (Figura 20), la frecuencia más alta fue para los machos que engendraron del 50 al 60% de las crías de cada nido, cuando el número total de padres por nidada fue igual a 2.

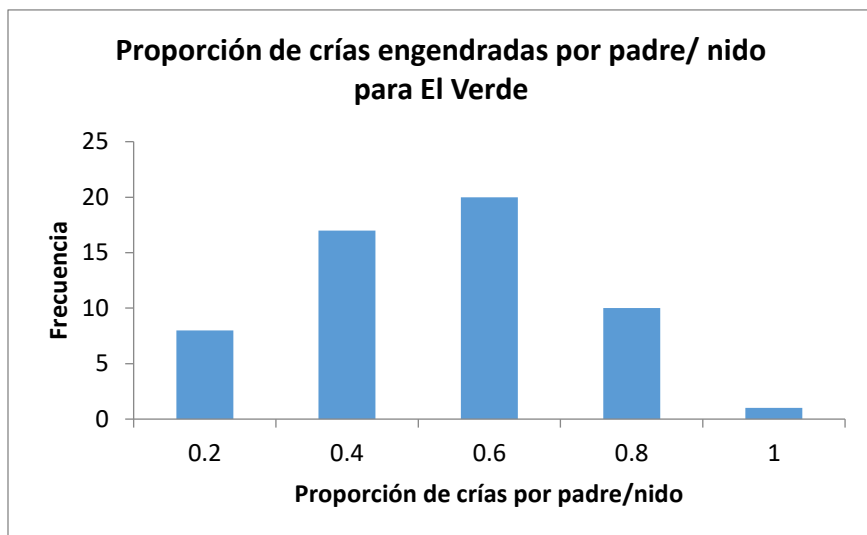


Figura 20. Histograma de frecuencias de la proporción de crías engendradas por padre/nido para la colonia de El Verde.

Por su parte, para la colonia de Las Cabras, en donde se dedujo presencia de paternidad múltiple en el 100% de las nidadas analizadas (Figura 21), la frecuencia más alta fue para los machos que engendraron entre el 10 y 20% de las crías de cada nido, para aquellas nidadas en donde el número de padres estimado fue igual o mayor que 4.

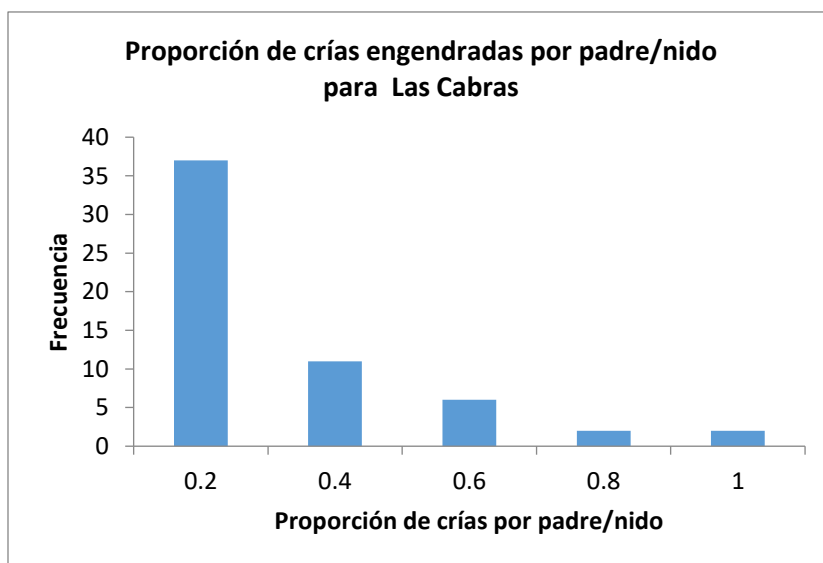


Figura 21. Histograma de frecuencias de la proporción de crías engendradas por padre/nido para la colonia de Las Cabras.

Los resultados tanto de El Verde como de Las Cabras, sugieren que, en estas colonias, cuando más de un macho fecunda a una hembra, los porcentajes de fertilización de huevos tienden hacia un equilibrio entre los distintos machos, no encontrando machos dominantes en las nidadas con paternidad múltiple.

Si persistiera una predominancia de un macho en cada nidada con paternidad múltiple, habría una tendencia de frecuencias cercanas a 1 para el padre dominante y escasos valores para los demás. Por otro lado, si la tendencia fuera hacia un equilibrio entre padres, una estimación de diversidad en función de frecuencia de cada padre ($1 - \sum(\text{Frec. de cada padre/nido})^2$) aumentaría conforme se incrementará el número de machos. Los resultados obtenidos (Figura 22 y Figura 23) apoyan el segundo escenario, por lo menos para estas colonias de tortuga golfina.

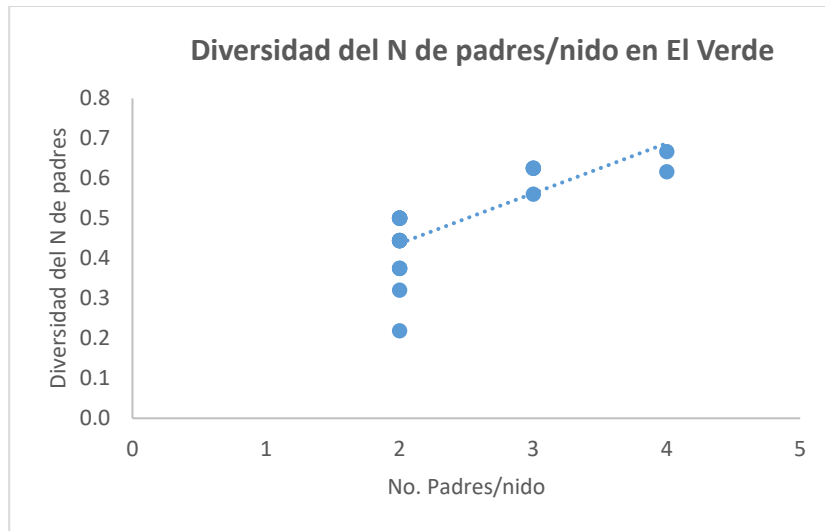


Figura 22. Diversidad del N de padres/nido para la colonia de anidación de El Verde.

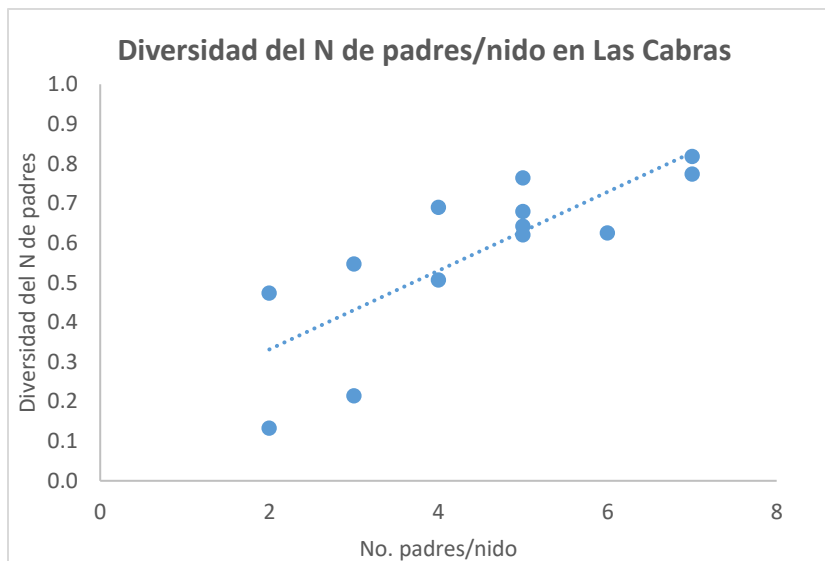


Figura 23. Diversidad del N de padres/nido para la colonia de anidación de Las Cabras.

8.11. Análisis de poliginia

Una vez que se realizó el análisis de paternidad múltiple por nidada y se reconstruyeron los genotipos de los padres de cada colonia, el siguiente paso fue realizar un análisis de la poliginia, es decir, se identificaron a los machos que engendraron crías con más de una hembra.

Como se mencionó en la sección 7.6.4 debido a que en el estudio en El Verde fue posible muestrear más de una nidada para algunas hembras, solo allí la poliginia fue analizada desde dos enfoques:

- Número de hembras fertilizadas por macho
- Número de nidadas engendradas por macho

Para el primer enfoque, una vez que obtuvieron los resultados de las tres corridas de COLONY y de DADSHARE se identificó que del 63 - 76% de los machos de El Verde fertilizaron a una sola hembra, del 20 - 35% fertilizaron a dos hembras y finalmente de un 2 - 4% de los machos detectados fertilizó a tres hembras. En la Figura 24 se muestra la variación de los resultados del análisis de poliginia desde el enfoque 1 con el uso de ambos programas.

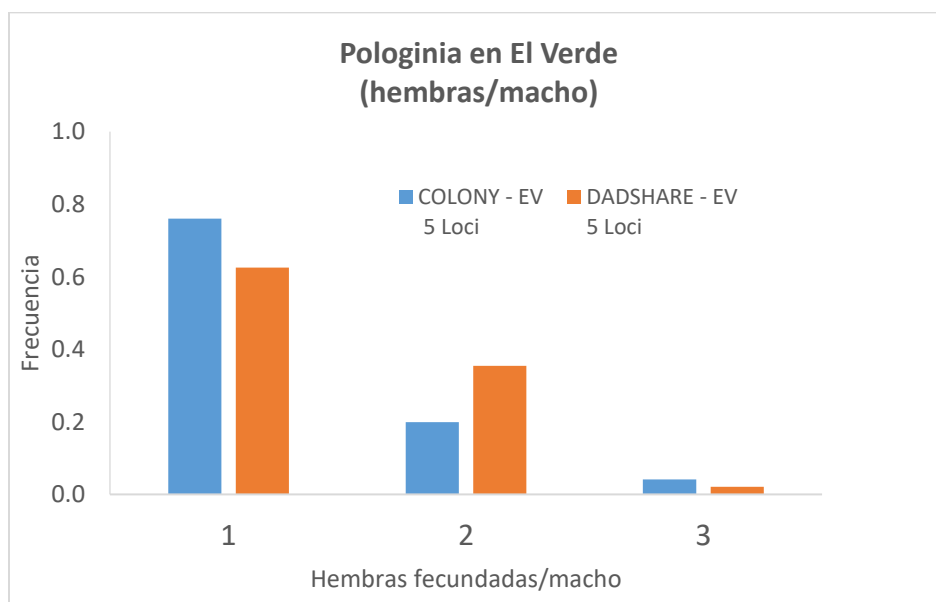


Figura 24. Resultados de la poliginia para la colonia de El verde. Análisis desde el primer enfoque: hembras fecundadas/macho. Las bandas de distintos colores muestran la variación de los resultados con el uso de COLONY Vs DADSHARE.

Desde el segundo enfoque, con el uso de ambos programas se encontró que del 42 - 61% de los machos de El Verde engendraron crías de una nidada, del 30 - 52%

engendraron crías de dos nidadas (independientemente si se trataba de nidadas de la misma hembra) y por último del 69% de los machos encontrados engendro a crías de tres nidadas distintas. En la Figura 25 se ilustran los resultados del análisis de poliginia desde el segundo enfoque con el uso de COLONY y DADSHARE.

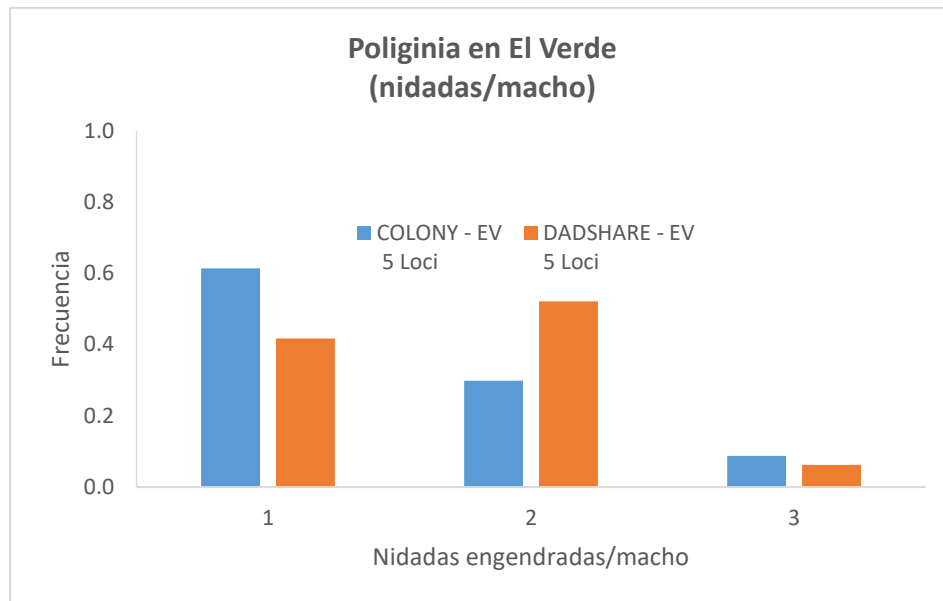


Figura 25. Resultados de la poliginia para la colonia de El verde. Análisis desde el segundo enfoque: nidadas engendradas/macho. Las bandas de distintos colores muestran la variación de los resultados con el uso de COLONY Vs DADSHARE.

Por otro lado, para la colonia de anidación de Las Cabras, en donde la poliginia fue examinada únicamente desde el primer enfoque, los resultados del análisis COLONY y DADSHARE variaron cuando el análisis se realizó con el uso de 2 y 4 loci. Al analizar dos loci, se encontró que del 50 - 89% de los machos identificados fertilizaron solo a una hembra, del 7 - 39% a dos hembras, del 2 - 4% a tres y este mismo porcentaje fertilizo a cuatro hembras. No obstante, al utilizar cuatro loci para el análisis, se detectó que del 67 - 90% fertilizaron a única hembra, del 6 - 31% a dos y del 2 - 4% a tres hembras; en este caso no se detectaron a machos que fertilizaron a cuatro hembras. Los resultados del análisis de poliginia para esta colonia con el uso de ambos programas y con el análisis de 2 y 4 loci, respectivamente se ilustran en la Figura 26.

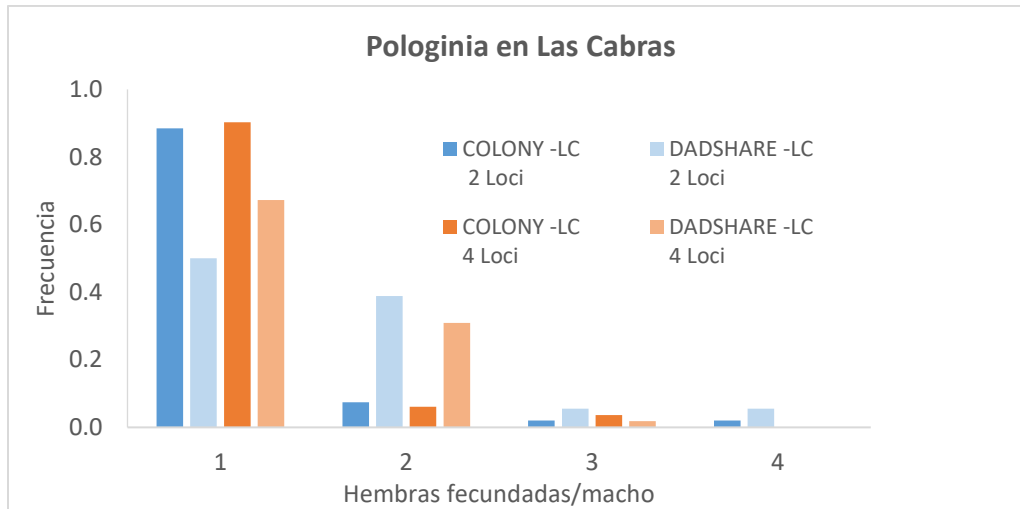


Figura 26. Resultados de la poliginia para la colonia de Las Cabras. Las bandas de distintos colores muestran la variación de los resultados con el uso de COLONY Vs DADSHARE, mientras que la variación de las tonalidades refleja la variación de los resultados al analizarse 2 y 4 loci.

8.12. Proporción sexual operativa

Como se mencionó en la sección 8.9, de acuerdo con las corridas realizadas en COLONY para el total de muestras analizadas de la colonia de El Verde, se dedujo la presencia de 57 padres distintos, eliminando padres apareando con más de una hembra de la colonia (24% de los machos) y aquellos que engendraron crías de más de una nidada (39%) incluidas las distintas nidadas de una misma hembra a lo largo de la temporada. Por otro lado, eliminando hembras que se muestrearon más de una vez por nidadas múltiples se contabilizaron un total de 37. Con esto se nos brinda una estimación de la proporción sexual operativa de la tortuga golfina en esta colonia de 57 machos:37 hembras o 1.5 machos por hembra.

En el caso de la colonia de anidación de Las Cabras, la proporción sexual operativa fue calculada en base a los resultados obtenidos con el análisis de 2 y 4 loci. Al analizarse dos loci, de acuerdo con las corridas de COLONY se caracterizó el genotipo de 49 machos distintos, eliminando los casos de machos que se aparearon con más de una hembra (11%); por otra parte, al analizarse cuatro loci los resultados de COLONY revelaron la presencia de 55 machos distintos al descartar los casos de machos que fertilizaron a dos o tres hembras (10%). De esta manera la proporción sexual operativa estimada para esta colonia con el análisis de dos loci fue de 49 machos:13 hembras o 3.8 machos por hembra, mientras que con la evaluación de cuatro loci la proporción sexual de adultos sexualmente activos fue de 55 machos:13 hembras o 4.2 machos por hembra.

En la Tabla 19 se resume la proporción sexual operativa, así como la proporción de machos calculada para cada colonia. En el caso de Las Cabras, se presentan los resultados bajos los dos escenarios de evaluación (2 y 4 loci).

Tabla 19. Proporción sexual operativa para las colonias de anidación de *Lepidochelys olivacea* de El Verde y Las Cabras.

Proporción sexual operativa						
	machos : hembras			Proporción machos		
No. loci evaluados:	5 loci	2 loci	4 loci	5 loci	2 loci	4 loci
El Verde	1.5 : 1			0.6		
Las Cabras		3.8 : 1	4.2 : 1		0.8	0.8

8.13. Correlación entre variables genéticas y fenotipo: colonia de anidación de Las Cabras

Se analizaron las correlaciones con el paquete *corrplot* en el ambiente R (Figura 27) donde se muestran las correlaciones positivas en azul y las negativas en rojo. La intensidad del color y el tamaño de las figuras seleccionadas para los gráficos son proporcionales a los coeficientes de correlación. Como se mencionó en la sección 7.7, las correlaciones de interés para esta investigación fueron las existentes entre las variables biométricas vs. variables de heterocigosidad individual o bien vs. variables de paternidad múltiple (número de machos por nidada de cada hembra y diversidad del N de padres/nido).

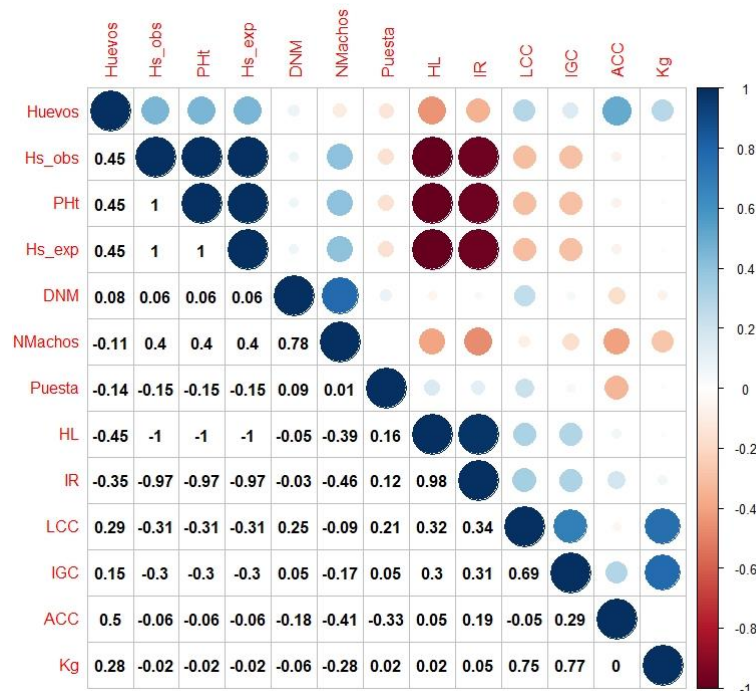


Figura 27. Matriz de correlación de variables biométricas (LCC, ACC, IGC, peso, # huevos, fecha de puesta) vs heterocigosidad individual (PHt, Hs_obs, Hs_exp, IR, HL) vs variables de paternidad múltiple (No. de machos/nidada, diversidad del N de padres/nido (DNM))

Tras un análisis de la matriz anterior, los valores de correlación (tanto positiva como negativa) más altos se encontraron entre las siguientes variables:

- No. de huevos vs PHt, Hs_obs, Hs_exp, IR y HL.
- No. de machos vs PHt, Hs_obs, Hs_exp, IR y HL.
- Ancho curvo del caparazón vs No. machos.

Sin embargo, al probar la significancia de la pendiente de regresión (alfa = 0.05), todos los resultados arrojaron relaciones no significativas (Tabla 20).

Tabla 20. Resultados de la prueba de significancia de la pendiente de regresión para los modelos de correlación establecidos para las variables de la colonia de anidación de Las Cabras. Para realizar esta prueba se utilizó un valor de alfa = 0.05.

Relación	PHt Vs No. huevos	Hs_obs Vs No. huevos	Hs_esp Vs No. huevos	IR Vs No. huevos	HL Vs No. huevos	PHt Vs No. machos	Hs_obs Vs No. machos	Hs_esp Vs No. machos	IR Vs No. machos	HL Vs No. machos	ACC Vs No. machos
Valor de p	0.12	0.12	0.12	0.25	0.13	0.17	0.17	0.17	0.11	0.18	0.17
Significancia	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

No obstante, a los resultados obtenidos en la prueba de significancia, el patrón de distribución de la comparación entre el ancho curvo del caparazón (ACC) y el número de

machos con el que se dedujo que se apareo cada hembra (Figura 28) sugiere una relación entre ambas variables. Esto podría indicar que las hembras más pequeñas posiblemente son fertilizadas por un mayor número de machos en comparación con las de mayor tamaño.

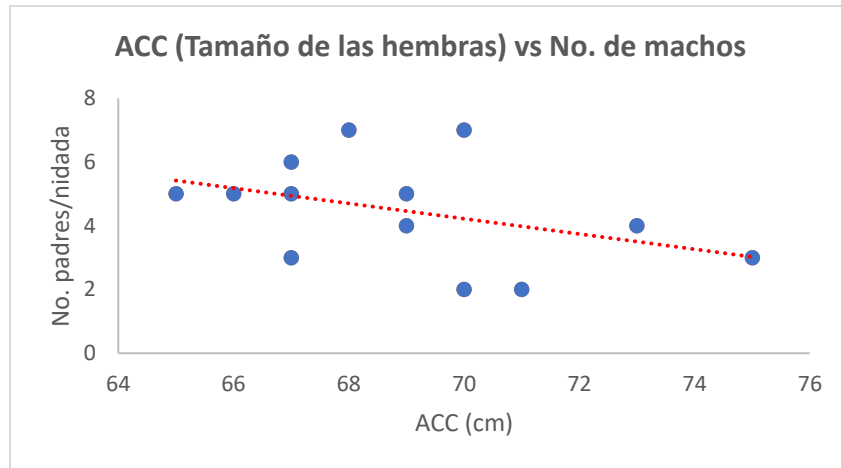


Figura 28. Relación entre el ancho curvo del caparazón Vs el número de machos con el que se dedujo que se apareo cada una de las hembras evaluadas para la colonia de anidación de Las Cabras.

8.14. Efecto del tamaño de muestra sobre número de padres detectados

Se realizaron corridas de 500 bootstraps con un conjunto simulado de 100 crías engendradas por siete machos distintos con una contribución promedio de cada uno de 0.125 (distribución equilibrada, acorde a lo que se encontró para esta colonia). Para cada tamaño de muestra (3, 5, 10, 20, 30 y 50 crías), se estimó la proporción de remuestreos que detectaron diferentes números de padres (Figura 29).

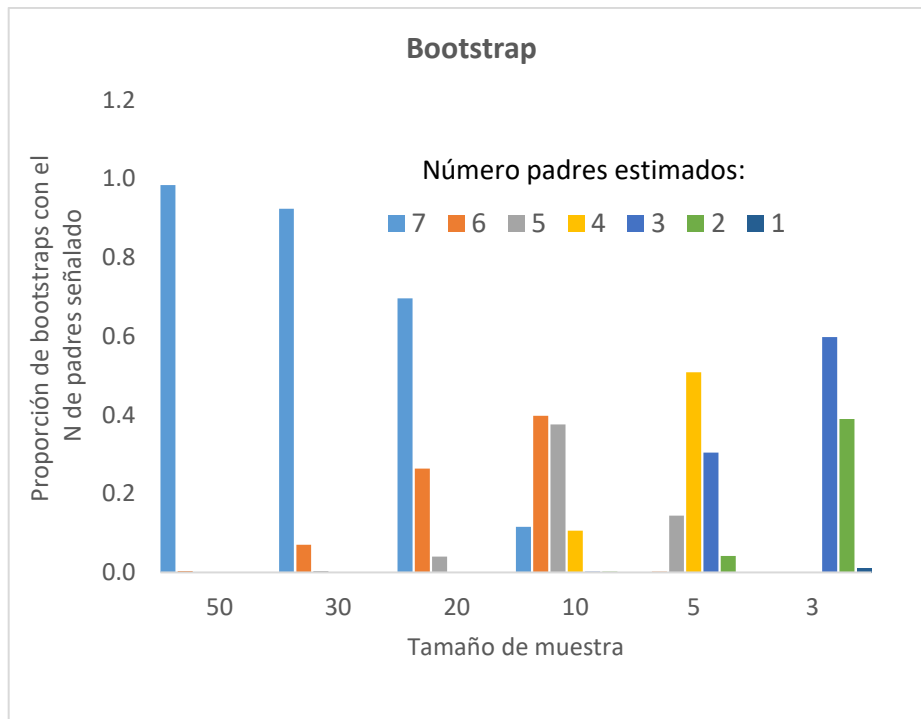


Figura 29. Resultados de la simulación con el método Bootstrap. Simulación basada en el muestreo de 50, 30, 20, 10, 5 y 3 individuos de una nidada de 100 crías engendradas por 8 padres distintos.

Como se puede observar de acuerdo a la simulación, con un tamaño de muestra equivalente al promedio utilizado para la colonia de El Verde (4) si hubiera realmente siete padres, solamente se habrían detectado un máximo de tres en un 59% de los muestreos, seguido de la detección de dos padres en un 38%. La raíz del error cuadrático medio (RMSE) para el tamaño de muestra más próximo al utilizado en El Verde fue de 0.315.

Por otro lado, con un tamaño de muestra cercano al promedio utilizado para la colonia de Las Cabras (16), sería posible detectar a los siete padres reales en 67% de los muestreos, seguido de la detección de seis padres en un 30%. En el caso de un tamaño de muestra similar al utilizado en Las Cabras la raíz del error cuadrático medio (RMSE) fue igual a 0.014.

Los resultados de la simulación sugieren que el número real de padres por nidada para la colonia de El Verde estaría muy por encima del calculado con el tamaño de muestra utilizado. Esto significa que los resultados para este parámetro a partir de los datos de El Verde solo pueden considerarse como mínimos. En contraste, los datos provenientes de Las Cabras, con un tamaño de muestra dentro de lo comúnmente reportado, pueden considerarse confiables.

8.15. Análisis comparativo

Con el propósito de comparar la cobertura del muestreo empleado en este estudio (número de loci, nidos analizados y crías por nido) así como de los resultados del análisis de parámetros genéticos con los de estudios previos realizados para la misma y diferentes especies de tortugas marinas en distintas regiones, se construyó una matriz (Tabla 21) con el compendio correspondiente de datos disponibles. Resaltan rasgos de las poblaciones evaluadas, particularmente los datos para la colonia de Las Cabras, que reflejan una alta incidencia de paternidad múltiple y de un alto número de padres por nidada. En general, nuestros resultados se distinguen por:

- Tendencia hacia el equilibrio en la frecuencia de padres en lugar de uno dominante.
- Alto número de padres/nido, siendo el más alto junto el de *Caretta caretta* (Lasala, *et al.*, 2018).
- El promedio de padres por nido está entre los más altos (4.5 para Las Cabras).
- El porcentaje de PM es el más alto de todos (100% para Las Cabras).
- La proporción de machos a hembras es la más alta (en Las Cabras 3.8 - 4.2 machos:hembra).
- Es de los pocos estudios en donde se observaron mismos padres en más de una nidada.

Tabla 21. Análisis comparativo de estudios del sistema de apareamiento de diferentes especies de tortugas marinas en distintas regiones.

Especie	Región	Playa	Loci	Hembras	Nidos	Crias/nido (prom)	PID	Prob exclusión	Paternidad múltiple (prom)	Distribución frecuencia padres en PM: 1 dominante o equilibrado	Padres /nido (min-max)	Padres /nido (prom)	Proporción sexual operativa (machos: hembras)	Poliginia: Presente/ Ausente	Referencia
<i>Chelonia mydas</i>	Sur de la Gran Barrera de Coral, Australia	Queensland	5	13	22	41	< 1E-09	0.99	9%	Dominante	1 - 2	1	-	-	Fitzsimmons, 1998
<i>Chelonia mydas</i>	Norte de Chipre	Alagadi	14	78	94	22	-	0.99	24%	-	1 - 4	2	1.3	Ausente	Wright <i>et al.</i> , (2012)
<i>Chelonia mydas</i>	Sri Lanka	Kosgoda	6	19	24	10	-	-	54%	Dominante	1 - 3	1.7	-	-	Ekanayake <i>et al.</i> , (2013)
<i>Chelonia mydas</i>	Michoacán, México	Playa Colola	3	10	16	23	< 1E-05	0.99	75%	Dominante	1 - 4	2.1	-	-	Chassin <i>et al.</i> , (2017)
<i>Caretta caretta</i>	Mediterráneo	Bahía de Laganas, Zakynthos	4	15	20	23	-	0.96	93%	Equilibrado	1 - 5	3.9	-	-	Zbinden <i>et al.</i> , (2007)
<i>Caretta caretta</i>	Queensland, Australia	Mon Repos	6	29	29	19	-	0.98	66%	Equilibrado	1 - 5	1.82	2	Ausente	Howe <i>et al.</i> , (2017)
<i>Caretta caretta</i>	Este del Golfo de México, Florida	Isla Sanibel, condado de Lee, Florida	7	64	64	20	< 1E-012	1	70%	-	1 - 7	2.5	2.5	Ausente	Lasala <i>et al.</i> , (2018)
<i>Dermochelys coriacea</i>	St. Croix, Islas Virgenes, E.U.A	Refugio de vida silvestre de Sandy Point	7	12	38	27	< 1E-06	0.99	42%	Dominante	1 - 3	1.5	1.4	Ausente	Stewart <i>et al.</i> , (2011)
<i>Dermochelys coriacea</i>	Costa del Caribe de Costa Rica	Playa Gandoca	3	18	35	11	< 1E-02	0.95	22%	Dominante	1 - 3	1.38	1.4	Ausente	Figgner <i>et al.</i> , (2015)
<i>Eretmochelys imbricata</i>	República de Seychelles	Cousine Island	33	53	85	19	< 1E-28	-	9%	Dominante	1 - 2	1	0.8	Ausente	Phillips <i>et al.</i> , (2013)
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Yucatán, México	Xicalango-Victoria, Chenkan, Celestun, El Cuyo, Las Coloradas y Holbox	12	41	50	25	< 1E-07	0.8 - 0.99	6%	Dominante	1 - 3	1	1.09	Ausente	González-Garza <i>et al.</i> , (2015)
<i>Natator depressus</i>	Queensland, Australia	Peak Island y Mon Repos	4	9	16	25	< 1E-04	0.99 / 0.98	67%	Dominante	1 - 4	3	-	-	Theissinger <i>et al.</i> , (2009)
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Costa del Pacífico de Costa Rica	Playa Hermosa	2	13	13	22	-	0.99	30%	Dominante	1 - 3	1.4	-	-	Jensen <i>et al.</i> , (2006)
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Costa del Pacífico de Costa Rica	Ostional	2	13	13	23	-	0.99	92%	Dominante	1 - 4	2.8	-	-	Jensen <i>et al.</i> , (2006)
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Golfo de Fonseca, honduras	Punta Ratón y El Venado	2	8	8	16	-	0.92	75%	Dominante	1 - 4	2	-	-	Duran <i>et al.</i> , (2015)
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Costa sur de Sinaloa, México	El Verde	5	37	52	4	< 1E-06	0.99	46%	Equilibrado	1 - 4	1.6	1.5	Presente	<u>Este estudio</u>
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Costa sur de Sinaloa, México	Las Cabras	2 - 4	13	13	16	< 1E-07	0.99	100%	Equilibrado	2 - 7	4.5	3.8 - 4.2	Presente	<u>Este estudio</u>

9. Discusión

9.1. Paternidad múltiple

La presencia de paternidad múltiple ha sido detectada en las nidadas de las siete especies de tortugas marinas, encontrándose variaciones en el porcentaje de incidencia entre especies y entre poblaciones de la misma especie (Pearse y Avise, 2001) por lo cual se ha hipotetizado que tanto la abundancia de individuos en el sistema de apareamiento como la densidad de individuos dentro de los sitios de cópula son los factores determinantes para la presencia de este fenómeno (Jensen *et al.*, 2006 y Zbinden *et al.*, 2007).

Jensen *et al.* (2006) analizaron dos colonias de *L. olivacea* en la costa del Pacífico de Costa Rica: el Ostional y Playa Hermosa, la primera de anidación masiva y la segunda con anidación solitaria. Determinaron paternidad múltiple en el 92% de la colonia de anidación masiva del Ostional mientras que, en contraste, la colonia con anidación solitaria solamente 30%. Estas dos poblaciones geográficamente cercanas no mostraron una diferenciación genética evidente; por lo cual los autores sugirieron que las diferencias en los niveles de paternidad múltiple entre estas colonias pudieron deberse a diferencias en las abundancias poblacionales en lugar de ser un fenómeno genéticamente determinado. Duran *et al.* (2014) también detectaron un alto nivel de paternidad múltiple para *L. olivacea* (75%) en una pequeña población con anidación en baja densidad en el Golfo de Fonseca, Honduras, con un tamaño de muestra relativamente pequeño (evaluación de ocho nidos), por lo que sugirieron que el porcentaje de paternidad múltiple de esta colonia podría estar incluso por encima del 75% calculado.

En *C. caretta*, también se han calculado una alta incidencia de paternidad múltiple. Ejemplo de ello es el estudio de Zbinden *et al.* (2007) quienes estimaron 93% de paternidad múltiple en la colonia de anidación de Zakynthos, Grecia, la cual se estima que tiene una población reproductiva de menos de 500 hembras. En el caso de *C. mydas*, Chassin-Noria *et al.* (2017) encontraron presencia de múltiples padres en el 75% de la colonia de anidación de playa Colola en Michoacán, México; lo que contrasta con lo encontrado por Fitzsimmons, (1998) para la misma especie en el sur de la Gran Barrera de Coral, Australia en donde solo estimaron paternidad múltiple en el 9% de las nidadas analizadas. En esta misma región, específicamente en las playas de Peak Island y Mon Repos Theissinger *et al.* (2009) calcularon la incidencia de paternidad múltiple en una colonia de *N. depressus*, en la que encontraron que 67% de las nidadas evaluadas habían

sido engendradas por más de un padre, el cual puede considerarse un porcentaje relativamente alto para esta colonia en la cual se estima que anualmente solo llegan a anidar 300 hembras.

En el caso de *D. coriacea* y *E. imbricata*, especies con escasas abundancias y catalogadas en peligro crítico de extinción, los porcentajes de paternidad múltiple observados han sido de los más bajos. Por ejemplo, Stewart *et al.* (2011) determinaron 42% de paternidad múltiple en la colonia de tortuga laúd que anida en Sandy Point, St Croix, Islas Vírgenes, E.U.A mientras que Figgner *et al.* (2015) encontraron un porcentaje de paternidad múltiple más bajo (22%) para la colonia de esta misma especie que anida en Playa Gandoca, Costa Rica. Por otro lado, para *E. imbricata*, Gonzalez-Garza *et al.* (2015) encontraron solamente incidencia de múltiples padres en el 6% de las nidadas muestreadas en seis playas de anidación de Yucatán, México.

En este estudio se documentó la presencia de altos niveles de paternidad múltiple para las dos colonias analizadas de *L. olivacea* que anidan en la costa sur de Sinaloa. Por un lado, para El Verde se encontró presencia de múltiples padres en el 46% de las nidadas muestreadas, mientras que para la colonia de Las Cabras este fenómeno se detectó en el 100% de las nidadas colectadas. No obstante, aunque en ambas colonias se calculó un alto porcentaje de paternidad múltiple los diferentes niveles puede ser un efecto diferentes tamaños de muestra de individuos por nido. Para la colonia de El Verde el número de crías analizadas por nido fue en promedio de 4, en cambio para Las Cabras se evaluaron en promedio 16 crías por nidada. El escaso número de muestras disponibles en El Verde seguramente obstaculizó la identificación del total real de padres adicionales a los encontrados. Es relevante resaltar que el escaso número de muestras usadas en el presente estudio se debe a que se aprovecharon muestras derivadas de un estudio previo con otros objetivos que no requerían de mayor cantidad de muestras. Por otro lado, el número recomendado de muestras de progenie por nido es de por lo menos 10 crías (Stewart *et al.*, 2010). Bajo esta consideración, el nivel de paternidad múltiple encontrado en El Verde solamente puede ser considerado como valor “mínimo”, comprendiendo que el valor correcto podría estar por encima del 46% calculado. Además, para estas dos colonias cuyos sitios de reproducción se encuentran relativamente cercanos (109 km) no debería existir gran diferencia en su sistema de apareamiento.

La simulación con el método *bootstrap* (de remuestreo, Sección 8.14) nos permitió verificar el marcado efecto del tamaño de muestra de crías/nido utilizado para las dos colonias analizadas con lo cual se demuestra que si bien para el de Las Cabras el tamaño

de muestra cercano al promedio utilizado para esta playa de anidación, y que comúnmente es usado en la mayoría de los estudios de paternidad, es posible la identificación de la totalidad de padres presentes en una nidada para la mayoría de los muestreos. En marcado contraste, para el tamaño de muestra usado para El Verde las estimaciones posibles del número de padres siempre fueron muy por debajo del valor real con lo que se puede concluir que los resultados de ese sondeo no son confiables y únicamente pueden considerarse valores mínimos. Este resultado permite inferir que el análisis realizado para la colonia de Las Cabras brinda un resultado confiable de la incidencia de paternidad múltiple de la tortuga golfina, en la costa sur de Sinaloa. Otro rasgo importante a resaltar para nuestro método en la detección de paternidad múltiple es la combinación de diversos programas especializados para la reconstrucción de genotipos y análisis de parentesco con el fin de obtener resultados más sólidos. Estudios como los de Crim *et al.* (2002) y Hoekert *et al.* (2002) han basado sus análisis únicamente con el método manual de inferencia de alelos paternos, el cual puede sesgar los resultados debido al tamaño de muestra. En este caso, con el uso de tres programas (GERUD, COLONY y DADSAHRE) se obtuvieron resultados variables para algunas de las nidadas de ambas colonias. Esta variación pudo deberse a que en GERUD la información para la búsqueda de padres se limita a los datos de los miembros de una nidada, mientras que DADSHARE y COLONY realizan la búsqueda de los posibles padres empleando los genotipos de todos los individuos muestreados de la colonia, con lo que hacen una corrección del posible sesgo de los resultados debido al tamaño de muestra. En adición a lo anterior, COLONY es un programa que genera una base de datos mucho más completa que, además de las frecuencias alélicas de la población (también solicitadas por los otros programas), incluye tasas de error para cada marcador utilizado, información del sistema de apareamiento de la especie y al mismo tiempo permite seleccionar el número de iteraciones por corrida, el método de análisis y el nivel de precisión deseado para los resultados. Ante posibles variaciones de resultados, el uso de distintos programas permite probar la precisión de la información generada, mientras que la aplicación de estadísticos como la moda son funcionales para obtener resultados globales.

El porcentaje de paternidad múltiple detectado para Las Cabras (100%) es el más alto reportado hasta el momento para *L. olivacea*, superando al 92% reportado por Jensen *et al.* (2006) para la playa de anidación masiva del Ostional, Costa Rica. Por otro lado, el número máximo de padres detectado para nidadas de este estudio fue de siete, observado en dos de las 13 nidadas de Las Cabras; valor que se encuentra por encima

del rango de 1-4 padres por nido reportados en la mayoría de las investigaciones de paternidad múltiple en tortugas marinas (Jessen *et al.*, 2006; Theissinger *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2012; Duran *et al.*, 2015 y Chassin-Noria *et al.*, 2017). Lasala *et al.* (2018) reportó un máximo de siete padres por nido en nidadas de *C. caretta* del este del Golfo de México, lo que coincide con lo encontrado en este estudio para *L. olivacea*. Este número de progenitores es el más alto reportado hasta la fecha en nidadas de tortugas marinas.

Las Cabras es considerada una playa con potencial para la anidación de tortugas marinas, sin embargo, no se encuentra catalogada como una playa de anidación masiva. Una posible explicación para encontrar tasas extremadamente altas de paternidad múltiple, así como un alto número de padres por nido en poblaciones pequeñas o de anidación no masiva, como es el caso de Las Cabras, es que el factor más influyente no es el número real de adultos sexualmente activos presentes, sino su densidad dentro del área de apareamiento (Zbinden *et al.*, 2007). Esta explicación permite suponer que en los sitios de cópula de *L. olivacea*, de la costa sur de Sinaloa existe una alta densidad de machos sexualmente activos lo que contribuiría al alto porcentaje de paternidad múltiple encontrado en este estudio. En la sección final se discuten posibles explicaciones para este fenómeno.

Otra hipótesis sustenta los altos índices de paternidad múltiple reportados para *L. olivacea*, así como para otras especies de tortugas marinas, es que las hembras desarrollan una actitud sumisa ante el apareamiento. Lee *et al.* (2017) tras hacer una extensa revisión de los estudios sobre el sistema de apareamiento de las siete especies de tortugas marinas en diversas regiones, concluyen que la mejor explicación sería que las hembras no buscan activamente aparearse con múltiples machos, sino que simplemente ceden al apareamiento múltiple para evitar el acoso por parte de los machos quienes suelen tornarse agresivos. De acuerdo con esta hipótesis, aunque tanto el apareamiento múltiple como la resistencia al apareamiento son costosos para las hembras, si los costos del apareamiento fueran mayores que el costo energético de la resistencia a la cópula, entonces se produciría poca o ninguna paternidad múltiple. En contraste, si el costo energético del apareamiento es bajo, la consecuencia sería que se produzcan cópulas con múltiples machos. Más allá de esta conclusión, los análisis de Lee *et al.* (2017) que compararon datos de genética con información sobre distribuciones geográficas de los derroteros migratorios de los reproductores detectados por rastreo satelital, los llevaron a concluir que las tasas de paternidad múltiple están correlacionadas no con el tamaño de las colonias sino con la densidad de agrupación espacial (“packing

density”) de los adultos. Esto es, la combinación del traslape en distribución geográfica durante la reproducción y la abundancia de las poblaciones fuente.

La primera explicación para paternidad múltiple podría aplicar para las colonias evaluadas en este estudio, implicando que las hembras son cortejadas por múltiples machos, dentro de un sitio de reproducción relativamente reducido y en consecuencia éstas sencillamente ceden al apareamiento al ser la opción energéticamente menos costosa, bajo lo que se ha denominado como “poliandria de conveniencia” (Thornhill y Alcock, 1983). Sin embargo, los altos índices encontrados implicarían la mayor densidad de ambos sexos que se hubiera encontrado para cualquier especie. Debido a que no se cuenta con suficiente información respecto a las abundancias de reproductores en aguas del sur de Sinaloa, no es posible por el momento verificar esta hipótesis, pero de igual manera, la existencia de esta hipótesis le inyectará valor e impulso adicional al seguimiento por rastreos satelitales no solo de hembras anidantes sino también de machos de la especie.

Aunque se han teorizado sobre posibles beneficios de la paternidad múltiple como 1) garantía de la fertilización en caso de que algún macho posea esperma de baja calidad, 2) mayor viabilidad de la descendencia a través de la competencia de esperma, 3) mayor diversidad genética y 4) reducción del acoso por parte de los machos durante el tiempo en el que la hembra es montada (FitzSimmons, 1998), persiste el debate al no existir validaciones conclusivas. En estudios con tortuga verde, *C. mydas*, no se encontró una relación entre los niveles de paternidad múltiple y el éxito de fertilización, el éxito de eclosión, el éxito de emergencia o el tamaño de la cría (Wright *et al.*, 2012), sin embargo, para la tortuga caguama, *C. caretta*, se encontró una relación positiva entre el éxito de eclosión y el número de padres (Zbinden *et al.*, 2007). Por lo tanto, este aspecto aún debe ser estudiado a mayor profundidad para esclarecer si existe un patrón universal o si solo aplica en algunas poblaciones o especies.

Zbinden *et al.* (2007) sugieren que es probable que la paternidad múltiple aumente el tamaño efectivo de las poblaciones y disminuya la deriva genética en comparación con las poblaciones en la que las hembras se aparean con un solo macho. Los estudios de paternidad son primordiales en la investigación de tortugas marinas, debido a que pueden proporcionar información sobre el comportamiento reproductivo que es difícil de observar de forma directa puesto a que las cópulas se producen en el mar. Los niveles de paternidad múltiple pueden afectar el tamaño y la diversidad de la población de relevancia

para determinar el potencial evolutivo de las poblaciones a futuro, por lo que deben considerarse para fines de manejo y conservación de estas especies.

9.2. Contribución paterna por nido

La frecuencia de paternidad múltiple es influenciada por la abundancia de dos tipos de procesos; 1) Procesos precopulatorios como la proporción sexual operacional y 2) Procesos postcopulatorios que incluyen almacén de semen, la elección críptica y la competencia espermática (Palacios 2012). Por otro lado, la distribución de las contribuciones de cada uno de los padres depende de diferencias entre los machos en cuanto al volumen y el éxito de los espermatozoides para ocupar las áreas de almacenamiento del oviducto y para competir con los espermatozoides de otros machos (Gist y Congdon, 1998).

Theissinger *et al.* (2009) encontraron una prevalencia de machos dominantes en nidadas con paternidad múltiple de la colonia de *N. depressus*, que anida en Queensland, Australia con el macho primario contribuyendo, en promedio, un 64% de la paternidad de la nidada. La proporción estimada de descendientes engendradas por un segundo padre osciló entre 10% y 50% con un promedio de 36%, mientras que, en los casos donde se encontró a un tercer macho, su contribución fue en promedio del 16%, con fluctuaciones del 8-23%. Por otra parte, Zbinden *et al.* (2007) también encontraron dominancia en la contribución paterna en nidadas de *C. caretta* del Mediterráneo. Hicieron una comparación de los porcentajes de contribución del macho dominante en los casos donde se observaron 2-4 padres y encontraron que, a pesar del número de machos que engendraban las nidadas con paternidad múltiple, los porcentajes de contribución del macho dominante eran casi idénticos, con oscilaciones entre el 41-59%.

Patrones de contribución paterna similares, con dominancia de un solo macho, han sido reportados en la mayoría de estudios con diversas especies de tortugas marinas (Jessen *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2013 y Figgner *et al.*, 2015). No obstante, Howe *et al.* (2017), encontraron una contribución paternal homogénea (equilibrada) para nidadas de hembras tanto experimentadas como neófitas de tortuga caguama, *C. caretta*, que anidan en la playa de Mon Repos en Queensland, Australia.

Para las colonias de El Verde y Las Cabras, no se encontró la presencia de un macho dominante en las nidadas donde se dedujo paternidad múltiple. Por el contrario, el análisis del número de crías engendradas por cada padre dentro de un nido alude a que en estas colonias el porcentaje de fertilización de huevos entre los distintos machos que logran fertilizar a una hembra más bien apunta hacia un equilibrio.

Gist y Gondon (1998) sugieren que en los sistemas de apareamiento con elección aleatoria de pareja y con sucesión rápida entre la cópula con un macho y otro, los espermatozoides viables de múltiples machos se mezclan dentro de las áreas de almacenamiento oviducal lo que resulta en una fertilización equilibrada de los huevos. Por el contrario, en sistemas de apareamiento en donde el primer macho defiende o acapara y permanece asociado a la hembra durante tiempos prolongados, entonces el espermatozoides del primer macho podría llenar una porción significativa del oviducto y tener una ventaja competitiva sobre el espermatozoides del o los machos subsecuentes.

El alto porcentaje de paternidad múltiple, así como del promedio de padres por nido (4.5) encontrados en este estudio, en conjunto con la contribución paterna equilibrada encontrada en las nidadas engendradas por múltiples machos, permite inferir que existe una rápida sucesión de pareja con tiempos de cópula relativamente cortos, que impiden que el espermatozoides de un solo macho llene toda el área de almacenamiento cubriendo la totalidad de los huevos y en su lugar distintos machos logran la fertilización de un número moderado de éstos. Este escenario también sería congruente con una ausencia o reducción significativa de acaparamiento o defensa de la hembra por parte de los machos en estas colonias, en comparación con la mayoría de los casos estudiados.

Un sistema de apareamiento como el que hemos deducido para las colonias estudiadas, conduciría a incrementos sustanciales en la diversidad genética en la progenie en comparación con menores niveles de paternidad múltiple y cantidades elevadas de apareamientos de múltiples hembras por cada macho.

9.3. Poliginia

La *poliginia* es un tipo de poligamia con una tendencia de apareamientos de cada macho con múltiples hembras. Esta conducta ha sido identificada en diferentes especies de tortugas marinas, pero en menor medida que la *poliandria* que también es poligamia, pero en casos donde una hembra es fertilizada por múltiples machos.

En estudios de paternidad múltiple, solo es posible evaluar la poliginia cuando los genotipos de los padres son reconstruidos mediante el genotipo de los descendientes, ya que solamente de esta manera los machos que engendran crías de diferentes hembras pueden quedar evidenciados.

Lasala *et al.* (2018), en su estudio de paternidad múltiple de *C. caretta* no encontraron a machos que repitieran paternidad en las nidadas de más de una hembra de la colonia. De manera similar, Wright *et al.* (2012) quienes evaluaron durante tres temporadas la incidencia de paternidad múltiple en la colonia de *C. mydas* que anida en el

norte de Chipre, tampoco encontraron evidencia de que alguno de los machos identificados hubiera fertilizado a más de una hembra, al no encontrar medios hermanos paternos entre las nidadas de las distintas hembras muestreadas durante cada temporada.

El apareamiento con una sola hembra también ha quedado evidenciado para machos de *D. coriacea* de las colonias de anidación de St. Croix, Islas Vírgenes, E.UA. y Playa Gandoca, Costa Rica (Stewart *et al.*, 2011 y Figgner *et al.*, 2015), así como también para machos de *E. imbricata* de las colonias reproductoras de la República de Seychelles y Yucatán, México (Phillips *et al.*, 2013 y González-Garza *et al.*, 2015).

En contraste a lo reportado en investigaciones previas, en las colonias de El Verde y Las Cabras si se identificaron machos que se aparearon con más de una hembra. Alrededor del 30% de los machos identificados para cada colonia fertilizaron las nidadas de por lo menos dos hembras distintas. Este es quizá el primer estudio de paternidad múltiple que revela poliginia con estos niveles.

Sin embargo, evaluar la poliginia es complicado, puesto a que aun cuando ésta esté presente, debido a diversos factores podría no detectarse. A continuación, se enlistan algunas de las causas que pueden permitir u obstaculizar la evaluación de este parámetro:

- Factores que facilitan identificar la poliginia cuando existe
 - a) Poblaciones pequeñas que permiten una buena cobertura de la totalidad de los individuos machos con los muestreos.
 - b) Machos altamente activos durante la reproducción, capaces de fecundar múltiples hembras y sin tendencia a dominancia en las cópulas de uno solo.
- Factores que obstaculizan identificar poliginia cuando existe
 - a) Poblaciones con un alto número de machos sexualmente activos relativo al tamaño de la muestra, que evita lograr el muestreo de la totalidad para evidenciar padres repetidos.
 - b) Machos con tendencia a copular con una sola hembra (monoginia) y una vez que se han apareado se retiran del sitio de cópula.

Aunque por falta de información no es posible en estos momentos conocer el tamaño de las poblaciones de machos en las dos colonias estudiadas, en términos de las abundancias conocidas para la tortuga golfina por la abundancia de nidos por año, se pueden considerar intermedia (El Verde) y pequeñas (Las Cabras). Quizá por ello fue posible identificar en el muestreo eventos de poliginia, particularmente en Las Cabras,

aunado a la evidente tendencia hacia tanto altos niveles de padres como una inseminación equilibrada, conjunción de factores que probablemente contribuyó en el éxito para la detección de poliginia en este estudio.

Aunque los beneficios de poliandria aun no son claros; los beneficios de poliginia son obvios; el apareamiento con tantas hembras como sea posible es una estrategia reproductiva de reproducción que se ha postulado como contribuyente el éxito de anidación de las hembras, así como en el éxito de eclosión de las crías (Stewart *et al.*, 2010).

Asimismo, en algunas especies de tortugas marinas como *L. kempii* (Shaver *et al.*, 2005; Hughes y Landry, 2016) donde se ha logrado rastrear los movimientos de los machos posteriores a la reproducción, se sabe que los machos tienden a residir durante todo el año en cercanías a las playas de anidación, en contraste con el comportamiento de las hembras que realizan migraciones post-anidación de cientos hasta miles de kilómetros hacia sus sitios de alimentación.

También para *C. mydas* y *D. coriacea*, se ha evidenciado una conducta sexual interesante de los machos, y es que de manera similar permanecen cerca de diferentes sitios de reproducción durante todo el año apareándose con hembras de distintas colonias. Wright *et al.* (2012) rastrearon a un macho de tortuga verde, *C. mydas*, inmediatamente después de la temporada de reproducción en el norte de Chipre, y observaron que este viajó a través o cerca de múltiples sitios de anidación en Chipre y Turquía durante la temporada de reproducción, antes de trasladarse a zonas de alimentación frente a la costa del norte de África. Algo similar fue reportado por James *et al.* (2005), para la tortuga laúd, *D. coriacea*; ellos detectaron que 4 machos rastreados desde los sitios de cópula de Nueva Escocia, Canadá, se movieron durante la temporada de reproducción en las cercanías de múltiples colonias de anidación pequeñas, posiblemente buscando oportunidades de apareamiento con hembras de cada sitio, lo que difiere con las hembras que normalmente muestran una gran fidelidad a los sitios específicos de reproducción y anidación (Broderick *et al.* 2002).

Esta visión sugiere que los machos además de aparearse con múltiples hembras de una misma colonia, también son capaces de fertilizar hembras en distintas áreas de reproducción e incluso de múltiples colonias. Además de que esto apunta hacia un flujo génico mediado por los machos (a diferencia de las hembras que tienden a ser fieles a sus playas de anidación), puede ser beneficioso para los machos, ya que maximiza sus posibilidades de reproducirse y, por lo tanto, les permite engendrar un mayor número de

descendientes. Por lo anterior, se ha sugerido que la paternidad múltiple en tortugas marinas en realidad es impulsada por los beneficios que conlleva para los machos el apareamiento con la mayor cantidad de hembras posible (Lee y Hays, 2004).

9.4. Proporción sexual operativa

Se sabe que las hembras de las tortugas marinas, aunque típicamente anidan más de una vez en una temporada, no lo hacen en años consecutivos. Una explicación de esta conducta es que éstas requieren una gran cantidad de energía para la producción de huevos y excavación de nidos (Hays y Speakman, 1991), por lo tanto, requieren de un intervalo post-anidación y de acceso a fuentes abundantes de alimento apropiado para recuperar una condición corporal apta para la reproducción (Coulson y Thomas, 1985). Estos sitios de alimentación, por los requerimientos de calidad de las hembras de tortugas marinas suelen estar localizados a distancias sustanciales de las playas de anidación, por lo que sus desplazamientos migratorios son vastos.

En contraste, el requerimiento de energía de los machos se limita a la producción de espermatozoides y su desplazamiento hacia las áreas de reproducción. Estas diferencias de requerimientos energéticos sugieren que las hembras necesitan varias temporadas (para algunas 3-5 años) para obtenerlos y por ello omiten su reproducción ese mismo periodo. En el caso de los machos, ellos pueden reproducirse con más frecuencia, incluso anualmente. Por otra parte, la receptividad de las hembras al apareamiento dentro una temporada de reproducción puede medirse en días (Comuzzie y Owens, 1990); mientras que, por el contrario, los machos pueden permanecer sexualmente activos hasta por varios meses (Wibbels *et al.*, 1990).

La combinación de una mayor frecuencia de reproducción estacional, así como un mayor tiempo de actividad sexual dentro de una temporada reproductiva, pueden dar lugar a proporciones sexuales operativas a favor de los machos, las cuales son altamente contrastantes con las proporciones sexuales primarias fuertemente sesgadas hacia las hembras observadas en la mayoría de las playas de anidación.

Wright *et al.* (2012) estimaron una proporción sexual operativa de 1.3 machos:hembra para *C. mydas* en el norte de Chipre (ver compendio en Tabla 21). Por su parte, Stewart *et al.* (2011) calcularon una proporción de sexos operacional de 1.4 machos:hembra para *D. coriacea* en Islas Vírgenes, E.U.A, lo que coincidió con lo reportado por Figgner *et al.* (2015) para la misma especie en la costa del Caribe de Costa Rica. Sin embargo, un mayor sesgo hacia los machos fue documentado por Lasala *et al.*

(2018) quienes determinaron una proporción de sexos en el sitio de cópula de 2.5 machos:hembra para *C. caretta* en la isla Sanibel, en el condado de Lee, Florida.

Aunque en estudios previos se han inferido proporciones sexuales sesgadas hacia los machos, la proporción sexual operativa calculada en esta investigación (en el caso de Las Cabras) es aún más inclinada hacia los machos: 3.8–4.2 machos:hembras.

La proporción sexual operativa es un parámetro fundamental del crecimiento de la población y los cambios asociados con respecto a los valores óptimos de esta proporción pueden llevar a una reducción del tamaño de la población (Lehikoinen *et al.*, 2008). Los sistemas de apareamiento de las tortugas marinas tienen particular relevancia para la conservación en relación con el cambio climático debido a la determinación sexual dependiente de la temperatura, lo que deriva en que la mayoría de las poblaciones tengan proporciones sexuales entre crías sesgada a las hembras, en las que se supone que la mayor frecuencia de reproducción de los machos proporciona un amortiguador contra el impacto del cambio climático en las relaciones de sexos de adultos (Hays *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2012).

Los sistemas de apareamiento de las tortugas marinas deben ser resistentes y flexibles para adaptarse a los cambios en el tamaño de la población y la proporción de sexo primario, influenciados por los climas y entornos cambiantes, lo que puede asociarse al comportamiento de apareamiento, incluida la búsqueda de pareja, la competencia y la elección de pareja (Jessop *et al.*, 1999; Weir *et al.*, 2011) y de esta manera reflejarse en cambios de las proporciones sexuales operativas.

Sí el cambio climático resulta en una población fuertemente sesgada hacia las hembras, entonces la capacidad de los machos para fertilizar los huevos de múltiples hembras puede determinar la viabilidad de la población (Boyle *et al.*, 2014) e influir en el tamaño efectivo de la población (Pearse y Anderson, 2009).

9.5. Relación entre rasgos de las hembras y paternidad múltiple

Son diversos los estudios que han buscado la relación entre características fenotípicas particulares de las hembras de tortugas marinas y la incidencia de paternidad múltiple en sus nidadas. No obstante, en muchos casos no se han encontrado relaciones significativas entre ambas variables; un ejemplo de ello es el estudio realizado por Ekanayake *et al.* (2013), quienes no encontraron relación significativa entre el largo curvo del caparazón (LCC) y la presencia de paternidad múltiple en la colonia de tortuga verde, *C. mydas*, que anida en Kosgoda, Sri Lanka, esto fue consistente con los hallazgos de

Lee y Hays, (2004) en la colonia de anidación de esta misma especie en la isla de Ascensión.

No obstante, Zbinden *et al.* (2007) encontraron que, para las tortugas bobas, *C. caretta*, que anidan en el Mediterráneo, las nidadas puestas por hembras más grandes exhiben paternidad múltiple con más frecuencia que las hembras más pequeñas; los autores sugieren que una posible explicación a este fenómeno es que las hembras más grandes nadan más rápido que las más pequeñas y, por lo tanto, pueden llegar al área reproducción más pronto y, por lo tanto, pasar más tiempo apareándose.

Lo anterior contrasta a lo observado en este estudio para la colonia de Las Cabras, en donde a pesar de que no se encontraron relaciones significativas entre variables genéticas y el fenotipo de las hembras, la relación entre el ancho curvo del caparazón (ACC) y el número de machos con el que se apareó cada una podría ser indicio de que las hembras más pequeñas posiblemente son fertilizadas por un mayor número de machos en comparación con las de mayor tamaño. Aunque la relación entre variables no fue fuerte, esta relación probablemente sería más robusta si se analizara a un mayor número de hembras. Sin embargo, suponiendo que la tendencia se confirma, es probable que esta relación se debe a que las hembras más pequeñas son más fácilmente manipuladas por machos durante la cópula por tener menos capacidad para defenderse del acoso de los machos que las de mayor tamaño. Para las hembras de *C. mydas* se han observado comportamientos característicos para evitar el cortejo de machos, que incluyen girarse para enfrentar al macho, huir del área, cubrir la cloaca con las aletas traseras, o varar (Booth y Peters 1972); algunas de estas estrategias probablemente también sean empleadas por *L. olivacea* para evitar la cópula, las cuales podrían ser más fácilmente ejecutadas por hembras más grandes y fuertes, dejando en desventaja a las más pequeñas.

A pesar de que pueden existir diferentes sugerencias acerca de que las características fenotípicas que favorecen el apareamiento con un mayor número de machos, todas estas deben de ser consideradas, ya que es posible que tanto las hembras como los machos de tortugas marinas empleen diferentes estrategias de apareamiento influenciadas por su edad, tamaño, condición física y experiencia (Wright *et al.*, 2013).

10. Conclusiones

- I. La frecuencia de paternidad múltiple estimada para El Verde y Las Cabras fue de 46% y 100%, respectivamente. Sin embargo, debido al pequeño tamaño de muestra de El Verde (cuatro crías en promedio) se considera los resultados para esta colonia solo como una estimación mínima cuando por su tamaño de muestra aceptable el de Las Cabras es confiable y represente el valor real para esta especie en la región. Este nivel de paternidad es de los más altos reportados para cualquier especie de tortugas marinas.
- II. El número máximo de padres estimados por nidada fue de 7, detectado en dos de las 13 nidadas muestreadas de Las Cabras, con lo que supera al número máximo de padres reportado por la mayoría de los estudios de este tipo e iguala a lo encontrado por Lasala *et al.* (2018) para *Caretta caretta*. No obstante, el promedio de padres por nido calculado en estudio fue de 4.5 mientras que, la media calculada por Lasala *et al.* (2018) fue de 2.5. El promedio de padres por nido deducido en esta investigación se encuentra entre los valores más altos documentados para las siete especies de tortugas marinas.
- III. Los resultados para nidadas con paternidad múltiple tanto en El Verde como en Las Cabras, sugieren que los porcentajes de fertilización de huevos tienden hacia un equilibrio entre los machos. Esto contrasta con lo reportado en otros estudios con tortugas marinas donde existe la predominancia de un macho en cada nidada.
- IV. La proporción sexual operativa calculada para ambas colonias, 1.5 machos:hembra para El Verde y 3.8-4.2 machos:hembra para Las Cabras, contrastó con la proporción sexual entre crías altamente sesgada hacia las hembras deducida para la gran mayoría de las playas de anidación de esta especie. Esto coincide con los hallazgos de estudios previos.
- V. El alto número de padres por nido detectado en combinación con la ausencia de machos dominantes sugiere que, por lo menos estas colonias de tortuga golfina y contrastando con lo reportado para otras especies, mantienen un sistema de apareamiento con sucesión rápida de machos entre cópulas sin la dominancia de ninguno.
- VI. La proporción sexual operativa fuertemente sesgada a los machos, así como el alto porcentaje de paternidad múltiple observado en este estudio, indica que en los sitios y temporadas de cópula para ambas colonias hay una alta densidad de machos con relación a la de las hembras.

11. Referencias

- Aggarwal, R.K.; Velavan, T.; Udaykumar, D.; Hendre, P.; Shanker, K.; Choudhury, B.; Singh, L. (2004). Development and characterization of novel microsatellite markers from the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Mol. Ecol. Notes* 4 (1), 77–79.
- Amos, W.; Worthington, W. J.; Fullard, K.; Burg, T. M.; Croxall, J. P.; Bloch, D.; Coulson, T. (2001). The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 268: 2021-2027.
- Aparicio, J. M.; Ortego, J.; Cordero, P. J. (2006). What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? *Molecular Ecology*. 15: 4659-4665.
- Arruda, M.P.; Gonçalves, E.C.; Schneider, M.P.; Da-Silva, A.L.; Versute, M.E. (2010). An alternative genotyping method using dye- labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. *Mol Biol Rep* 37:2031-2036.
- Balazs, G.H. (1994). Homeward bound: satellite tracking of Hawaiian green turtles from nesting beaches to foraging pastures. En: Schroeder, B.A.; Witherington, B.E. (Compiladores). *Proceedings of the Thirteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC- 341, pp. 205-208.
- Bernardo, J., Plotkin, P.T. (2007). An evolutionary perspective on the arribada phenomenon and reproductive behavioural polymorphism of olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*). Pp. 59-87. En: Plotkin, P.T. (Ed.). *Biology and conservation of ridley sea turtles*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD. 356 pp.
- Booth, J.; Peters, J.A. (1972). Behavioural studies on the green turtle (*Chelonia mydas*) in the sea. *Animal Behaviour*, 20, 808–812.
- Bowen, B. W.; Karl, S. A. (2007). Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Mol. Ecol.* 16:4886–4907.
- Boyle, M.; Hone, J.; Schwanz, L.E.; Georges, A. (2014). Under what circumstances do climate-driven sex ratios enhance versus diminish population persistence? *Ecol Evol* 4:4522–4533. <https://doi.org/10.1002/ece3.1316>
- Briseño-Dueñas, R. (1980). Aspectos biológico y protección de la tortuga golfinia *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz) en el Verde, Sinaloa. Tesis profesional. Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR, 54 pp.
- Broderick, A.C.; Glen, F.; Godley, B.J.; Hays, G.C. (2002). Estimating the number of green and loggerhead turtles nesting annually in the Mediterranean. *Oryx*, 36, 227–235.
- Brookfield, J. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency, *Molecular Ecology*, 5, 453-455. Brownstein, M. J.; Carpten, J. D.; Smith, J. R. (1996). Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* 20: 1004 – 1006, 1008 – 1010.
- Bytes, R.A. (1989). Satellite telemetry of Kemp's ridley sea turtle, *Lepidochelys kempii*, in the Gulf of Mexico. En: Eckert, S.A.; Eckert, K.L.; Richardson, T.H. (Compiladores). *Proceedings of the Ninth Annual Workshop on Sea Turtle Conservation and Biology*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFC-232, pp. 25-26.
- Bytes, R.A.; Swimmer, Y.B. (1994). Post-nesting migration of *Eretmochelys imbricata* in the Yucatan Peninsula. En: Bjorndal, K.A.; Bolten, A.B.; Johnson, D.A.; Eliazar, P.J. (Compiladores). *Proceedings of the Fourteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-351, p. 202.
- Chassin-Noria, O.; Macip-Ríos, R.; Dutton, P.; Oyama, K. (2017). Multiple paternity in the East Pacific green turtle (*Chelonia mydas*) from the Pacific coast of Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 495 (2017) 43–47.
- Chastel, O.; Weimerskirch, H.; Jouventin, P. (1995). Influence of body condition on reproductive decision and reproductive success in the blue petrel. *Auk* 112:964–972.
- Chakraborty, R.; De Andrade, M.; Daiger, S.P.; Budowle, B. (1992). Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*, 56, 45-47.
- Coltman, D. W.; Pilkington, J. G.; Smith, J. A.; Pemberton, J. M. (1999). Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. *Evolution*. 53: 1259-1267.

- Comuzzie, D.; Owens, D.W. (1990). A quantitative analysis of courtship behavior in captive green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Herpetologica* 46:195–202. <http://www.jstor.org/stable/3892904>
- Coulson, J. C.; Thomas, C. (1985). Differences in the breeding performances of individual kittiwake gulls, *Rissci tridrrctylu*. Pages 489–503 in R. M. Sibly and R. H. Smith, editors. Behavioural ecology: ecological consequences of adaptive behaviour. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
- Crim, J.L.; Spotila, L.D.; Spotila, J.R.; O'Connor, M.; Reina, R.; Williams, C.J.; Paladino, F.V. (2002). The Leatherback Turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. *Molecular Ecology* 11:2097–2106.
- Culley, T. M.; Stamper, T. I.; Stokes, R. L.; Brzyski, J. R.; Hardiman, N. A.; Klooster, M. R.; Merritt, B. J. (2013). An efficient technique for primer development and application that integrates fluorescent labeling and multiplex PCR. *Applications in Plant Sciences*, 1(10) 2013.
- Dima, A.; Solihin, D.; Manalu, W.; Boediono, A. (2015). Multiple Paternity Detection of Olive Ridley Turtle, *Lepidochelys olivacea* Populations by Microsatellite Marker as a Genetic Conservation Strategy at Taman Buru Bena, Timor Island. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)* (2015) Volume 22, No 1, pp 403-413
- Dodds, K.G.; Tate, M.L.; McEwan, J.C.; Crawford, A.M. (1996). Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. *Theoretical & Applied Genetics*, 92, 966-975.
- Duran, N.; Dunbar, S.G.; Escobar, R.A.; Standish, T.G. (2015). High frequency of multiple paternity in a solitary population of olive ridley sea turtles in Honduras. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Disponible en: www.elsevier.com/locate/jembe [Consultado: 09 de septiembre de 2016].
- Eckert, K.L.; Bjorndal, K.A.; Abreu-Grobois, F.A.; Donnelly, M. (eds). (1999). Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4. Washington D.C. 235 pp.
- Ekanayake, E.M.L.; Kapurusinghe, T.; Saman, M.M.; Rathnakumara, D.S.; Samaraweera, P.; Ranawana, K.B.; Rajakaruba, R.S. (2013). paternity of green turtle (*Chelonia mydas*) clutches laid at Kosgoda, Sri Lanka. *Herpetological Conservation and Biology* 8(1):27–36.
- Figgner, C.; Chacón-Chaverri, D.; Jesen, M.P.; Feldhaar, H. (2015). Paternity re-visited in a recovering population of Caribbean leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 475 (2016) 114-123.
- FitzSimmons, N. (1998). Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology*, 7:575-584.
- Frazier, J. (1991). Una evaluación del manejo de nido de tortugas marinas en la Península de Yucatán, p.37-76. En: Frazier, J., Vázquez, R., Galicia, E., Durán, R., Capurro, L. Memorias del IV Taller Regional sobre Programas de Conservación de Tortugas Marinas en la Península de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Frazier, J.G. (1999). Community-based conservation. En: Eckert, K.L.; Bjorndal, K.A.; Abreu-Grobois, F.A.; Donnelly, M. (eds.). Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4. Washington D.C. 235 pp.
- Gemmell, N.J.; Akiyama, S. (1996). An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends Genet* 12: 338-339.
- Gist, D.H.; Congdon, J.D. (1998) Oviductal sperm storage as a reproductive tactic of turtles. *J Exp Zool* 282:526–534. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(199811/12\)282:4<53.3.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(199811/12)282:4<53.3.CO;2-Q)
- Godfrey, M.H.; Barreto, R.; Mrosovsky, N. (1996). Estimating past and present sex ratios of sea turtles in Suriname. *Can J Zool* 74:267–277.
- Godley, B.J.; Broderick, A.C.; Frauenstein, R.; Hays, G.C. (2002). Reproductive seasonality and sexual dimorphism in green turtles. *Mar Ecol-Prog Ser* 226:125–13.
- Goldstein, D.; Schlotterer, C. (2000). Microsatellites, Evolution and Applications. Oxford University Press. Pp 25-28.
- González-Garza, B.; Stow, A.; Sánchez-Teyer, L.F.; Zapata-Perez, O. (2015). Genetic variation, multiple paternity, and measures of reproductive success in the critically endangered hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Ecology and Evolution*. 2015; 5 (24): 5758-5769.

- Hawkes, L.A.; Broderick, A.C.; Godfrey, M.H.; Godley, B.J. (2007). Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Glob Change Biol* 13:923–932.
- Hays, G. C.; Speakman, J.R. (1991). Reproductive investment and optimum clutch size of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Animal Ecology* 60:455–462.
- Hays, G.C.; Fossette, S.; Katselidis, K.A.; Schofield, G.; Gravenor, M.B. (2010). Breeding periodicity for male sea turtles, operational sex ratios, and implications in the face of climate change. *Conserv Biol* 24:1636–1643.
- Herbst, P. (1999). "*Lepidochelys olivacea*" (On-line), Animal Diversity Web. Disponible en: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Lepidochelys_olivacea.html [Consultado: 18 de marzo de 2018].
- Hoekert, W.E.J.; Neufeglise, H.; Schouten, A.D.; Menken, S.B.J. (2002). Multiple paternity and female biased mutation at a microsatellite locus in the Olive Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Heredity* 89:107–113.
- Howe, M.; FitzSimmons, N.N.; Limpus, C.J.; Clegg, S.M. (2017). Multiple paternity in a Pacific marine turtle population: maternal attributes, offspring outcomes and demographic inferences. *Mar Biol* (2018) 165:2.
- Hughes, G.R.; Luschi, P.; Mencacci, R.; Papi, F. (1998). The 7000- km oceanic journey of a leatherback turtle tracked by satellite. *J. of Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 229:209-217.
- Hughes, C.L.; Landry Jr., A.M. (2016). Long-Term Movements of an Adult Male Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempii*) in the Northwestern Gulf of Mexico. *Gulf of Mexico Science*, 2016(2), pp. 206–213.
- Ireland, J. S.; Broderick, A. C.; Glen, F.; Godley, B. J.; Hays, G. C.; Lee, P. L. M. (2003). Multiple paternity assessed using microsatellite markers, in green turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 291:149–160.
- James, M.C.; Eckert, S.A.; Myers, R.A. (2005). Migratory and reproductive movements of male leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *Mar Biol* 147:845–853.
- Jamieson, A. (1965). The genetics of transferrins in cattle. *Heredity*, 20, 419–440.
- Jensen, M. P.; Abreu-Grobois, F.; Frydenberg, J.; Loeschcke, V. (2006). Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. *Mol. Ecol.* 15:2567–2575.
- Jensen, M. P.; Fitzsimmons, N. N.; Dutton, P. H. (2013). Molecular genetics of sea turtles. Pp. 155–182 En Wyneken, J.; Lohmann, K. J.; Musick, J. A. eds. *Biology of sea turtles*, Vol. III. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Jessop TS, FitzSimmons NN, Limpus CJ, Whittier JM (1999) Interactions between behavior and plasma steroids within the scramble mating system of the promiscuous green turtle, *Chelonia mydas*. *Horm Behav* 36:86–97. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1527>
- Joblonski, P.; Vepsäläinen, K. (1995). Conflict between sexes in the water strider, *Gerris lacustris*; a test of two hypotheses for male guarding behavior. *Behavioral Ecology* 6:388-392.
- Jones, A.G. (2005). GERUD 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Mol. Ecol. Notes* 5 (3), 708–711.
- Joseph, J.; Shaw, P. W. (2011). Multiple paternity in egg clutches of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*). *Conserv. Genet.* 12:601–605.
- Kemppeaners, B.; Verheyen, G. R.; Van den Broeck, M. (1992). Extra-pair paternity results from female preference for high-quality males in the blue tit. *Nature*, 357:494-496.
- Kichler, K.; Holder, M. (2007). Phylogeography and Population Genetics. En: *Biology and conservation of ridley sea turtles*. The Johns Hopkins University Press. Maryland. 6: 107-118.
- Kichler, K.; Holder, M. T.; Davis, S. K.; Marquez, M. R.; Owens, D. W. (1999). Detection of multiple paternity in the Kemp's Ridley turtle with limited sampling. *Mol. Ecol.* 8:819–830.
- Kohn, M.; York E.; Kamradt D. (1999). Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 266, 1–7.
- Lasala, J.; Hughes, C.; Wyneken, J. (2018). Breeding sex ratio and population size of loggerhead turtles from Southwestern Florida. *PLoS ONE* 13(1): e0191615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191615>

- Lee, P.L.M.; Hays, G.C. (2004). Polyandry in a marine turtle: females make the best of a bad job. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (17), 6530–6535.
- Lee, P. L. M. (2008). Molecular ecology of marine turtles: new approaches and future directions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 356:25–42.
- Lee, P.; Schofield, G.; Haughey, R.; Mazaris, A.; Hays, G. (2017). A Review of Patterns of Multiple Paternity Across Sea Turtle Rookeries. *Advances in Marine Biology*. ISSN 0065-2881. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2017.09.004>
- Lehikoinen, A.; Christensen, T.K.; Öst, K.C.; Kilpi, M.; Saurola, P.; Vattulainen, A. (2008). Large-scale change in sex ratio of a declining eider *Somateria mollissima* population. *Wildl Biol* 14:288–301. [https://doi.org/10.2981/0909-6396\(2008\)14 \[288: LCITS R\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2981/0909-6396(2008)14 [288: LCITS R]2.0.CO;2)
- Luschi, P.; Hays, G.C.; Del Seppia, C.; Marsh, R.; Papi, F. (1998). The navigational feats of greenback sea turtles migrating from Ascension Island investigated by satellite telemetry. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265:2279-2284.
- Lutz, P.L.; Musick, J.A. (1977). *The biology of sea turtles*. 1° edición. Boca de Ratón, Florida, E.U.A: CRC Press. 466 pp.
- Márquez, R.; Villanueva, A.; Peñaflores, C. (1976). Sinopsis de datos biológicos sobre la Tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829). INP/52 Sinopsis sobre las Pesca. Instituto Nacional de Pesca, México, DF.
- Márquez, R. (1990). *FAO Species Catalogue. Vol.11 Sea Turtles of the World. An Annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO Fisheries Synopsis. No. 125, Vol. 11 Roma. 81 pp.*
- Márquez, R. (2002). *Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de cultura económica. 3ª edición. 198 pp.*
- Márquez-Millán, R.; Tiburcio-Pintos, G.; Sarti, L.; Enciso, F.; Briseño, R.; Rodríguez-Valencia, A.; Ocegüera, K.; Arias, K. (2004). Diagnóstico de la anidación de tortugas marinas en el Noroeste de México. En: UABCS/WWF. 2004. Taller de Conservación de Tortugas Marinas en el Noroeste Mexicano. Reporte del Taller (Editado por J.A. Rodríguez Valencia). WWF-México PGC-04-S120 D62. 145p.
- Mills, L.; Citta, J.; Lair, K.; Schwartz, M.; Tallmon, D. (2000). Estimating animal abundance using non-invasive DNA sampling: promise and pitfalls. *Ecological Applications*, 10, 283–294.
- Moore, M. K.; Ball, R. M. Jr. (2002). Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* 11:281– 288.
- Morán, P.; García-Vázquez, E. (1998). Multiple paternity in Atlantic salmon: a way to maintain genetic variability in relict populations. *Journal of Heredity*, 89, 551–553.
- Mudsuk, N.; Wansuk, S.; Somchai, M.; Narongdet, K. (2004). Detection of multiple paternity in green turtle clutches during a reproductive season at Khram Island, Thailand. *Proc Int Symp SEASTAR2000 Bio-logging Sci.* 2004:1-5.
- Mysing, J.O.; Vanselous, T.M. (1989). Status of satellite tracking of Kemp's ridley sea turtles. En: Caillouet, C.W. Jr.; Landry, A.M. Jr. (Eds.). *Proceedings of the First International Symposium on Kemp's Ridley Sea Turtle Biology, Conservation and Management. Texas A&M University Sea Grant College Publication TAMU-SG-89-105*, pp. 112-115.
- Nevoux, M.; Weimerskirch, H.; Barbraud, C. (2007). Environmental variation and experience-related differences in the demography of the long-lived black-browed albatross. *J Anim Ecol* 76:159–167.
- Oetting, W.S.; Lee, H.K.; Flanders, D.J.; Weisner, G.L.; Sellers, T.A.; King, R.A. (1995) Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed cebador. *Genomics* 30: 450-458.
- Owens, D.W.; Ruiz, G.J. (1980). New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica*. 36:17-20.
- Paetkau, D.; Strobeck, C. (1994). Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, 3, 489–495.
- Paetkau, D.; Waits, L.P.; Clarkson, P.L. (1998). Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conservation Biology*, 12, 418–429.
- Palacios, M. D. (2012). Frecuencia de paternidad múltiple y efecto paterno en *Lepidochelys olivacea* de Maruata, Michoacán. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias UMSNH.

- Pearse, D.; Avise, J. (2001). Turtle mating systems: behaviour, sperm storage, and genetic paternity. *J. Hered.* 92:206–211.
- Pearse, D.E.; Janzen, F.J.; Avise, J.C. (2002). Multiple paternity, sperm storage, and reproductive success of female and male painted turtles (*Chrysemys picta*) in nature. *Behav Ecol Sociobiol.* 51:164–171.
- Pearse, D.E.; Anderson, E.C. (2009). Multiple paternity increases effective population size. *Mol Ecol* 18:3124–3127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04268.x>
- Pieau, C. (1996). Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays*, 18(1):19-26.
- Plotkin, P.T.; Byles, R.A.; Rostal, D.C.; Owens, D.W. (1995). Independent versus socially facilitated oceanic migrations of the olive ridley, *Lepidochelys olivacea*. *Marine Biology* 122:137-143.
- Phillips, K.; Jorgensen, T.; Jolliffe, K.; Jolliffe, S.; Henwood, J.; Richardson, D. (2013). Reconstructing paternal genotypes to infer patterns of sperm storage and sexual selection in the hawksbill turtle. *Molecular Ecology* (2013) 22, 2301–2312. doi: 10.1111/mec.12235.
- Pritchard, P. (1979). *Encyclopedia of turtles*. Sea turtles, Chapter 9. England Publications, Londres. 389 p.
- Pritchard P.C.H. 2003. Condición Global de las Tortugas Marinas. Primera Conferencia de Las Partes: Primera Parte. INFO-001. En: Secretaría CIT, Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas – Informe Final Primera Conferencia de las Partes Contratantes. Secretaría Pro Tempore de la Conservación Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas. San José, Costa Rica. 81-93 p.
- Reed, J.Z.; Tollit, D.; Thompso, P.; Amos, W. (1997). Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex, and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology*, 6, 225–234.
- Renaud, M.L.; Carpenter, J.A.; Williams, J.A.; Landry, A.M. (1996). Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*) tracked by satellite telemetry from Louisiana to nesting beach at Rancho Nuevo, Tamaulipas, Mexico. *Chelonian Conservation and Biology* 2:108-109.
- Sakamoto, W.; Bando, T.; Arai, N.; Baba, N. (1997). Migration paths of adult female and male loggerhead turtles *Caretta caretta* determined through satellite telemetry. *Fisheries Science* 63:547-552.
- Schroeder, B.A.; Ehrhart, L.M.; Balazs, G.H. (1996). Postnesting movements of Florida green turtles: preliminary results from satellite telemetry. En: Keinath, J.A.; Barnard, D.E.; Musick, J.A.; Bell, B.A. (Compiladores). *Proceedings of the Fifteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-387, p. 289.
- Schuelke M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18, 233–234.
- Shamblin, B. M.; Faircloth, B. C.; Dodd, M.; Wood-Jones, A.; Castleberry, S. B.; Carroll, J. P.; Nairn, C. J. (2007). Tetranucleotide microsatellites from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology Notes*, 7(5), 784-787.
- Shamblin, B. M.; Faircloth, B. C.; Dodd, M. G.; Bagley, D. A.; Ehrhart, L. M.; Dutton, P. H.; Nairn, C. J. (2008). Tetranucleotide markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and their cross-amplification in other marine turtle species. *Conservation Genetics*, 10(3), 577-580.
- Shaver, D.J. (2001). Geological Survey/National Park Service Kemp's ridley sea turtle research and monitoring programs in Texas. En: McKay, M.; Nides, J.; Lang, W.; Vigil, D. (Eds.). *Proceedings of the Gulf of Mexico Marine Protected Species Workshop*. U.S. Dept. of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region, MMS-2001-039, pp. 121-124.
- Shaver, D.J.; Schroeder, B.A.; Byles, R.A.; Burchfield, P.M.; Peña, J.; Márquez, R.; Martínez, H.J. (2005). Movements and Home Ranges of Adult Male Kemp's Ridley Sea Turtles (*Lepidochelys kempii*) in the Gulf of Mexico Investigated by Stellite Telemetry. *Chelonian Conservation and Biology*, 2005, 4(4):817–827.
- Spotila, J.R.; O'Connor, M.P.; Paladino, F.V. (1997). Thermal Biology, in *The Biology of Sea Turtles*, Eds: P.L. Lutz y J.A. Musick (Eds.), 297–314.
- Stewart, K.R.; Dutton, P. H. (2011). Paternal genotype reconstruction reveals multiple paternity and sex ratios in a breeding population of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *Research Article. Conserv Genet* (2011) 12: 1101-1113.

- Theissinger, K.; FitzSimmons, N.; Limpus, C.; Parmenter, C.; Phillott, A. (2009). Mating system, multiple paternity and effective population size in the endemic flatback turtle (*Natator depressus*) in Australia. *Conserv. Genet.* 10 (2), 329–346.
- Thermo Scientific. (2010). T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers, 260/280 and 260/230 Ratios. Disponible en: <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> [Consultado:10 de octubre de 2017].
- Thornhill, R.; Alcock, J. (1983). *The evolution of insect mating systems*. Cambridge (MA): Harvard University Press.
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, P.M.D.; Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535–538.
- Varo-Cruz, N., Monzón-Argüello, C., Carrillo, M., Calabuig, P., Liria-Loza, A. (2015). Tortuga olivácea - *Lepidochelys olivacea*. En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Salvador, A., Marco, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. Disponible en: <http://www.vertebradosibericos.org/> [Consultado: 19 de marzo de 2018].
- Wagner, R. (1992). Behavioral and breeding-habitat related aspects of sperm competition in razorbills. *Behavior*, 123: 1-25.
- Waits, J.; Leberg, P. (2000). Biases associated with population estimation using molecular tagging. *Animal Conservation*, 3, 191–199.
- Waits, L.; Luikart, G.; Taberlet, P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* (2001) 10, 249–256.
- Wang, J. (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166 (4), 1963–1979.
- Weir LK, Grant JWA, Hutchings JA (2011) The influence of operational sex ratio on the intensity of competition for mates. *Am Nat* 177:167–176. <https://doi.org/10.1086/657918>
- Wesneat, D.F.; Sherman, P.W.; Morton, M.L. (1984). The ecology and evolution of extra-pair copulations in birds: Sperm competition and the evolution of animal mating systems. En: *Current Ornithology*. (ed. PowerDM), pp. 331-369.
- White, P.C.; Densmore, L.D. (1992). Mitochondrial DNA Isolation. pp. 29-58 En: Hoezel, A.R. (ed). *Molecular Genetic Analysis of Populations: a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press, N.Y.
- Wibbels, T, Owens, D.W.; Limpus, C.J.; Reed, P.C.; Amoss, M.S. (1990). Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating and nesting in loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Gen Comp Endocrinol* 79:154–164. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90099-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90099-8)
- Wibbels, T. (2003). Critical approaches to sex determination turtles. En: Lutz P.L.; Musik, J.A.; Wineken, J. (eds). *The biology of sea turtles Vol. 2*. CRC Press Inc., Boca Ratón Florida. 103-134.
- Wright, L.; Fuller, W.; Godley, B.; McGowan, A.; Tregenza, T; Broderick, A. (2012). Reconstruction of paternal genotypes over multiple breeding seasons reveals male green turtles do not breed annually. *Molecular Ecology* (2012) 21, 3625–3635.
- Wright, L.; Fuller, W.; Godley, B.; McGowan, A.; Tregenza, T.; Broderick, A. (2013). No benefits of polyandry to female green turtles. *Behavioral Ecology*. doi:10.1093/beheco/art003
- Wyneken, J. (2001). *The anatomy of sea turtles*. NOAA Technical Memorandum NMFSSSEFSC-470. 172 pp.
- Zbinden, J.; Largiadér, C.; Leippert, F.; Margaritoulis, D.; Arlettaz, R. (2007). High frequency of multiple paternity in the largest rookery of Mediterranean loggerhead sea turtles. *Molecular Ecology*. 16: 3703-3711.
- Zug, G.R., M. Chaloupka, G.H. Balazs. (2006). Age and growth in olive ridley seaturtles (*Lepidochelys olivacea*) from the North-central Pacific: a skeletochronological analysis. *Marine Ecology*, 27:263-270.

12. Anexos

Anexo 1. Fórmulas de buffers empleados en el protocolo de purificación de muestras de ADN con sílica

Algunas de las soluciones descritas en el protocolo de purificación de ADN con sílica pueden estar incluidas en un sistema de extracción de ADN comercial; pero se puede reemplazar con los siguientes buffers:

Buffer de extracción:

100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% SDS, 0% mM EDTA, pH 8.0).

Buffer GT:

- Qiagen Buffer PB :5 M Gu-HCl, 30% isopropanol, agregue 5 volúmenes a 1 volumen de PCR/enzymatic reaction.
- Qiagen Buffer PB (Enzymax variant): 5 M Gu-HCl, 20 mM Tris-HCl pH 6.6, 30% etanol

Buffer de lavado:

- Qiagen Buffer PE: (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 80% ethanol) lavar dos veces con 750 uL.
- 5X Qiagen Buffer PE (Enzymax Variant): (80 mM NaCl, 8mM Tris-HCl pH 7.5) Diluir a 1X con 100% etanol, concentración 1X: 16 mM NaCl, 1.6 mM Tris-HCl pH 7.5, 80% EtOH.
- GE Wash buffer: (2mM Tris-Cl pH8; 0.2mM EDTA and 80% ethanol) muy similar a Qiagen, funcionará indistintamente. GE usar 400 uL para dos lavados, pero 750 uL como Qiagen es probablemente mejor.

Tomado de: <http://pipettejockey.com/2017/06/16/dont-throw-those-silica-dna-purification-columnsbuffers-away-use-them-up/>

Anexo 2. Genotipos de madres y crías de las colonias de anidación de El Verde y Las Cabras

Tabla 22. Genotipos maternos de la colonia de anidación de *Lepidochelys olivacea* de El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa.

Genotipos Maternos para la colonia de anidación de El Verde										
Madre	OR11		OR16		OR1		OR2		OR4	
EV0145	166	170	246	246	230	232	186	186	152	164
EV1081	170	182	248	258	220	232	172	186	164	170
EV1257	166	186	246	246	230	232	184	186	154	158
EV1477	170	182	246	246	214	214	172	186	148	160
EV1803	166	196	256	258	240	242	172	172	148	166
EV1811	166	170	254	256	228	242	186	190	156	162
EV1818	166	190	246	256	214	228	182	190	152	154
EV1822	166	166	246	246	214	236	172	172	158	172

EV1825	166	182	246	246	226	234	184	190	150	152
EV1835	186	186	244	248	214	214	172	186	152	160
EV1843	166	166	244	248	232	242	172	186	158	160
EV1846	166	166	246	260	226	230	174	194	148	166
EV1847	166	166	246	246	224	226	174	186	150	152
EV1869	166	178	246	256	232	238	172	172	148	164
EV1877	166	190	246	246	228	242	172	184	148	150
EV1883	170	170	246	258	240	242	172	172	144	148
EV1885	186	190	246	256	222	242	172	188	150	152
EV1886	182	182	246	258	232	242	172	188	164	172
EV1900	174	178	246	262	228	230	170	172	150	166
EV1924	176	204	256	256	234	236	172	190	154	156
EV1930	170	178	246	258	228	230	172	190	156	160
EV1932	170	178	246	260	214	230	172	172	156	160
EV1942	166	194	246	246	214	232	186	190	150	152
EV1943	178	182	248	260	232	234	172	182	154	160
EV1948	170	196	246	246	234	236	184	188	150	152
EV1952	182	186	248	258	214	232	172	184	148	150
EV1982	170	178	246	256	226	230	172	172	148	162
EV1998	166	178	246	256	214	236	172	184	156	160
EV1999	166	170	246	246	240	242	172	172	148	150
EV2011	166	170	246	246	236	242	188	190	152	156
EV2014	182	196	244	246	226	242	170	172	150	152
EV2025	178	182	244	244	214	228	172	190	150	152
EV2026	166	166	250	264	242	244	172	186	148	162
EV2029	170	190	244	246	238	240	172	172	150	152
EV2038	166	170	254	254	238	240	172	188	152	154
EV2069	178	196	258	260	214	226	172	188	152	160
EV2094	186	190	244	244	234	236	186	198	166	168

Tabla 23. Genotipos de crías de la colonia de anidación de *Lepidochelys olivacea* de El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa.

Genotipos de las crías para la colonia de anidación de El Verde										
Cría	OR11		OR16		OR1		OR2		OR4	
EV0145-I_E3C	170	182	246	248	232	234	172	186	152	176
EV0145-I_E4C	166	170	246	248	230	232	172	186	152	154
EV0145-I_E5M	166	170	246	248	230	232	172	186	152	154
EV1081-I_CM4C	182	190	248	258	220	228	172	190	164	170
EV1081-I_E2C	182	190	258	260	220	228	172	190	154	170
EV1081-II_CM2C	182	190	248	258	220	220	186	190	164	170
EV1081-II_E1C	170	170	246	248	220	228	172	190	164	170

EV1081-III_E3C	182	182	246	248	212	232	172	172	154	164
EV1081-III_E4C	182	204	258	260	232	234	172	190	154	164
EV1257-I_E7C	182	186	246	246	230	232	186	190	152	158
EV1257-I_E8C	166	166	246	246	230	232	182	184	154	158
EV1257-I_E9M	170	186	246	248	230	232	184	186	154	186
EV1257-II_CM3C	182	186	246	246	230	232	182	186	152	154
EV1257-II_CM4C	166	186	246	246	230	232	186	190	152	154
EV1257-II_E2M	170	186	246	246	230	232	184	186	154	166
EV1477-I_CM3C_	170	182	246	248	214	226	172	186	144	160
EV1477-I_E17Gg	170	182	246	246	214	214	172	186	160	160
EV1477-I_E18Gp	170	182	246	246	214	214	172	186	160	160
EV1477-I_E1C	170	182	246	246	214	214	172	172	148	160
EV1477-I_E2M	170	174	246	246	214	214	172	186	148	160
EV1477-I_E3M	174	182	246	246	214	214	184	186	148	148
EV1477-I_E4M	170	182	246	246	214	214	184	186	148	160
EV1477-I_E5M	170	170	246	246	214	214	184	186	160	160
EV1803-I_CM1C	186	196	248	256	238	240	172	172	148	154
EV1803-I_CM2C	166	186	248	256	238	240	172	172	148	154
EV1803-I_E20Gp	186	196	248	258	242	244	170	172	148	160
EV1803-I_E21Gg	186	196	248	258	242	244	172	172	154	166
EV1803-II_E2C	186	196	258	260	238	240	172	172	154	166
EV1803-II_E4M	166	166	248	256	242	244	172	172	154	166
EV1803-II_E5M	166	196	256	260	242	244	172	172	148	154
EV1803-II_E6M	166	186	258	260	238	240	172	172	154	166
EV1803-II_E7Gg	166	186	256	260	238	240	172	172	148	154
EV1803-II_E8Gp	166	186	256	260	238	240	172	172	148	154
EV1811-I_E34C	170	170	246	256	222	228	186	190	156	166
EV1811-I_E36C	166	170	246	256	228	236	186	186	156	160
EV1811-I_E38M	170	174	248	256	222	242	186	186	162	166
EV1811-I_E39M	170	170	248	256	222	242	186	190	156	160
EV1811-II_E2M	170	170	248	256	236	242	186	186	152	156
EV1811-II_E8M	170	170	248	256	236	242	186	190	152	156
EV1818-I_E12C	174	190	246	256	226	228	182	196	150	152
EV1818-I_E13C	166	166	246	256	226	228	190	196	150	152
EV1818-I_E1M	166	174	246	250	214	226	182	196	152	154

EV1818-I_E2M	166	190	246	256	214	226	182	196	150	152
EV1818-II_E3C	166	166	246	248	214	226	182	182	150	152
EV1818-II_E5M	166	186	246	256	228	240	182	182	148	152
EV1818-II_E6G	166	186	246	246	228	232	182	182	150	152
EV1818-II_E7G	166	186	246	246	228	232	182	182	150	152
EV1822-I_CM3C	166	186	246	260	214	236	172	172	152	158
EV1822-I_CM4C	166	186	246	248	236	236	172	172	152	158
EV1822-I_E1C	166	166	246	248	228	236	172	174	172	172
EV1825_E2	170	182	246	246	232	234	186	190	150	152
EV1825_E3	170	182	138	246	232	234	186	190	150	152
EV1835-I_E1C	178	186	246	248	214	226	172	172	152	160
EV1835-I_E2C	178	186	246	248	214	226	172	186	150	152
EV1835-III_E1C	178	186	246	248	214	226	172	172	152	160
EV1843_E1	166	170	248	260	214	242	172	186	158	160
EV1843_E2	166	170	248	260	214	242	172	186	158	160
EV1846-I_CM3C	166	166	246	260	226	228	174	186	148	166
EV1846-I_CM4C	166	182	248	260	230	232	184	194	166	170
EV1846-I_E1M	166	174	246	258	230	232	174	174	148	166
EV1846-I_E4M	166	182	246	258	230	232	186	194	160	166
EV1846-I_E5M	166	174	246	246	230	232	186	194	148	162
EV1846-II_E4M	166	166	246	260	226	228	186	194	148	166
EV1846-II_E5M	166	174	246	258	226	228	186	194	162	166
EV1847_E7	166	190	246	246	220	226	174	186	150	152
EV1869-II_E3C	166	178	246	246	232	234	172	192	154	164
EV1869-II_E4C	166	166	248	256	238	240	172	186	148	148
EV1869-II_E6M	166	178	246	248	238	240	172	186	148	148
EV1869-II_E7M	166	166	246	246	232	234	172	172	148	186
EV1877-I_CM1C	170	190	246	246	228	242	172	172	144	148
EV1877-I_CM2C	190	190	246	248	228	242	172	184	148	150
EV1877-II_E3C	190	196	246	246	242	244	172	184	148	150
EV1877-II_E4C	190	190	246	248	242	244	172	172	148	150
EV1883_E4	170	178	244	246	240	242	172	186	144	148
EV1883_E5	170	178	244	246	240	242	172	186	144	148
EV1883_E6	170	170	246	246	240	242	172	174	144	148
EV1883_E7	170	170	246	246	240	242	172	194	144	148

EV1885_E4	186	186	256	262	242	244	188	190	152	154
EV1885_E5	186	186	256	262	242	244	188	190	152	154
EV1886_E2	170	182	244	258	242	244	172	190	150	172
EV1886_E3	170	182	244	258	240	242	172	190	150	172
EV1900-I_E4C	174	182	246	256	230	232	170	172	150	152
EV1900-I_E5M	174	190	246	248	230	232	170	186	166	170
EV1900-II_E4C	174	178	254	262	226	228	170	172	148	150
EV1900-II_E5M	178	182	246	262	238	240	172	186	150	152
EV1924_E4	166	204	248	256	232	234	172	172	144	154
EV1924_E5	166	204	248	256	232	234	172	172	144	154
EV1930-I_E3C	178	190	246	246	226	228	172	172	156	160
EV1930-I_E4C	170	170	246	246	226	228	186	190	160	162
EV1930-I_E5M	178	178	258	258	230	232	186	190	156	160
EV1930-I_E6M	170	178	246	246	230	232	172	172	156	160
EV1930-II_E2C	170	178	246	258	230	232	186	190	152	160
EV1930-II_E4C	170	178	246	246	230	232	172	172	152	160
EV1932_E16	170	174	260	260	214	232	172	186	148	160
EV1932_E17	170	174	260	260	214	232	172	186	148	160
EV1942_E6	190	194	246	248	214	232	172	186	150	152
EV1942_E7	190	194	246	248	214	232	172	186	150	152
EV1943-I_E3C	178	194	246	248	214	232	172	182	148	160
EV1943-I_E4C	174	182	246	248	214	232	172	182	148	160
EV1943-I_E5G	174	182	246	248	214	232	172	182	154	160
EV1943-I_E6G	174	182	246	260	230	232	172	182	154	160
EV1943-II_E3C	174	182	246	248	214	232	172	172	152	160
EV1943-II_E4C	174	178	246	248	230	232	172	172	152	160
EV1943-II_E5G	174	178	246	248	230	232	182	190	152	154
EV1943-II_E6G	174	178	246	248	230	232	172	184	152	154
EV1948_E7	166	196	246	248	234	236	170	184	148	150
EV1948_E8	166	196	246	246	234	236	170	184	148	150
EV1952_E2	182	196	246	258	226	232	172	172	150	152
EV1952_E3	182	196	246	258	226	232	172	172	150	152
EV1982-II_E3C	170	182	246	250	226	232	172	188	162	166
EV1982-II_E4C	166	170	244	246	224	226	172	174	144	148
EV1982-II_E5M	178	182	250	256	230	232	172	188	144	148

EV1998_E5	166	178	246	246	234	236	172	172	160	162
EV1998_E6	166	178	246	246	234	236	170	172	160	162
EV1999_E7	166	170	246	246	230	242	172	186	150	152
EV1999_E8	166	170	246	246	230	242	172	186	150	152
EV2011-I_E10C	166	170	246	260	234	236	186	190	150	156
EV2011-I_E1M	166	170	246	246	230	242	186	190	150	156
EV2011-I_E2M	166	170	246	246	230	236	186	190	148	152
EV2011-I_E3M	166	170	246	246	236	242	186	190	150	156
EV2011-I_E5M	166	170	246	248	230	242	174	190	150	152
EV2011-I_E6M	166	170	246	256	230	242	174	188	148	152
EV2011-I_E7M	166	170	246	248	230	242	190	190	148	152
EV2011-I_E8M	166	170	246	246	230	242	186	190	154	156
EV2011-I_E9C	166	170	246	248	230	236	174	188	150	156
EV2011-II_E1M	166	170	246	260	230	236	174	190	152	154
EV2014-I_E1M	178	196	244	246	222	242	170	172	152	158
EV2014-III_CM3C	166	196	244	246	226	242	170	172	148	150
EV2014-III_CM4C	166	182	246	246	226	242	170	172	148	150
EV2025_E6	170	178	244	248	228	232	190	196	148	150
EV2025_E7	170	178	244	248	228	232	190	196	148	150
EV2026-I_CM3C	166	178	246	250	240	242	184	186	148	158
EV2026-I_CM4C	166	178	250	264	240	242	172	172	148	154
EV2026-I_E1M	166	178	250	264	242	244	172	186	148	158
EV2026-II_CM1Gg	166	178	246	264	240	242	172	186	148	154
EV2026-II_CM2Gp	166	166	250	252	240	242	172	172	148	154
EV2026-II_E1M	166	174	250	252	240	242	172	172	148	154
EV2029_CM3C	170	178	244	246	238	240	172	174	148	150
EV2029_CM4C	170	178	244	244	238	240	172	188	150	152
EV2029_E10M	166	170	244	246	238	240	172	172	150	152
EV2029_E11M	170	174	244	244	238	240	172	186	150	152
EV2029_E12M	170	190	244	244	240	242	172	172	150	152
EV2029_E13M	166	170	244	246	238	240	172	172	150	152
EV2029_E14M	166	190	244	246	240	242	172	186	150	152
EV2029_E16M	166	170	244	246	238	240	172	188	150	152
EV2029_E17M	166	170	244	246	238	240	172	186	150	152
EV2029_E18M	174	190	244	246	238	240	172	174	150	152

EV2029_E19M	166	170	244	244	238	240	172	172	150	152
EV2029_E1M	170	190	244	246	240	242	172	186	150	152
EV2029_E20M	170	190	244	246	238	240	172	188	150	152
EV2029_E21M	170	170	244	246	238	240	172	186	150	152
EV2029_E22M	166	170	244	246	238	240	172	172	150	152
EV2029_E23M	166	170	244	244	238	240	172	186	150	152
EV2029_E2M	166	190	244	246	240	242	172	172	150	152
EV2029_E3M	166	170	244	244	238	240	172	186	150	152
EV2029_E4M	170	190	244	244	238	240	172	174	150	152
EV2029_E5M	170	170	244	246	238	240	172	188	148	150
EV2029_E6M	170	174	244	246	238	240	172	174	150	152
EV2029_E7M	170	170	244	246	238	240	172	188	150	152
EV2029_E8M	170	178	244	246	238	240	172	174	148	150
EV2038_E3	166	174	254	256	228	240	172	196	150	152
EV2038_E4	166	174	254	256	228	240	172	196	150	152
EV2069-I_E3C	178	186	246	260	226	226	172	188	160	166
EV2069-I_E4C	170	196	246	260	214	214	172	188	160	166
EV2069-I_E5M	170	196	246	260	214	214	172	188	160	166
EV2069-I_E7M	170	178	246	260	214	214	172	188	152	154
EV2069-I_E8M	170	196	246	260	214	214	172	172	160	166
EV2094_E1	174	190	244	254	234	236	186	190	148	168
EV2094_E2	174	190	244	254	234	236	186	190	148	168
EV2094_E3	182	190	244	254	234	236	190	198	148	168
EV2094_E4	182	190	244	254	234	236	190	198	148	168
EV2094_E6	174	186	244	246	234	236	190	198	156	168
EV2094_E7	174	186	244	254	234	236	190	198	156	168

Tabla 24. Genotipos maternos de la colonia de anidación de *Lepidochelys olivacea* de Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.

Genotipos Maternos para la colonia de Las Cabras								
Madre	OR4		OR11		CcP7D04		Cc1G02	
N009-M1	174	176	248	260	378	390	286	310
N047-M2	154	154	238	244	350	382	290	302
N074-M3	152	170	220	242	350	380	298	302
N123-M4	160	166	250	250	396	410	286	326
N198-M5	154	156	238	238	354	392	298	302

N310-M6	150	158	220	240	368	374	306	310
N345-M7	168	170	226	238	346	370	302	306
N512-M8	154	160	244	250	358	382	302	318
N654-M9	156	170	238	244	354	362	290	298
N657-M10	160	164	238	254	384	384	280	330
N706-M11	150	154	220	248	350	362	290	322
N772-M12	154	164	250	258	362	384	290	302
N828-M13	164	176	220	220	360	390	298	332

Tabla 25. Genotipos de crías de la colonia de anidación de *Lepidochelys olivacea* de Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.

Genotipos de las crías para la colonia de Las Cabras								
Cría	OR4		OR11		CcP7D04		Cc1G02	
N009-1	152	174	248	250	352	390	290	310
N009-2	154	174	250	260	366	378	310	322
N009-3	158	174	250	260	352	390	310	322
N009-4	152	174	248	250	352	378	290	310
N009-5	158	176	248	250	352	390	290	310
N009-6	158	176	248	250	366	378	286	290
N009-7	158	176	224	248	352	378	286	322
N009-9	154	176	224	248	352	390	310	322
N009-11	166	176	238	248	352	390	286	290
N009-13	158	176	248	250	352	378	310	322
N009-14	166	176	238	248	352	390	290	310
N009-15	152	176	248	260	352	390	286	322
N009-16	152	176	248	260	352	378	290	310
N009-17	152	176	248	260	366	390	286	322
N009-18	152	174	248	260	352	378	286	290
N009-19	152	176	248	260	352	378	286	290
N009-20	148	176	238	248	352	378	290	310
N047-1	154	166	238	250	350	352	290	302
N047-2	154	166	238	250	380	382	302	302
N047-3	154	166	238	250	350	380	290	302
N047-4	154	164	238	238	350	352	290	302
N047-5	154	166	238	250	350	380	290	302
N047-6	154	166	238	250	380	382	290	302
N047-7	154	164	238	250	380	382	302	302
N047-8	154	154	238	250	380	382	290	290
N047-9	154	166	244	250	350	352	302	302
N047-10	154	166	238	250	350	380	290	302
N047-11	154	164	238	250	350	380	290	302
N047-12	154	166	230	238	352	382	290	302
N047-13	154	166	244	250	350	380	290	302

N047-14	154	166	238	250	350	380	290	302
N047-15	154	166	238	250	350	380	302	302
N047-16	154	166	238	250	350	380	302	302
N047-17	154	164	238	244	358	382	302	318
N047-18	154	174	244	250	360	382	302	306
N047-19	154	166	238	250	350	352	302	302
N047-20	154	154	238	246	352	382	290	290
N074-1	152	170	220	242	350	382	302	304
N074-2	152	154	220	246	350	396	298	302
N074-3	152	154	220	220	380	396	298	302
N074-4	152	154	242	246	350	382	298	302
N074-5	152	168	232	242	350	396	298	298
N074-6	152	168	220	246	350	382	298	298
N074-7	170	176	220	232	350	382	298	298
N074-8	152	156	220	242	350	382	302	302
N074-9	152	176	220	232	380	396	298	302
N074-10	152	168	232	242	380	382	298	302
N074-11	152	168	232	242	380	382	298	302
N074-12	152	174	232	242	350	382	298	298
N074-13	152	156	242	250	350	376	286	302
N074-14	152	154	232	242	380	396	298	302
N074-15	152	176	220	232	350	396	298	302
N074-16	170	176	220	232	380	396	298	302
N074-17	152	166	220	232	350	382	302	302
N074-18	152	166	232	242	350	382	302	302
N074-19	152	166	232	242	350	382	298	302
N074-20	152	170	220	242	350	374	302	310
N123-1	156	166	238	250	374	410	286	322
N123-2	156	160	238	250	368	410	302	326
N123-3	156	166	238	250	374	396	302	326
N123-4	156	160	246	250	368	410	302	326
N123-5	152	166	246	250	368	396	286	322
N123-6	152	166	238	250	374	396	286	322
N123-7	156	166	246	250	368	410	302	326
N123-8	156	166	238	250	374	396	286	302
N123-9	156	160	246	250	374	410	302	326
N123-10	152	160	238	250	368	396	286	302
N123-11	156	160	246	250	374	396	322	326
N123-12	152	166	238	250	368	410	322	326
N123-13	152	166	238	250	374	396	302	326
N123-14	152	166	246	250	368	410	286	302
N123-15	156	160	246	250	368	410	286	322
N123-16	156	166	238	250	374	410	286	302

N123-17	156	160	246	250	374	410	286	302
N123-18	156	166	246	250	374	396	286	322
N123-19	152	166	246	250	374	410	286	322
N123-20	152	166	246	250	374	410	286	302
N198-1	156	158	238	242	362	392	302	306
N198-2	154	160	220	238	368	392	302	306
N198-3	156	158	220	238	368	392	298	306
N198-4	156	158	238	242	368	392	302	318
N198-5	154	160	220	238	362	392	302	306
N198-7	154	166	218	238	354	362	298	318
N198-8	154	166	218	238	368	392	298	306
N198-10	154	156	238	238	354	392	298	302
N198-11	154	158	238	238	354	392	302	318
N198-12	154	156	238	242	354	368	298	318
N198-13	156	160	220	238	354	362	302	306
N198-14	154	160	238	242	368	392	298	318
N198-15	156	158	220	238	362	392	302	318
N198-17	154	166	218	238	362	392	298	318
N198-18	154	160	238	242	354	368	302	306
N198-19	156	160	220	238	362	392	302	306
N198-20	154	166	218	238	354	368	298	306
N310-1	150	158	220	234	366	368	306	356
N310-2	158	158	220	234	366	374	310	356
N310-3	158	158	220	234	354	374	290	310
N310-4	156	158	240	246	354	368	290	310
N310-5	158	162	220	238	352	374	310	310
N310-6	156	158	240	246	366	368	290	310
N310-7	150	160	220	234	354	374	290	310
N310-8	156	158	240	246	354	368	306	356
N310-9	150	156	240	246	354	368	290	310
N310-10	150	156	240	246	366	368	306	356
N310-11	156	158	240	246	354	374	290	306
N310-12	158	160	220	234	354	368	290	306
N310-13	150	158	220	234	354	368	290	310
N310-14	150	160	220	234	366	368	310	356
N310-15	156	158	240	246	354	368	290	306
N310-17	156	158	240	246	366	368	310	356
N310-18	150	156	220	238	362	368	286	306
N310-20	158	160	220	234	366	374	290	310
N345-3	158	168	226	238	370	370	302	306
N345-4	154	170	226	238	370	370	304	306
N345-5	164	170	238	250	370	380	302	306
N345-6	164	170	232	238	346	354	306	310

N345-7	158	170	232	238	346	354	302	310
N345-8	154	170	226	238	346	352	302	334
N345-9	158	168	226	236	346	354	302	334
N345-10	164	170	226	232	346	354	306	310
N345-11	152	168	220	238	370	370	302	306
N345-12	150	170	226	232	346	370	302	306
N345-13	164	170	232	238	346	354	306	310
N345-14	154	170	238	238	346	352	306	310
N345-16	154	170	238	238	354	370	306	310
N345-19	164	170	232	238	354	370	302	334
N345-20	164	170	238	238	346	352	302	310
N512-1	160	176	242	244	358	370	298	318
N512-3	158	160	250	258	350	358	298	318
N512-4	158	160	236	244	358	382	318	318
N512-5	158	160	224	244	350	382	290	302
N512-6	160	160	236	244	358	360	282	302
N512-7	158	160	236	244	358	360	302	318
N512-9	154	160	220	244	382	382	298	318
N512-10	154	160	238	250	360	382	282	318
N512-11	154	154	242	250	366	382	298	302
N512-13	160	176	242	244	358	366	298	318
N512-15	154	160	244	258	382	382	298	302
N512-16	154	160	236	250	358	360	282	302
N512-18	158	160	244	258	350	382	298	318
N512-19	152	160	220	244	358	382	298	302
N512-20	158	160	244	258	350	382	298	318
N654-2	156	168	220	244	354	370	290	302
N654-3	156	170	220	244	362	370	290	302
N654-5	152	170	220	244	362	370	290	302
N654-6	156	168	240	244	362	380	298	302
N654-9	156	156	238	244	354	380	290	302
N654-14	152	170	244	252	354	370	298	302
N654-16	152	156	220	244	362	370	290	302
N654-17	156	168	220	244	354	380	290	306
N654-18	152	170	220	244	362	380	290	306
N654-21	152	170	220	244	362	380	290	302
N654-22	156	168	220	244	354	370	298	306
N654-24	152	170	220	244	354	370	290	306
N654-25	152	170	220	244	362	370	298	302
N654-26	152	170	220	244	362	380	298	306
N654-27	156	156	220	244	362	370	290	302
N654-28	156	156	220	244	354	370	298	302
N654-29	156	164	238	244	362	370	290	302

N654-30	156	164	238	244	362	384	298	330
N657-1	152	164	238	254	370	384	314	330
N657-2	152	164	238	254	384	390	280	302
N657-3	152	164	238	254	380	384	302	330
N657-4	164	170	238	254	380	384	302	330
N657-6	152	160	238	254	378	384	302	330
N657-7	160	166	236	238	370	384	280	302
N657-12	160	166	238	250	380	384	302	330
N657-13	160	170	238	254	370	384	280	314
N657-15	152	160	238	254	384	390	280	302
N657-16	152	160	220	238	370	384	280	302
N657-18	160	166	238	250	380	384	280	302
N657-20	152	160	238	254	380	384	314	330
N706-3	154	158	220	220	350	362	290	318
N706-4	150	154	220	240	350	350	290	318
N706-5	150	154	240	248	350	374	290	306
N706-10	154	156	220	240	350	362	290	306
N706-11	154	156	220	240	350	362	290	306
N706-13	154	156	220	240	350	374	318	322
N706-15	154	156	220	240	350	362	290	306
N706-17	154	156	220	240	350	350	290	306
N706-18	154	156	220	240	350	374	306	322
N706-19	154	156	220	240	362	374	318	322
N706-20	154	156	220	240	350	362	290	318
N706-21	154	156	220	240	350	374	318	322
N706-22	154	156	220	240	350	374	318	322
N706-23	150	154	220	248	362	374	290	310
N772-3	154	168	250	258	362	384	302	314
N772-4	154	168	250	258	362	362	290	294
N772-6	154	158	250	258	384	390	298	302
N772-8	152	154	250	258	362	362	290	294
N772-9	154	162	250	258	362	362	302	314
N772-10	154	164	244	250	346	362	290	294
N772-12	154	158	238	258	362	392	288	290
N772-13	152	154	250	258	362	384	290	290
N772-14	154	158	238	258	384	384	288	290
N772-17	152	154	248	258	362	384	290	316
N772-21	152	154	248	258	362	384	290	298
N772-22	154	158	250	258	384	390	288	290
N772-23	154	174	250	258	362	362	294	302
N772-25	152	154	248	258	384	384	290	298
N772-26	152	154	248	250	362	362	290	316
N828-1	152	176	220	246	360	374	298	316

N828-2	152	176	220	246	360	374	298	316
N828-4	160	176	220	238	374	390	316	332
N828-5	160	176	220	246	360	390	316	332
N828-7	152	164	220	246	390	390	280	332
N828-8	160	176	220	246	390	390	280	298
N828-9	160	176	220	246	360	390	280	332
N828-11	152	164	220	238	390	390	280	298
N828-14	154	164	220	238	390	390	298	316
N828-16	154	164	220	238	360	374	316	332
N828-17	152	164	220	238	374	390	316	332
N828-18	160	164	220	238	390	390	280	332
N828-22	158	164	220	238	360	374	316	332

Anexo 3. Variación en el número de padres por nidada de acuerdo con GERUD, COLONY y DADSHARE para las colonias de anidación de El Verde y Las Cabras

Tabla 26. Número de padres por nidada, de acuerdo a la estimación de 3 programas de análisis de paternidad. Información para la colonia de anidación de tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*, de El Verde Camacho, Mazatlán, Sin.

ID de la nidada	GERUD	COLONY corrida a	COLONY corrida b	COLONY corrida c	DADSHARE	Consenso
EV0145 (N1)	1	2	2	2	2	2
EV1081 (N1)	1	2	2	2	2	2
EV1081 (N2)	1	1	1	1	1	1
EV1081 (N3)	1	2	2	2	1	2
EV1257 (N1)	2	2	2	2	2	2
EV1257 (N2)	2	2	2	2	2	2
EV1477 (N1)	2	2	2	2	3	2
EV1803 (N1)	1	2	2	2	2	2
EV1803 (N2)	1	1	1	1	1	1
EV1811 (N1)	1	2	2	2	2	2
EV1811 (N2)	1	1	1	1	1	1
EV1818 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1818 (N2)	2	2	2	2	1	2
EV1822 (N1)	1	2	2	2	2	2
EV1825 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1835 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1835 (N3)	1	1	1	1	1	1
EV1843 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1846 (N1)	2	3	3	3	5	3

EV1846 (N2)	1	1	1	1	2	1
EV1847 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1869 (N2)	2	3	3	3	2	3
EV1877 (N1)	1	2	2	2	1	2
EV1877 (N2)	1	1	1	1	1	1
EV1883 (N1)	2	3	2	2	2	2
EV1885 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1886 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1900 (N1)	1	2	2	2	1	2
EV1900 (N2)	1	2	2	2	1	2
EV1924 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1930 (N1)	2	3	3	3	2	3
EV1930 (N2)	1	1	1	1	1	1
EV1932 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1942 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1943 (N1)	1	3	3	3	2	3
EV1943 (N2)	2	2	2	2	1	2
EV1948 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1952 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1982 (N2)	1	2	2	2	2	2
EV1998 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV1999 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV2011 (N1)	3	4	4	4	4	4
EV2011 (N2)	1	1	1	1	1	1
EV2014 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV2014 (N3)	1	1	1	1	1	1
EV2025 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV2026 (N1)	1	1	1	1	2	1
EV2026 (N2)	2	2	2	2	2	2
EV2029 (N1)	4	4	4	4	6	4
EV2038 (N1)	1	1	1	1	1	1
EV2069 (N1)	1	2	2	2	1	2
EV2094 (N1)	1	1	1	1	1	1

Tabla 27. Número de padres por nidada, de acuerdo a la estimación de 3 programas de análisis de paternidad. Información para la colonia de anidación de tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*, de Las Cabras, Escuinapa, Sinaloa.

ID de la nidada	GERUD (2 Loci)	COLONY corrida a (2 Loci)	COLONY corrida b (2 Loci)	COLONY corrida c (2 Loci)	DAD-SHARE (2 Loci)	GERUD (4 Loci)	COLONY corrida a (4 Loci)	COLONY corrida b (4 Loci)	COLONY corrida c (4 Loci)	DAD-SHARE (4Loci)	Consenso
N009	1	3	3	3	4	3	3	3	3	5	3
N047	2	6	6	6	5	3	5	7	7	5	6
N074	3	5	5	5	4	5	8	8	8	7	5
N123	2	4	4	4	5	2	2	1	1	5	4
N198	2	3	3	3	4	3	4	4	4	7	3
N310	2	5	5	5	6	3	5	4	4	7	5
N345	2	4	4	4	6	4	7	8	8	6	4
N512	3	7	7	7	6	5	5	4	4	5	7
N654	2	4	5	5	2	3	5	5	5	6	5
N657	2	5	5	5	5	3	7	6	6	6	5
N706	2	2	2	2	5	2	3	3	3	4	2
N772	4	7	7	7	7	5	6	7	7	8	7
N828	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2

Anexo 4. Genotipos paternos de las colonias de anidación de El Verde y Las Cabras

Tabla 28. Genotipos paternos de la colonia de anidación de *Lepidochelys olivacea* de El Verde Camacho, Mazatlán, Sinaloa.

Genotipos paternos reconstruidos para la colonia de anidación de El Verde											
Prob. Global Promedio de todos los Padres 80%											
Padre	OR11		OR16		OR1		OR2		OR4		Prob. Global 5 Loci por Padre
P01	170	182	246	248	232	234	172	172	152	176	76%
P02	166	170	248	248	226	232	172	172	144	154	90%
P03	170	190	246	248	220	228	186	190	152	170	74%
P04	190	204	260	260	228	234	172	190	154	154	84%
P05	182	182	246	246	212	232	172	172	154	154	92%
P06	166	182	246	246	230	232	182	190	152	154	85%
P07	170	170	248	248	232	232	186	196	148	186	75%
P08	170	174	246	248	222	232	186	186	160	166	83%
P09	170	174	246	246	214	214	172	184	148	160	100%
P10	166	186	248	260	238	244	172	172	154	154	100%
P11	186	186	248	262	242	244	170	190	154	160	86%
P12	170	170	246	248	236	236	186	186	152	160	82%
P13	166	174	250	256	226	228	196	196	150	152	83%
P14	166	166	246	248	214	226	182	182	150	152	78%
P15	186	186	246	246	232	240	182	182	148	150	91%

P16	166	186	248	260	214	236	172	172	152	152	86%
P17	166	166	246	248	228	228	172	174	172	172	84%
P18	170	170	138	246	232	232	186	186	150	152	78%
P19	178	196	246	246	226	226	172	172	150	152	95%
P20	170	170	260	260	214	214	172	172	160	160	58%
P21	166	174	246	258	226	232	174	186	148	162	78%
P22	182	190	246	248	232	232	184	186	166	170	75%
P23	178	182	246	258	232	232	172	186	152	160	98%
P24	166	166	246	246	232	234	172	192	154	154	82%
P25	166	178	244	248	240	240	186	186	148	148	81%
P26	166	166	246	246	232	234	172	172	148	186	84%
P27	170	170	246	246	228	242	172	172	144	148	82%
P28	190	196	246	248	242	244	172	172	148	150	80%
P29	170	170	246	246	240	242	174	194	148	148	85%
P30	170	170	244	244	240	244	172	190	150	150	86%
P31	182	182	246	256	232	232	172	172	152	152	65%
P32	174	178	254	254	226	228	172	172	148	150	61%
P33	178	182	246	246	238	240	172	186	152	152	58%
P34	178	190	246	246	226	228	172	172	156	160	71%
P35	170	170	246	246	226	228	186	186	160	162	82%
P36	170	174	260	260	232	232	186	186	148	148	71%
P37	190	190	246	248	214	232	172	172	150	152	67%
P38	178	194	246	246	214	232	172	172	148	148	72%
P39	174	174	246	246	214	230	172	172	152	160	83%
P40	174	174	246	246	230	230	184	190	152	152	78%
P41	166	166	246	248	234	242	170	172	148	162	90%
P42	170	182	246	250	232	232	172	188	144	166	72%
P43	166	166	244	246	224	226	172	174	144	148	80%
P44	166	170	246	246	230	230	186	186	148	152	75%
P45	166	170	246	260	230	234	174	186	150	154	82%
P46	166	170	246	246	236	242	186	186	150	150	60%
P47	166	170	248	256	230	230	174	190	148	150	78%
P48	178	178	246	246	222	242	172	172	152	158	79%
P49	178	178	246	250	240	242	172	184	154	158	86%
P50	166	174	250	252	240	240	172	172	154	154	79%
P51	170	178	244	246	238	240	174	188	148	152	78%
P52	166	170	244	244	240	242	172	186	152	152	77%
P53	174	174	244	246	238	240	174	186	150	152	65%
P54	166	166	246	246	238	240	172	188	150	152	61%
P55	178	186	246	246	226	226	172	172	160	166	76%
P56	170	170	246	246	214	214	172	172	154	166	96%
P57	174	182	246	254	234	236	190	190	148	156	89%

Tabla 29. Genotipos paternos de la colonia de anidación de *Lepidochelys olivacea* de Las Cabras con el análisis del Escenario 1 (2 loci).

Genotipos paternos reconstruidos para la colonia de anidación de Las Cabras					
Prob. Global Promedio de todos los Padres					
81%					
Padre	CcP7D04		Cc1G02		Prob. Global 2 Loci por Padre
P01	352	352	290	290	100%
P02	352	366	322	322	98%
P03	366	366	290	356	97%
P04	352	352	302	302	79%
P05	380	380	302	302	100%
P06	380	382	290	290	76%
P07	358	382	302	318	79%
P08	360	382	302	306	74%
P09	350	382	302	304	78%
P10	396	396	298	302	79%
P11	382	382	298	302	100%
P12	350	376	286	302	90%
P13	350	374	302	310	68%
P14	368	374	322	322	99%
P15	368	368	302	302	96%
P16	374	374	302	302	99%
P17	386	410	286	322	72%
P18	362	368	306	318	100%
P19	354	354	302	302	47%
P20	354	354	302	318	65%
P21	354	354	290	290	98%
P22	352	354	310	334	100%
P23	354	354	306	356	70%
P24	362	362	286	306	62%
P25	370	370	302	302	100%
P26	370	370	304	306	98%
P27	370	370	298	298	70%
P28	350	350	298	298	85%
P29	382	382	318	318	80%
P30	350	350	290	302	60%
P31	360	360	282	302	75%
P32	366	382	298	302	47%

P33	380	380	306	306	59%
P34	370	370	306	306	51%
P35	362	384	298	330	76%
P36	370	380	314	314	76%
P37	390	390	302	302	82%
P38	378	384	302	302	82%
P39	350	374	306	318	100%
P40	362	374	290	310	63%
P41	346	362	294	314	99%
P42	390	390	298	302	60%
P43	362	392	288	290	86%
P44	362	384	290	290	73%
P45	384	390	288	290	96%
P46	362	362	290	316	71%
P47	362	384	298	298	63%
P48	374	390	316	316	97%
P49	390	390	280	280	85%

Tabla 30. Genotipos paternos de la colonia de anidación de *Lepidochelys olivacea* de Las Cabras con el análisis del Escenario 2 (4 loci).

Genotipos paternos reconstruidos para la colonia de anidación de Las Cabras									
Prob. Global Promedio de todos los Padres									
74%									
Padre	OR4		OR11		CcP7D04		Cc1G02		Prob. Global 2 Loci por Padre
P01	152	152	248	250	352	366	290	322	92%
P02	154	158	224	250	352	366	290	322	100%
P03	148	166	238	250	352	352	290	290	65%
P04	166	166	230	250	352	352	302	302	78%
P05	164	166	250	250	380	380	302	302	93%
P06	154	164	238	238	352	354	302	310	90%
P07	152	154	238	250	380	382	290	290	52%
P08	154	164	238	250	358	382	302	318	59%
P09	154	174	250	250	360	382	302	306	76%
P10	152	154	238	246	352	382	290	290	58%

P11	152	154	238	250	350	382	302	304	42%
P12	154	168	232	246	382	396	298	298	88%
P13	154	154	220	220	380	396	302	302	67%
P14	166	176	232	232	382	396	298	302	98%
P15	152	156	220	220	350	382	302	302	64%
P16	152	174	232	242	350	382	298	298	74%
P17	152	156	250	250	350	376	286	302	76%
P18	152	154	238	250	350	374	302	310	37%
P19	152	156	238	246	368	374	302	322	100%
P20	158	160	220	242	362	368	306	318	100%
P21	154	166	218	242	362	368	306	318	89%
P22	152	154	238	250	354	354	302	302	26%
P23	154	158	238	238	354	354	302	318	73%
P24	158	160	220	234	354	366	290	356	99%
P25	156	156	246	246	354	366	290	356	93%
P26	158	162	238	250	352	374	310	310	64%
P27	156	156	238	250	362	362	286	306	53%
P28	158	164	238	250	370	370	302	302	55%
P29	152	154	238	250	370	370	304	306	51%
P30	158	164	232	236	354	354	310	334	99%
P31	154	154	238	250	352	352	302	334	61%
P32	152	156	220	252	370	370	302	302	99%
P33	150	170	232	232	370	370	302	302	62%
P34	154	176	242	250	366	370	298	298	84%
P35	158	158	224	258	350	350	290	298	94%
P36	158	160	236	238	360	382	282	318	83%
P37	152	154	220	258	382	382	298	298	78%
P38	152	168	220	240	370	380	302	306	100%
P39	156	156	238	250	354	380	302	302	54%
P40	156	164	238	250	362	384	298	330	56%
P41	152	170	238	250	370	380	302	314	77%
P42	152	152	238	250	390	390	302	302	58%
P43	152	152	238	250	378	384	302	302	56%
P44	160	166	236	238	370	370	302	302	72%
P45	154	156	220	240	350	374	306	318	82%
P46	154	154	238	250	362	374	290	310	51%
P47	162	168	250	250	362	362	294	314	87%
P48	158	158	238	250	390	390	288	298	57%
P49	152	174	238	250	362	362	294	302	66%
P50	154	164	244	250	346	362	290	294	73%
P51	158	158	238	238	384	392	288	290	83%
P52	152	154	238	250	362	384	290	290	52%
P53	152	152	248	250	362	384	298	316	79%

P54	152	160	238	246	374	390	280	316	100%
P55	154	158	238	238	374	390	298	316	77%