



00343
5

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTRUCTURA GENÉTICA Y SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LA
TORTUGA NEGRA *Chelonia mydas* (LINNAEUS 1758) DEL ESTADO
DE MICHOACÁN MÉXICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (Biología Animal)

P R E S E N T A

OMAR CHASSIN NORIA

DIRECTOR DE TESIS: DR FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio del Dr. Daniel Piñero del Instituto de Ecología de la, UNAM, bajo la dirección del Dr. F. Alberto Abreu Grobois

Para mi princesa

Aunque a ella no le gusten mucho estas hojas

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Federico Alberto Abreu Grobois por su apoyo en la elaboración de esta tesis pero más por su amistad.

Al Dr. Daniel Piñero por toda la disposición ofrecida para la elaboración del trabajo, particularmente por la oportunidad ofrecida para cambiar de línea de trabajo

A los miembros del jurado, Dr Federico Alberto Abreu Grobois, Dr. Daniel Piñero Dalmau, Dr. Luis Eguiarte Fruns, Dr. Juan Nuñez farfan, Dr. Gustavo Casas Andreu, Dr. Adrián Nieto Montes de Oca y M en C. Javier Alvarado por la revisión y aportaciones para el mejoramiento de este trabajo.

Quiero agradecer a todas las personas que de alguna manera me apoyaron en la realización de este trabajo.

Especialmente a mi compañera Gloria Solís Guzmán por la tolerancia y amor que me ha mostrado siempre.

A mi Papá por su ejemplo impecable siempre, mi Mamá por su ayuda, mi hermana Yoatzin por que siempre ha estado ahí, a mi hermano Janoshik por ser tan grande.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | i |
| CAPITULO I..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1 |
| TORTUGAS MARINAS..... | 1 |
| LA TORTUGA NEGRA (Población de tortuga verde del pacifico Oriental <i>Chelonia mydas</i>). | 1 |
| TORTUGAS MARINAS EN MICHOACÁN Y MÉXICO | 4 |
| VARIABILIDAD GENÉTICA..... | 4 |
| POBLACIÓN MÍNIMA VIABLE (PMV) Y TAMAÑO EFECTIVO DE POBLACIÓN (N_e). | 7 |
| UNIDADES DE MANEJO | 10 |
| HERRAMIENTAS MOLECULARES | 10 |
| DNA MITOCONDRIAL..... | 13 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 14 |
| CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS..... | 17 |
| SITIO DE ESTUDIO..... | 17 |
| MÉTODOS DE LABORATORIO..... | 18 |
| OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS..... | 18 |
| OBTENCIÓN DEL DNA..... | 20 |
| DISEÑO DE "PRIMERS" (OLIGONUCLEÓTIDOS)..... | 20 |
| AMPLIFICACIÓN CON LA PCR..... | 22 |
| ELECTROFORESIS DE DNA TOTAL Y PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN | 24 |
| PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR..... | 24 |
| SECUENCIACIÓN..... | 24 |
| CAPÍTULO III SIMULACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DGGE Y RFLP PARA DETECTAR VARIABILIDAD GENÉTICA EN TORTUGAS MARINAS..... | 26 |
| DGGE | 27 |
| RFLP..... | 29 |
| EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DGGE Y RFLP PARA SECUENCIAS DE TORTUGAS MARINAS USANDO SIMULACIONES..... | 31 |
| RESULTADOS | 31 |
| CAPÍTULO IV VARIACIÓN GENÉTICA DE LA TORTUGA NEGRA EN MICHOACÁN..... | 39 |
| INTRODUCCIÓN..... | 39 |
| OBJETIVOS..... | 41 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 41 |

| | |
|--|----|
| Alineamiento de la secuencias nucleotídicas | 41 |
| Estimación de variabilidad genética | 41 |
| Diversidad genética (H)..... | 42 |
| Número promedio de diferencias pareadas (π)..... | 42 |
| Diversidad nucleotídica (π_n) | 43 |
| Theta (θ)..... | 43 |
| Frecuencia haplotípica | 44 |
| Análisis de estructura genética | 44 |
| Estimación del Flujo Génico..... | 45 |
| RESULTADOS..... | 46 |
| Variabilidad genética..... | 46 |
| Estructura genética | 50 |
| Flujo génico..... | 52 |
| DISCUSIÓN | 52 |
| Variabilidad genética..... | 52 |
| Estructura genética y flujo génico | 57 |
| CAPÍTULO V RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO <i>Chelonia</i> | 60 |
| INTRODUCCIÓN | 60 |
| OBJETIVOS..... | 62 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 62 |
| RELACIONES DE SIMILITUD DEL GÉNERO <i>Chelonia</i> | 64 |
| RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO <i>Chelonia</i> | 64 |
| RESULTADOS..... | 67 |
| RELACIONES DE SIMILITUD DEL GENERO <i>Chelonia</i> | 67 |
| RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO <i>Chelonia</i> | 67 |
| DISCUSIÓN | 71 |
| CAPÍTULO VI CONCLUSIONES..... | 76 |
| Del capítulo 3..... | 76 |
| Del capítulo 4..... | 76 |
| Del capítulo 5..... | 77 |
| APÉNDICE I..... | 78 |
| APÉNDICE II..... | 81 |
| APÉNDICE III. INFORMACIÓN BÁSICA DE LAS MUESTRAS | |
| ANALIZADAS EN ESTE TRABAJO | 85 |
| LITERATURA CITADA | 89 |

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la distribución tiempo-espacial de la variabilidad genética en la población de tortuga negra, del estado de Michoacán, México empleando la variación presente en 123 secuencias de la región control del DNA mitocondrial (DNAMt). El DNA fue extraído de muestras de sangre de hembras anidadoras y músculo de crías muertas por causas naturales. La región control fue amplificada específicamente utilizando PCR y los productos fueron secuenciados.

En las 123 secuencias de nucleótidos se distinguieron 5 haplotipos distintos. La variabilidad genética de la tortuga negra está distribuida de manera homogénea, por lo que no es posible identificar más de una unidad de manejo (UM) en Michoacán. Sin embargo, las playas de Colola, Maruata y Arenas Blancas presentan haplotipos privados en muy baja frecuencia, demostrando la singularidad de estas localidades.

La posición taxonómica de la tortuga negra es controvertida. En este trabajo la tortuga negra es considerada como una población de *Chelonia mydas*. Algunos autores la consideran como especie independiente, *C. agassizii* y otros como subespecie, *C. mydas agassizii*. En los análisis filogenéticos y de similitud realizados en este trabajo no se apoya el estatus de especie. Sin embargo, debido a su composición haplotípicas singular con respecto a otras poblaciones se demuestra la importancia de las actividades de conservación sobre la tortuga negra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

TORTUGAS MARINAS

Las tortugas marinas son reptiles de origen terrestre que invadieron el medio marino en el Jurásico (hace 195 millones de años). En el Cretácico (hace 140 millones de años) existieron cuatro familias de tortugas marinas (Toxochelyidae, Protostegidae, Cheloniidae y Dermochelyidae), de las cuales sólo las dos últimas sobrevivieron hasta el presente (Lutz y Musick, 1997). La familia Dermochelyidae está representada por una especie, *Dermochelys coriacea* (tortuga laúd), y la familia Cheloniidae tiene actualmente seis o siete especies vivientes: *Caretta caretta* (tortuga caguama), *Lepidochelys olivacea* (tortuga golfinia), *Lepidochelys kempii* (tortuga lora), *Natator depressus* (tortuga kikila), *Eretmochelys imbricata* (tortuga carey) y *Chelonia mydas* (tortuga verde o negra). Algunos autores consideran como una séptima especie la tortuga negra *Chelonia agassizii*.

La posición taxonómica de *Chelonia agassizii* (conocida como tortuga negra, prieta o tortuga verde del Pacífico Oriental), descrita por Bocourt en 1868, no es clara. En el presente trabajo se realizó un análisis filogenético para determinar la posición taxonómica de esta población con base en secuencias de la región control del DNAm (ver capítulo V). Este análisis no sustenta la distinción de *C. agassizii* como una especie diferente a *C. mydas*. Por lo tanto, a pesar de ser esta reconstrucción una hipótesis sustentada en información molecular, en este trabajo se considera a la tortuga negra como una población de *C. mydas* con características singulares. En el texto se emplea el nombre común tortuga negra o prieta para referirse a esta población distinta de las poblaciones de tortuga verde.

LA TORTUGA NEGRA (Población de tortuga verde del pacifico Oriental *Chelonia mydas*).

Nombres comunes:, tortuga prieta, tortuga verde, tortuga verde del Pacífico Oriental.

Taxonomía: Esta población fue descrita por Bocourt en 1868, como especie *Chelonia agassizii*, a partir de unos ejemplares colectados en la costa del Pacífico de Guatemala, sin embargo actualmente el status taxonómico de la tortuga negra es motivo de controversia (Karl y Bowen, 1999) debido a que existen evidencias a favor y en contra de su asignación como especie (ver capítulo V).

Descripción: La tortuga negra es la más pequeña del género *Chelonia*. El caparazón de las tortugas adultas mide de 62 a 102 cm de longitud curva (Alvarado y Figueroa, 1990). Se observan en el caparazón cuatro pares de escudos laterales, cinco centrales y 11 marginales. El plastrón tiene seis pares de escudos en la parte media y cuatro escudos inframarginales. El caparazón presenta una escotadura en ambos lados de la porción posterior a la altura del octavo y noveno escudo marginales. Márquez (1990) menciona que el caparazón de los ejemplares adultos es abovedado, de color gris a negro, con pequeñas manchas de color café o verde olivo; las superficies superiores de las aletas y cabeza son oscuras; el plastrón tiene color blanco a grisáceo.

Alimentación: Las crías son carnívoras y cambian a una dieta herbívora cuando son juveniles (>40 cm longitud curva del caparazón), alimentándose principalmente de pastos marinos (Hirt, 1997).

Reproducción: El apareamiento se observa frente a las playas de anidación, posteriormente las hembras ovopositan de uno a seis nidos (promedio 2.6) en una temporada de anidación (de septiembre a enero) en intervalos de 12 días. El promedio de huevos por nido es de 65.1 y una tortuga se reproduce y anida cada 3 años en promedio (Hirt, 1997).

Distribución: La distribución de esta población se extiende en el Océano Pacífico Oriental desde el sur de Alaska hasta la región de Biobío en el centro de Chile. En su distribución se encuentran zonas de alimentación en el Golfo de

California, Océano Pacífico de California, costa de Oaxaca, Costa Rica y en las Islas Galápagos. Como todas las tortugas marinas requiere incursionar, en la playa para ovopositar. Este proceso se ha reportado esporádicamente en muchas playas de México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú y Chile, pero la principal actividad anidadora se concentra en las Islas Galápagos y en el estado de Michoacán, particularmente en las playas de Maruata y Colola (Figura 1.1.).

Migraciones: Las tortugas negras realizan movimientos debido a que las áreas de alimentación no son las mismas que las áreas de reproducción. Se han encontrado extensas áreas de forrajeo en el golfo de Baja California y frente a las costas de Oaxaca, Guatemala y El Salvador. Se han encontrado tortugas anidadoras de la costa de Michoacán en áreas de alimentación a más de dos mil kilómetros de distancia (Alvarado y Figueroa 1992).

Situación Actual: De acuerdo a los criterios de la UICN, del CITES y de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994 la *Chelonia mydas* se encuentra catalogada como especie en peligro de extinción (sólo en la NOM-059-ECOL-1994 se hace la distinción entre *C. mydas* y *C. agassizii*, ambas se consideran en peligro de extinción).

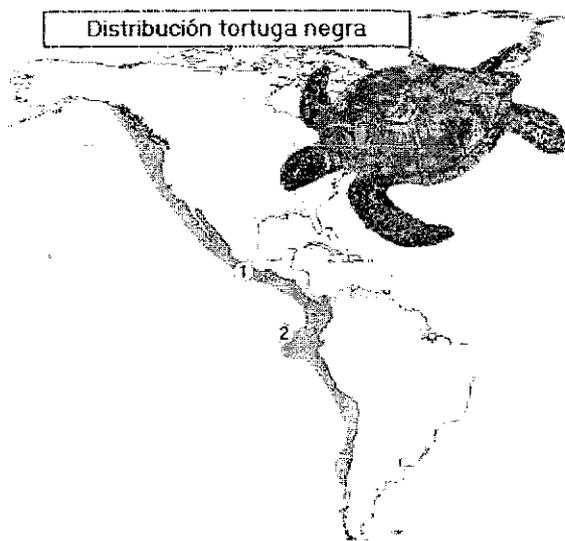


Figura 1.1. Distribución de la tortuga negra. Los números representan las principales playas de anidación para esta especie: (1) playas del estado de Michoacán (2) playas de las Islas Galápagos (modificado de Poland, 2000)

TORTUGAS MARINAS EN MICHOACÁN Y MÉXICO

Las tortugas marinas, al igual que muchas formas de vida, han sido disminuidas en su número como consecuencia de prácticas prolongadas de sobre-explotación. El consumo de huevo (al que se le han adjudicado propiedades afrodisíacas), carne, piel como sustitución de la piel de cocodrilo, la modificación de sus playas de anidación por la actividad humana, pesca incidental y fenómenos atmosféricos son los factores que han afectado en mayor medida sus poblaciones.

México es sitio de anidación de cinco de las seis especies de tortugas marinas. De éstas, dos de las consideradas como en mayor peligro de extinción; la tortuga lora (*Lepidochelys kempi*); y la tortuga negra, anidan en el país. Esta última, objeto del presente trabajo, tiene como principales playas continentales de anidación en el mundo Maruata y Colola en la costa Michoacana (Alvarado y Figueroa, 1992).

En la década de los setentas se extraían aproximadamente 70 mil huevos de tortuga negra por noche de la playa de Colola durante la temporada de reproducción (Cliffon, *et al.* 1982). Entre 1965 y 1977, más de 165,000 ejemplares fueron capturados en el Pacífico mexicano (Grombridge y Luxemoore, 1989) generando una disminución notable en el tamaño de su población. En los sesentas Cliffon *et al.* 1982. estimaron una población de 25,000 hembras en Michoacán y en la década de los ochentas Alvarado y Figueroa (1992) estiman que la población anidadora varió de un máximo de 5,586 hembras anidadoras en 1981 a un mínimo de 904 hembras en 1984.

VARIABILIDAD GENÉTICA

Una posible consecuencia directa de la reducción del número de individuos en las poblaciones es la pérdida de variación genética. La disminución en la variabilidad genética puede ser cualitativa (con la pérdida de alelos o haplotipos) y cuantitativa (con el cambio en la frecuencia de alelos o haplotipos). La variabilidad genética puede ser medida usando distintos índices, aunque el más empleado es

la heterocigosis (H) , que se puede interpretar como la fracción de individuos de una población que son heterocigotos para uno o varios loci en el caso de loci diploides (Hartl y Clark, 1989). En el caso de loci haploides (de procariontes o genes citoplásmicos de los eucariontes localizados en la mitocondria o cloroplasto) representa la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes (Nei, 1987). La H tiene un valor máximo de 1 representando un número infinito de alelos y, como mínimo, 0 para una variabilidad genética nula. Existen otras medidas de variabilidad genética como la proporción de loci polimórficos, así como la diversidad nucleotídica y haplotípica que se obtiene de secuencias de DNA.

Independientemente del estimador de variabilidad genética, se reconoce que la disminución de la variabilidad genética en una población esta asociada con la disminución de la adecuación (W) de la misma y que las poblaciones con alta variabilidad genética tienen mayor capacidad para adaptarse a ambientes cambiantes (Soulé 1980). La disminución en la adecuación de las poblaciones con poca variabilidad genética puede explicarse por posibles depresiones en la respuesta de su sistema inmune (O'Brien et al. 1985, Ellegren 1996), Ellegren (1996) ha observado que poblaciones de Alces con poca variabilidad genética poseen poca variabilidad en el Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC), generando esto una disminución en la capacidad de presentación de antígenos del sistema inmune, con la consecuente susceptibilidad de la población a enfermedades.

La disminución en el tamaño de una población con el consecuente aumento de la homocigosis genera depresión por endogamia. Este proceso se presenta por varias razones: según Packer (1979), el incremento en la homocigosis aumenta la probabilidad de que los alelos letales o semiletal se expresen. el incremento de la homocigosis disminuye la variabilidad genética de la descendencia con la reducción de la probabilidad de sobrevivencia para cualquier individuo en un ambiente sujeto a cambios repentinos (Ralls *et. al.* 1986). Allendorf y Leary (1986) hacen un análisis de trabajos publicados en los que se observa que los

organismos heterocigotos de varias especies animales tienen una mayor sobrevivencia, resistencia a enfermedades, tasa de crecimiento y estabilidad en el desarrollo con respecto a los homocigotos. Concluyendo que en términos generales hay una relación positiva entre la adecuación y la heterocigosis. En plantas también se ha encontrado relación positiva entre la variabilidad genética y componentes de la adecuación como sobrevivencia y crecimiento pero no una dependencia estricta entre estas dos variables (Ledig, 1986).

Un caso típico del impacto negativo de la homocigosis sobre la adecuación de animales es el de los guepardos *Acinonyx jubatus* en los que se han detectado valores excepcionalmente bajos de variabilidad genética que asociado a: bajas concentraciones de espermatozoides, alta proporción de espermatozoides con anomalías, alta mortalidad de juveniles y pobre capacidad de presentación de antígenos por el sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) (O'Brien *et. al.* 1985).

Los esfuerzos de conservación generalmente se aplican en función de consideraciones de la demografía de las especies y pocas veces se toman en cuenta los elementos genéticos, que son igualmente importantes. Es posible que una población sea demográficamente estable (i.e., índice reproductivo neto igual o superior a 1) pero no sea estable evolutivamente, debido a un alto grado de endogamia (bajo nivel de variabilidad genética). Por lo tanto, mantener el tamaño de las poblaciones y su variabilidad genética debe ser un aspecto fundamental en planes de manejo a largo plazo (Lande y Barrowclough, 1987).

Para que exista evolución y adaptación es necesario que exista variabilidad genética. Lande y Barrowclough (1987) plantean que los biólogos involucrados en actividades de conservación, han de tener como actividad fundamental la determinación y monitoreo de los niveles de variabilidad genética y la estimación del tamaño efectivo de las poblaciones con las que se encuentran involucrados.

En este apartado se ha planteado la importancia de la variabilidad genética para la conservación de las poblaciones naturales. Preservar la variabilidad

genética sin considerar factores demográficos no tiene sentido. Una vez asegurado el mantenimiento de las poblaciones a corto plazo (considerando elementos demográficos) es que se ha de magnificar la variabilidad de la población sujeta a manejo, para asegurar su persistencia a largo plazo.

Generalmente, cuando se habla de variabilidad genética en relación a la conservación se le asocia a la variabilidad genética obtenida del promedio de varios loci (p. ej. variabilidad promedio de varios loci de isoenzimas) sin embargo existe variabilidad genética cuantitativa, (asociada a rasgos que son resultado de la expresión de varios loci, efectos pleiotrópicos e interacción con el ambiente) que para monitorearse requiere de estudios de heredabilidad. Estos estudios son complicados de realizarse con poblaciones silvestres sin embargo son fundamentales también en planes de manejo de largo plazo (Lande y Barrowclough, 1987).

POBLACIÓN MÍNIMA VIABLE (PMV) Y TAMAÑO EFECTIVO DE POBLACIÓN (N_e).

Teóricamente es fundamental para el diseño de reservas y áreas protegidas definir cual es el número mínimo de individuos que ha de contener una población para subsistir de manera estable (Lande y Barrowclough, 1987). La Población Mínima Viable (PMV) tiene dos atributos que son intrínsecos de la población y uno que depende de factores externos. Intrínsecos son las características genéticas y demográficas de la población mientras que los atributos extrínsecos dependen de la estocasticidad ambiental (Caughley, 1994). Franklin (1980) propone el tamaño que ha de tener una población para garantizar la conservación de la varianza genética de la siguiente manera: En términos generales, se ha sugerido que, la depresión por endogamia es mantenida en niveles tolerables si la población es de más de 50 individuos (tamaño efectivo N_e), mientras que se requieren más de 500 individuos (N_e) para permitir que los procesos evolutivos puedan ocurrir, manteniendo un equilibrio estable entre las fuerzas que merman la variabilidad genética y las que la incrementan (Franklin, 1980).

El tamaño efectivo de una población esta definido por varios atributos que son particulares para cada población.

a) La proporción sexual operacional: Dos poblaciones (con todos sus individuos reproductivos y asumiendo apareamiento al azar) de 100 individuos pueden tener N_e distintos, p. ej. población (a) 90 machos y 10 hembras (b) 50 hembras y 50 machos. Aplicando la formula:

$$N_e = \frac{4 N_m N_f}{N_m + N_f}$$

Resulta que el N_e población (a)=36; población; (b)=100.

b) Los individuos de una población que se encuentran activamente reproductivos depende de la proporción de individuos juveniles y adultos es decir de la estructura de edad de la misma.

c) El sistema de apareamiento (poliandria, poliginia, monogamia) puede modificar la proporción sexual operacional de las poblaciones, y procesos de competencia intra-sexual afecta la varianza en el número de progenie generado por un individuo. El impacto de la varianza en el numero de progenie se ha explorado con la formula:

$$N_e = \frac{4N}{2 + s^2}$$

Si la varianza en la progenie es de 4 (promedio =2) entonces $N_e=2/3N$ pero si no hay varianza entonces $N_e=2N$. Esto implica que conforme aumenta la varianza de una población en cuanto a numero de progenie por individuo, el tamaño efectivo de la población disminuye y el N_e es máximo cuando la varianza en el número de progenie por individuo es igual a cero (Franklin, 1980).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

d) El tamaño efectivo de una población se ve afectado por variaciones en el tamaño poblacional en el tiempo de manera que se obtiene como la media armónica.

$$\frac{1}{N_e} = \frac{1}{t} \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} + \frac{1}{N_3} + \dots + \frac{1}{N_t} \right)$$

Por consiguiente el N_e se ve dominado por los valores mas bajos de tamaño de población (Hartl y Clark, 1989). Li (1987) plantea este tamaño efectivo como el "tamaño efectivo poblacional de largo plazo" .

Una vez definido el N_e de una población se puede determinar si se ajusta al valor mínimo necesario propuesto por Franklin (1980), lo cual es una aproximación para estimar el estado de la población.

Para mantener un tamaño efectivo (N_e) de 500 individuos, se ha observado que se requieren entre tres a cuatro veces este valor de tamaño poblacional (N) dependiendo de la especie (Hartl y Clark, 1989; Li, 1997).

A partir de la variabilidad genética de una población se puede calcular el tamaño efectivo de una población. Esto es posible con el calculo del parámetro theta θ (Watterson, 1975) que se obtiene de secuencias de DNA de regiones que no están sujetas a selección natural (p. ej. intrones). Entonces usando la expresión $\theta = 4N_e \mu$ podemos estimar de manera indirecta el N_e para genes diploides. Este N_e es histórico y no es posible darle una interpretación biológica tática.

Para mantener un tamaño efectivo de 500 individuos, se ha estimado que se requieren mínimo entre tres o cuatro veces este valor para el tamaño poblacional (N), dependiendo de la especie (Hartl y Clark 1989; Li, 1997).

Ya que este número de PMV (500/50) fue derivado de observaciones en poblaciones de *Drosophila sp.*, no es posible suponer que necesariamente este valor es automáticamente aplicable para definir el tamaño mínimo de población de

otras especies y es necesario considerar las características singulares de cada especie y población en cuestión. El valor de PMV siempre estará acotado por dos valores: la probabilidad de persistencia de la población y el intervalo de tiempo estimado para la probabilidad de persistencia. Este número está sujeto a distintos niveles de estocasticidad ambiental, así como a la capacidad de respuesta conductual y demográfica para contrarrestar la misma de cada especie por lo tanto estos atributos son únicos para cada población (Caughley, 1994).

UNIDADES DE MANEJO

Uno de los principales requisitos para el manejo de especies animales silvestres es identificar las unidades demográficas que se comportan reproductivamente independientes. A éstas se les denomina "unidades de manejo" (Moritz (1994) MUs siglas en inglés). Su identificación permite analizar la dinámica de cada una de ellas. Así, será posible determinar el estado de cada una y consecuentemente jerarquizarlas de acuerdo la necesidad de atención, ya que no siempre es posible conservar la totalidad de las poblaciones.

En tortugas del género *Chelonia* se han detectado varias unidades de manejo en el océano Atlántico y Pacífico usando RFLPs sobre la región control, pero se recomienda el re-análisis de las MUs a la luz de secuencias nucleotídicas del mtDNA (Moritz, 1994). En las ballenas jorobadas *Megaptera novaengliae* se han detectado numerosas MUs, que revelan 6 eventos de migración suficientes para explicar la distribución de los haplotipos en el espacio actual (Baker *et al.* 1993).

HERRAMIENTAS MOLECULARES

El uso de las técnicas de la biología molecular ha permitido el análisis de la variación cualitativa y cuantitativa de frecuencias alélicas de organismos en el espacio y en el tiempo, facilitando el estudio de los procesos evolutivos.

Los primeros avances se dieron con la electroforesis de proteínas la cual permitió detectar la variabilidad genética en loci que codifican enzimas. Cuando se

encuentran isómeros de enzimas, con conformación diferente pero con una misma actividad enzimática, se les denomina "isoenzimas" y cuando las diferentes isoenzimas son producidas por alelos alternativos del mismo locus, se les denomina "aloenzimas". Con base en las diferencias en la composición de las aloenzimas fue posible iniciar las investigaciones de la composición genética de los organismos. Varias temáticas han sido estudiadas con estos métodos: Por ejemplo la clarificación de la posición taxonómica de algunos organismos que por métodos morfológicos no era posible (ej. Roy *et al.* 1994, Reich *et al.* 1999), así como determinar los procesos de diferenciación genética entre y dentro de poblaciones. Antes del desarrollo de esta técnica, sólo se tenían disponibles las mutantes morfológicas y conductuales para estudiar la variabilidad del genoma. Con las nuevas técnicas moleculares fue posible estudiar docenas de marcadores mendelianos de muchos organismos (May, 1992).

En décadas recientes se han logrado avances que ponen a nuestro alcance el estudio de los niveles elementales de la genética -los ácidos nucleicos- para medir la variación genética. Estas técnicas, tienen varias ventajas sobre las proteínas: Las proteínas generalmente son más termolábiles que el DNA por lo que se requiere la congelación casi inmediata de las muestras para su análisis en laboratorio. Aún a temperaturas de -70° C algunas proteínas pueden desnaturalizarse, mientras que el DNA es estable por largos periodos de tiempo a temperaturas ambientales con preservadores sencillos (ver Apéndice I). El análisis de electroforesis de isoenzimas también tiene la desventaja que puede subestimar la variabilidad genética de una población, debido a que es posible que dos o más proteínas migren como un mismo alelo si tienen carga neta y peso parecido, aún cuando tengan distinta secuencia de aminoácidos. Es posible también que diferencias en la secuencia de ácidos nucleicos no se expresen en la secuencia de aminoácidos de una proteína, debido a que todos los aminoácidos (excepto metionina y triptofano) son codificados por más de un codón. Por lo anterior se considera que las herramientas moleculares dirigidas a ácidos nucleicos, ofrecen mayor versatilidad en cuanto a las facilidades de colecta, preservación y niveles de universalidad (relaciones de parentesco, inter-poblacionales, inter-específicas y

niveles superiores) en los que se les puede aplicar debido a los distintas tasas de mutación dentro de un mismo genoma (May, 1992., Hillis *et al.* 1996).

Usando ácidos nucleicos se han generado diversas técnicas para el estudio de procesos evolutivos, tales como el análisis de los Patrones de Restricción de Enzimas (Restriction Fragment Length Polimorphism RFLP), la hibridación de ácidos nucleicos y la secuenciación. El desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Saiki *et al.* 1985; PCR por sus siglas en inglés) ha hecho mas eficientes y baratas varias de estas técnicas, posibilitando el surgimiento de otras técnicas: Variable Number of Tandem Repeats (VNTR), Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) y el estudio de microsatélites. La selección de métodos obedece a las necesidades específicas de la investigación.

En tortugas marinas, el uso de isoenzimas en las primeras investigaciones arrojó estimaciones de variabilidad genética muy baja, por lo que los datos obtenidos eran de poca utilidad para describir la estructura genética de las poblaciones (Bonhomme *et al.* 1987). Más recientemente, empleando el análisis de ácidos nucleicos, se han logrado conocer patrones de migración de tortugas marinas (Bowen *et al.* 1995), fortalecer la teoría del retorno de las crías a su playa de nacimiento para desovar o "filopatría" (Meylan *et al.* 1990), conocer las relaciones filogenéticas entre las distintas especies de tortugas (Bowen *et al.* 1993), estimar la tasa de evolución de las tortugas marinas con respecto a otros vertebrados (Avise *et al.* 1992), así como definir la frecuencia de paternidad múltiple en las nidadas en varias especies de tortugas marinas (Harry, 1988; Peare, 1994; FitzSimmons, 1998; Kichler, 1999; Bollmer, 1999).

En México se han realizado estudios pioneros de genética con varias especies de tortugas marinas, y se han incluido varias poblaciones de México en evaluaciones globales, entre estas tenemos: a la tortuga carey, *Eretmochelys imbricata* (Bass, 1994), la tortuga verde *Chelonia mydas* (Bowen *et al.* 1992., Encalada, 1996), y la tortuga caguama *Caretta caretta* (Bowen *et al.* 1995).

Actualmente se realizan estudios genéticos con mayor profundidad enfocados sobre poblaciones mexicanas, como por ejemplo las investigaciones sobre la tortuga golfinia, *Lepidochelys olivacea*, del Dr. Alberto Abreu-Grobois (Estación Mazatlán ICMYL UNAM), de la tortuga laúd, *Dermochelys coriacea*, de la Biol. Ana Barragán (Laboratorio de Tortugas Marinas de la Facultad de Ciencias UNAM) y de zonas de alimentación y desarrollo de la misma tortuga negra en el Golfo de California por J. Nichols Wallace (Universidad de Arizona).

DNA MITOCONDRIAL

El DNA mitocondrial (DNAMt) es una molécula circular de aproximadamente 16.5 Kb que se hereda por vía materna. Esta peculiaridad se debe a que en la fertilización el espermatozoide transmite DNA nuclear al óvulo y muy poco DNA extra-nuclear, por lo tanto las mitocondrias provienen del citoplasma en el óvulo. Los espermatozoides poseen aproximadamente 100 mitocondrias, mientras que el óvulo posee 10 millones de mitocondrias, por lo tanto al formarse el cigoto la relación entre el DNAMt de origen paterno y materno es de $1:10^5$, esto explica que la herencia del DNAMt sea por vía materna, ya sea porque las mitocondrias de origen paterno no pueden replicarse en el cigoto, o por la proporción tan dispar entre el número de mitocondrias paternas y maternas en el cigoto (Hutchinson *et al.* 1974; Giles *et al.* 1980).

Se ha reportado que la evolución del genoma mitocondrial es 5-10 veces más rápida que la de los genes nucleares, mientras que en la región control (también conocida como "d-loop" en inglés) es cinco veces más rápida que la del resto del DNAMt (Cann *et al.* 1987). Esto es lógico si se considera que la región control no codifica para ninguna proteína, de modo que no está sujeta a selección natural, permitiendo una más rápida acumulación de mutaciones con respecto a regiones codificantes. Según Gray (1989) la rapidez de la evolución del genoma mitocondrial se explica por distintas causas:

- Mayor tasa de mutación, por estar expuesto a daños por oxidación dentro de la matriz mitocondrial rica en agentes oxidantes.

- Sistema de replicación "propenso" a cometer errores. Debido a la ausencia o deficiencia de mecanismos de reparación en la replicación que es dada por la γ DNA polimerasa.
- La capacidad de los tRNAs para "tolerar" cambios en la tercera posición del triplete sin que esto implique cambios en la proteína resultante.

Estas características propician a que el DNAm, particularmente de la región control, sea muy polimórfico. Esta cualidad lo hace muy atractivo para los estudios de genética de poblaciones.

Existen trabajos previos en los que se ha secuenciado la totalidad del genoma mitocondrial de una tortuga del género *Chelonia* encontrándose que es de 16,497 pares de bases y con el arreglo de genes es como el de la mayoría de los vertebrados (Kumazawa y Nishida, 1999). El cromosoma mitocondrial contiene la información para sus rRNAs 16S y 12S, 13 sub-unidades de la cadena respiratoria y 22 tRNAs necesarios para la traducción. Las proteínas codificadas son las siguientes (Gray, 1989) (a) 7 sub-unidades de la NADH deshidrogenasa (ND 1-6 y 4L), (b) 3 sub-unidades de Citocromo c oxidasa (COX I-III), (c) 2 sub-unidades de la ATP sintetasa (atp 6,8), (d) Citocromo b (Cyt-b) y 981 pares de bases en la región control que contiene el origen de replicación de la cadena H y transcripción de la cadena pesada H y ligera L nombradas así por su densidad en gradientes de cesio (Figura 1.2.).

JUSTIFICACIÓN

Este trabajo se realizó con la tortuga negra considerada en peligro de extinción en la norma oficial (NOM-059-ECOL/1994) y el área de estudio comprende la región costera del área prioritaria para la conservación: Sierra de Coalcomán, Michoacán (CONABIO, 1999).

No existe ningún trabajo previo en el que se describan los niveles de variación y estructura genética de la tortuga negra en las costas del estado de

rápido que el resto de la molécula, lo cual permite identificar variación en las tortugas, en las cuales se ha observado una tasa de evolución de 5 a 10 veces menor con respecto a otros vertebrados (Avice *et al.* 1992). La región control del DNAmf es una excelente herramienta para resolver la estructura genética de poblaciones y sistemática de las especies.

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

SITIO DE ESTUDIO

La costa michoacana tiene aproximadamente 208 Km. de longitud y se encuentra localizada al sur de la Sierra Madre del Sur. Cuenta con tres municipios; de este a oeste son: Lázaro Cárdenas, Aquila y Coahuayana. El límite oriental de la costa es el río Balsas y el occidental el río Coahuayana.

La mayor parte de los municipios de Lázaro Cárdenas y Coahuayana presentan costas regulares con playas largas y amplias planicies costeras mientras que toda la costa del municipio de Aquila es irregular. Las montañas y colinas de la Sierra Madre del Sur están tan cerca del mar, que prácticamente no existe planicie costera, en algunas partes las montañas emergen abruptamente del mar. Las montañas alcanzan alturas de 2000 m.s.n.m. La ausencia de planicies costeras dificulta la formación de esteros y deltas de ríos (Alvarado y Figueroa 1989).

El tipo de vegetación dominante es de bosque tropical caducifolio y en algunas cañadas se encuentra bosque tropical sub-caducifolio (Rzedowski, 1990) y el clima es caliente sub-húmedo con lluvias en verano (García, 1988).

El estado de Michoacán está asentado en la placa continental de Norteamérica, mientras que el piso del Pacífico descansa sobre la placa de Cocos la cual tiene un desplazamiento hacia el noreste de 5 a 10 cm por año contra la placa de Norteamérica que se mueve hacia el oeste. Esta colisión es la que genera que la costa michoacana tenga una topografía tan accidentada, con una planicie costera angosta y una estrecha plataforma continental por lo que cerca de la costa hay grandes profundidades (Alvarado y Figueroa 1989).

Las playas de estado de Michoacán presentan sólo algunos manchones de vegetación constituidos principalmente por pastos de ambientes salinos *Distichlis spicata*. En el extremo más alejado del mar se encuentra un matorral compuesto

principalmente por *Prosopis juliflora*, *Gliricidea sepium* y *Phithecellobium lanceolatum* (Alvarado y Figueroa 1989).

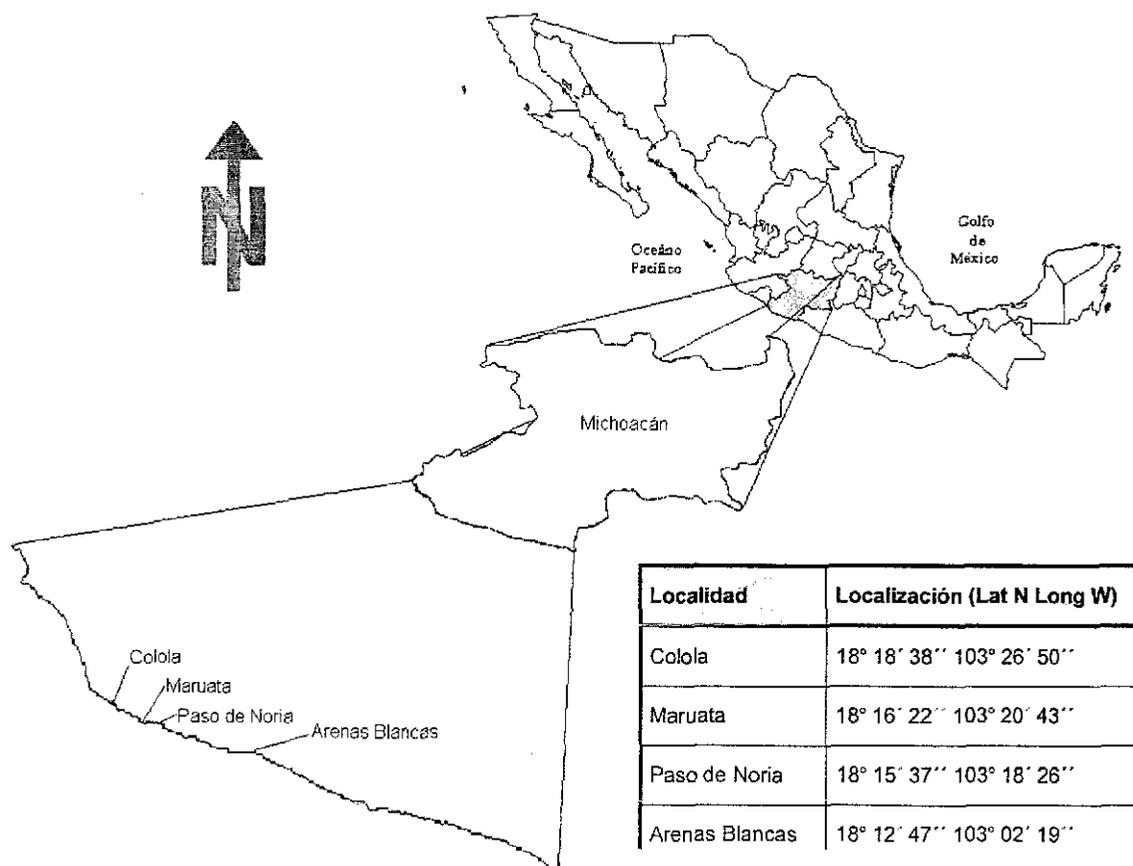


Figura 2.1. Mapa de localización de localidades de muestreo del presente trabajo.

Las playas de anidación de las que se obtuvieron muestras son: Colola, Maruata, Paso de Noria y Arenas Blancas, ubicadas en el municipio de Aquila del estado de Michoacán (figura 2.1).

MÉTODOS DE LABORATORIO

OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Ya que el uso de la PCR permite la amplificación de fragmentos específicos del genoma a partir de pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, para este trabajo fue suficiente coleccionar pequeñas muestras de sangre y/o tejido sólido. En los casos que se utilizó sangre, esta se obtuvo de hembras adultas en la playa

después de terminado el desove, empleando el método reportado por Owens y Ruiz (1980). Se colectaron entre 0.5 y 1 ml de sangre, empleando una jeringa estéril de 5 ml con aguja de 18-22 x 38 mm, y posteriormente la sangre fue suspendida en solución amortiguadora lítica, (Apéndice I) en una proporción de 1:5-10. Las muestras se almacenaron en envases de plástico de 10 ml para su transporte al laboratorio. Si la hembra no se encontraba marcada se le puso una marca metálica Monel 400 en la aleta anterior izquierda (Balaz, 2000) para evitar obtener dos muestras de una misma hembra durante la temporada de anidación.

El tejido de las crías se obtuvo de organismos que mueren de manera natural en los nidos que son transportados al vivero (el porcentaje de emergencia en vivero para la tortuga negra reportado por Alvarado y Figueroa, 1990 es de 64 %). Las muestras se obtuvieron antes o después de la eclosión, empleando una navaja de bisturí para obtener un fragmento de tejido de 3 mm³ de músculo de las aletas anteriores o de tejido blando de la región cervical de la tortuga. Los fragmentos de tejido sólido se preservaron en solución saturada de sal-DMSO (Apéndice I) en una proporción 1:5-10 tejido: solución saturada sal-DMSO en un envase plástico de 10 ml para el transporte de muestras al laboratorio, de acuerdo a la técnica propuesta por Dutton (1996b).

Tanto la solución amortiguadora usada para sangre como la usada para tejido permiten el almacenamiento de las muestras por un periodo de seis meses sin refrigeración, sin que el DNA se degrade. Una vez en el laboratorio, las muestras se almacenaron a -70°C en un ultra-congelador para su posterior análisis.

En el caso de colecta de tejido a partir de crías muertas, sólo se tomó tejido de una cría por nido, debido a que el DNAm_t es heredado por vía materna y la colecta de muestra de mas de una cría por nido sobrestimaría la frecuencia de el alelo materno en la población (Hutchinson *et al.* 1974; Giles *et al.* 1980). Se prefirió la colecta de nidos que no tenían más de 12 días de diferencia en las fechas de ovoposición, para evitar muestrear duplicados de una misma tortuga, ya

que se sabe que el valor promedio del periodo inter-anidatorio en una misma temporada es de 12 días (Miller, 1997).

También se colectaron algunos fragmentos de hueso de algunas tortugas que tenían hasta dos años de muertas, de las que se logró obtener DNA empleando el High Pure™ PCR Template Preparation Kit de Boehringer.

Las fechas en las que se tiene reportada la mayor actividad de anidación son entre septiembre y enero (Hirt, 1997), presentándose el máximo de anidación entre octubre y noviembre de cada año, por lo que la colecta de sangre se realizó en estos meses, y la colecta de tejido de crías en enero y febrero, cuando es posible revisar una mayor cantidad de nidos en busca de crías muertas después de la emergencia de las crías.

En algunos sitios de anidación fue necesario solicitar el apoyo de los encargados de los campamentos, por lo que se diseñó una guía para la colecta de tejido y sangre que se dejó en cada campamento junto con el material necesario para la colecta de muestras de sangre y tejido (Apéndice II).

Como la tortuga negra es una especie considerada en peligro de extinción en la norma oficial (NOM-059-ECOL/1994) se obtuvieron los permisos de colecta e investigación científica para individuos de tortuga negra *Chelonia agassizii* DOO 550.-4628/96 y DOO 750.-7562/97 otorgados el 26 de septiembre de 1996 y 3 de septiembre de 1997 respectivamente, por la Dirección General de Vida Silvestre, Instituto Nacional de Ecología, de la Secretaría de Recursos Naturales y Pesca.

OBTENCIÓN DEL DNA.

Para la obtención del DNA se emplearon 2 protocolos diferentes; uno empleando solventes orgánicos (Apéndice I) y el otro aplicando el High Pure™ PCR Template Preparation Kit de Boehringer.

DISEÑO DE "PRIMERS" (OLIGONUCLEÓTIDOS)



Se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar la región D-Loop de *C. agassizii* de acuerdo a la secuencia registrada en Gene Bank (Número de acceso. U40659. Número de identificación. G1117939) empleando el Programa Oligo 4.0 para PC. Los oligonucleótidos diseñados se muestran en la Tabla 2.1

Tabla 2.1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la región control del DNAm de *Chelonia agassizii*

| SECUENCIA | CARACTERÍSTICAS |
|--|--|
| ⁵ ccacgcacaaactaactacc ³ | UPPER PRIMER (C.a.1*): cadena positiva para la secuencia de <i>C. agassizii</i> . Se une en la pos. 33. Tiene una Tm determinada por el método de % GC de 68°C, y su contenido de AT es de 50 % y CG 50% |
| ⁵ ttaaagaggaacgaatgaac ³ | LOWER PRIMER (C.a.2*): cadena negativa para la secuencia de <i>C. agassizii</i> . Se une en la pos. 451: Tiene una Tm determinada por el método de %GC de 62.1°C y su contenido de AT es de 65% y GC 35%. |

Este par de oligonucleótidos produce un producto de amplificación de 438 pb. de los 508 pares de bases reportados en la secuencia de Gene Bank.

El primer C.a.1 tiene 100% de similitud con la región control del DNAm de la secuencia gb:CAU40659 de *Chelonia agassizii* y gb:CMU40436 de *C. mydas*.

El primer C.a.2 tiene 100% de similitud con la región control del DNAm secuencia de Gene Bank: gb:CAU40659 de *C. agassizii*; gb:CMU40436 de *C. mydas*; CCU22261 de *Caretta caretta*; gb: LKU40657 de *Lepidochelys kempii*; gb: CCU40435 de *Caretta caretta*; gb: LOU40661 de *Lepidochelys olivacea*; gb: CRWMTTRPA de *Caretta caretta*; y homología de 95% con las secuencias: gb: EIU37807 de *Eretmochelys imbricata*; gb:MTCM5 de *C. mydas*; gb:MTCM6 *C. mydas*; gb:DCU40663 de *Dermochelys coriacea*; gb:MTCM7 de *C. mydas*; gb:NDU40662 de *Natator depressus*; gb:CMU40660 de *C. mydas*; gb:CRWMTTRPB de *Caretta caretta*.

Siendo los valores de similitud del 100%, podemos decir que la especificidad de los oligonucleótidos por el DNAMt de tortuga marina es alta, por lo que estas secuencias pueden ser empleadas para amplificar una porción de la región D-loop.

AMPLIFICACIÓN CON LA PCR

A pesar de tener los oligonucleótidos diseñados en este trabajo se emplearon oligonucleótidos previamente reportados con la finalidad de tener fragmentos del mismo tamaño que en trabajos previos y así poder comparar secuencias del mismo tamaño.

Se amplificó la región D-Loop del DNAMt con los oligonucleótidos reportados por Allard *et al.* (1994), que generan un producto de amplificación de aproximadamente 559 pb (contando la secuencia del cebador de 19 bases que se incorpora al extremo de la secuencia amplificada).

Secuencias de los oligonucleótidos empleados en este trabajo reportados por Allard *et al.* (1994):

LTCM1 5' cccaaaaccggaatcctat^{3'};

HDCM1 5' actaccgtatgccaggta^{3'}

Debido a la sensibilidad de la PCR, es importante realizar controles negativos en los experimentos que permitan asegurar la confiabilidad de los ensayos. Un control negativo es una reacción en el que se adicionan todos los componentes excepto DNA muestra. Si en esta reacción se observa algún producto, será un claro indicador de contaminación de las muestras, lo que impide tener certidumbre de la calidad de las reacciones realizadas a la par.

Una manera de dar certidumbre a la reacción es probar la capacidad de los oligonucleótidos de generar estructuras de doble cadena con ácidos nucleicos de otros organismos, particularmente de hongos, bacterias y humanos, que son las potenciales fuentes de contaminación. Esto se realizó usando un algoritmo de

búsqueda de secuencias complementarias de los oligonucleótidos LTCM1 y HDCM1 en las bases de datos que contienen todas las secuencias publicadas (por ejemplo en el GeneBank). El algoritmo de búsqueda empleado fue el modulo FASTA (Pearson y Lipman 1988) con cada uno de los oligonucleótidos, lo que permitió saber que complementariedad existe de estos con alguna de las 3,841,000,000 bases de las 4,865,000 secuencias reportadas hasta octubre de 1999. Los oligonucleótidos que se usaron resultaron tener complementariedad con tortugas marinas principalmente, y en ningún caso con DNA de hongos, bacterias o humanos.

Para la amplificación se probó el DNA obtenido tanto de tejido sólido (músculo con piel y hueso) como de sangre con los dos métodos de extracción usados (solventes orgánicos y High PureTM PCR Template Preparation Kit de Boehringer). Se emplearon los reactivos del PCR core Kit de Boehringer. Se realizó la amplificación con las concentraciones que se muestran en la Tabla 2.2

Con este protocolo se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 550 pb. que se visualizó en geles de agarosa y su tamaño se determinó con base en el marcador de número de bases ϕ X174 restringido con HaeIII

Tabla 2.2 Concentración de los reactivos para PCR.

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN FINAL |
|--------------------------------|------------------------------|
| Buffer 10 X | 2.5 μ l; MgCl 1.5 mM |
| dNTP's. | 200 μ M c/u |
| Oligonucleótidos | 1.5 μ M c/u |
| DNA muestra | 30-3 ng DNA |
| <i>Taq</i> Polimerasa | 1.5 unidades |
| Agua bi-distilada des-ionizada | Hasta 25 μ l de reacción |

Las condiciones de las fluctuaciones de temperatura y la duración en cada parte del ciclo usadas en el termociclador se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Temperaturas empleadas en la PCR.

| PROCESO | | ESPECIFICACIONES |
|---------------------------|-------------------|------------------|
| Desnaturalización inicial | | 94°C 5 minutos |
| 30 ciclos | Desnaturalización | 94°C 1 minuto |
| | Alineamiento | 55°C 1 minuto |
| | Extensión | 72°C 1 minuto |
| Extensión Final | | 72°C 5 minutos |

ELECTROFORESIS DE DNA TOTAL Y PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Procedimiento:

Se preparan mini-geles de 8x7x0.5 cm de agarosa TAE 1X (al 2% para productos de PCR y al 1.4% para DNA total) y Buffer de TAE 1X donde se corrió la muestra a un voltaje de 5-10 V/cm. En cada carril se pusieron 5-15 µl de muestra y colorante (2.5 µl de colorante por cada 10 µl de muestra) usando λ /Hind III para alto peso molecular y ϕ X174/Hae III para bajo peso molecular. Posteriormente se tiñó el DNA en una solución con bromuro de etidio 5 µg/ml durante 30 minutos en agitación para posteriormente visualizar el DNA en un transiluminador luz U.V de onda corta.

PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados empleando QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Este método requiere correr los productos de amplificación en un gel de agarosa y de ésta cortar la porción del gel en el que se encuentra el fragmento amplificado para proceder a la purificación. Con esto se eliminan artefactos de amplificación y los productos de amplificación pueden secuenciarse (QIAquick 2001)..

SECUENCIACIÓN

Las secuencias se obtuvieron en el Laboratorio del Dr. Peter Dutton (NOAA-NMFS Southwest Fisheries Science Center P.O. Box 271.La Jolla CA 92038)

realizando las reacciones de secuenciación empleando el ABI Prism™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de Perkin-Elmer. Este procedimiento emplea nucleótidos que detienen la reacción de amplificación en puntos específicos con marcados fluorescentes. La reacción se corrió y leyó en un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 373.

CAPÍTULO III SIMULACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DGGE Y RFLP PARA DETECTAR VARIABILIDAD GENÉTICA EN TORTUGAS MARINAS

En la actualidad existen técnicas para evaluar los niveles de variabilidad dentro de poblaciones que pueden ser clasificadas en dos grandes grupos de acuerdo al nivel de cobertura del genoma:

- Las técnicas que tienen una cobertura “amplia al azar” de análisis sobre el genoma completo del organismo (RAPD, AFLP)
- Técnicas que enfocan el análisis a regiones particulares del genoma (secuenciación de DNA, PCR-RFLP, DGGE, SSCP, Isoenzimas, Micro y Minisatélites)

En el caso del presente trabajo, se eligió como marcador molecular la región control del DNAm_t, debido a que sus niveles de variación permiten establecer las relaciones filogenéticas de las tortugas marinas (ver capítulo I). Para decidir la técnica que permitiera detectar la variación de la región control del DNAm_t en las poblaciones del género *Chelonia*, se procedió a evaluar de manera preliminar con simulaciones las herramientas moleculares que pueden aplicarse a esta región del genoma: secuenciación, PCR-RFLP y DGGE.

Mientras que la secuenciación del DNA es la técnica que permite detectar la totalidad de la variabilidad entre los organismos (sustituciones, inserciones o deleciones), tiene como desventaja su elevado costo en relación con otras técnicas que podrían proporcionar niveles de detección aceptables.

Una manera de reducir el costo de los estudios sería la combinación de técnicas económicas con la secuenciación. Bajo esta estrategia se realiza la secuenciación en una sub-muestra para clasificar e identificar los distintos haplotipos, y posteriormente se aplica una técnica más económica que garantice

diferenciar los haplotipos detectados con las secuencias, para aplicarse al resto de la muestra. Esta metodología se presenta en la Figura 3.1.

Para decidir que técnica económica tiene la capacidad de distinguir los haplotipos conocidos del género *Chelonia*, se realizó una simulación con las técnicas de DGGE y RFLP. Las simulaciones se realizaron aprovechando la disponibilidad de secuencias de la región control del DNA. Por la composición nucleotídica de una secuencia es posible predecir la respuesta que tendrá frente a la condiciones enzimáticas y/o físicoquímicas de la DGGE y RFLP. A continuación se presenta una breve descripción de ambas técnicas.

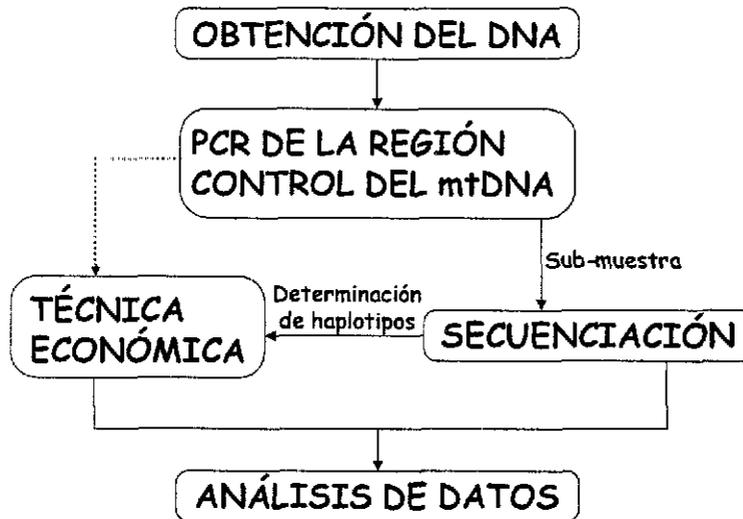


Figura 3.1. La línea punteada representa que este paso es posterior a la secuenciación y determinación de los distintos haplotipos detectados con la secuenciación.

DGGE

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis o Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante) es un tipo de electroforesis para ácidos nucleicos de doble cadena que permite detectar diferencias entre secuencias debido a las variaciones que estas diferencias provocan en la T_m de la molécula. La T_m se define como la temperatura a la que el 50 % de las moléculas de DNA se encuentran en estructura de doble cadena unida por puentes de hidrogeno (Figura 3.2). Este valor depende de la proporción de bases púricas y pirimídicas de la secuencia, debido a que la unión entre A-T (dada por dos puentes de hidrógeno)

es más labil que la unión G-C (con tres puentes de hidrógeno). Las secuencias que tengan alto contenido de G y C son más estables que secuencias ricas en A y T. Por esto el patrón de desnaturalización de dos moléculas de DNA del mismo tamaño, puede variar dependiendo de su composición. Como consecuencia de este fenómeno es posible diferenciar entre moléculas por su comportamiento bajo distintas temperaturas ó bajo distintas concentraciones de sustancias desnaturalizantes (ácidos, bases, urea, SDS; Lerman *et al.* 1981 en Myers *et al.* 1987).

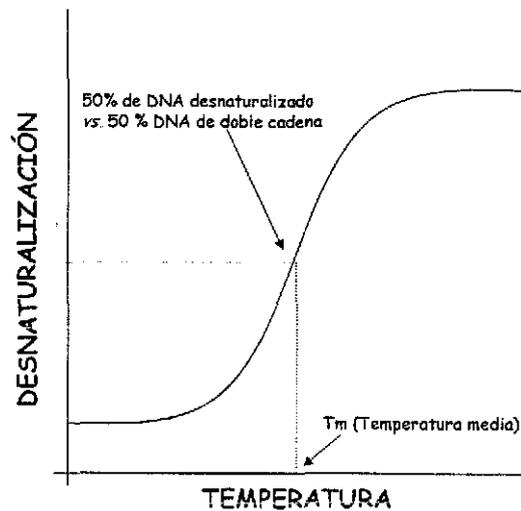


Figura 3.2. Comportamiento sigmoideo del DNA en distintas temperaturas, con respecto al porcentaje de desnaturalización, y el punto en el que se establece el valor de T_m .

Ya que la composición del DNA afecta el nivel de desnaturalización dependiendo de la temperatura y/o de la concentración del agente desnaturalizante, es posible distinguir entre diferentes secuencias de DNA por su movilidad diferencial en geles con un gradiente de concentración de un compuesto desnaturalizante (comúnmente urea). El DNA desnaturalizado tiene una velocidad de migración menor que el DNA de doble cadena, diferenciando dos o más fragmentos del mismo tamaño en pares de bases pero con distinta composición. Empleando este método es posible identificar sustituciones, inserciones y deleciones en una o mas bases, en moléculas de 150 a 1000 p.b. (Myers *et al.* 1987), lo que permite diferenciar secuencias de DNA.

Se ha observado que la desnaturalización del DNA se presenta con el cambio de estado (doble cadena→cadena sencilla) de un número considerable de pares de bases (50 a 300) de manera simultánea, a estos segmentos de la secuencia se les ha denominado dominios. Los dominios responden a cambios de una sola base generando efectos en las bases vecinas. Para tener una idea del efecto de la desnaturalización diferencial entre secuencias, basta mencionar que la desnaturalización de 90 bases de un fragmento de 500 pb puede generar la reducción de velocidad de migración en un 20 % con respecto a una secuencia con sus 500 bases en estructura de doble cadena (Myers *et al.* 1987).

Al describirse la técnica DGGE por primera vez (Fisher y Lerman, 1983) se requería el uso de sondas marcadas radiactivamente para detectar las cadenas de DNA, pues aun no se describía ningún método para la amplificación dirigida *in vitro*, pero después de la descripción de la PCR (Saiki *et al.* 1985) fue posible generar diversos fragmentos para su análisis directamente sin la necesidad de usar una sonda marcada.

La estrategia para distinguir los distintos alelos de una población consiste en realizar un corrimiento preliminar que se denomina "DGGE perpendicular". Este consiste en correr las muestras en un gel con un gradiente perpendicular del agente desnaturalizante con respecto a la dirección de la electroforesis, para evaluar el rango de concentración del desnaturalizante (generalmente es de 25 a 30% del punto medio de desnaturalización) en el que se puede resolver los distintos alelos de una muestra (Figura 3.3).

Para obtener una simulación de la respuesta bajo condiciones desnaturalizantes de secuencias de la región control del mtDNA, se emplearon las secuencias obtenidas por Encalada *et al.* (1996). Secuencias con T_m diferente tendrán distinta velocidad de migración en el gel desnaturalizante y serían diferenciables.

RFLP

La técnica de RFLP (Restriction Fragments of Length Polymorphism o Restricción de Fragmentos de Longitud Polimórfica) permite detectar diferencias entre genomas de distintos organismos con base en la pérdida o ganancia de sitios de restricción (secuencias específicas que son reconocidas por endonucleasas de restricción). Existen varios protocolos (Hillis *et. al.* 1996), todos tienen como objetivo identificar la variación en tamaño de los fragmentos que permitan diferenciar a las entidades de estudio (individuos, poblaciones, especies, y taxa supra-específicos).

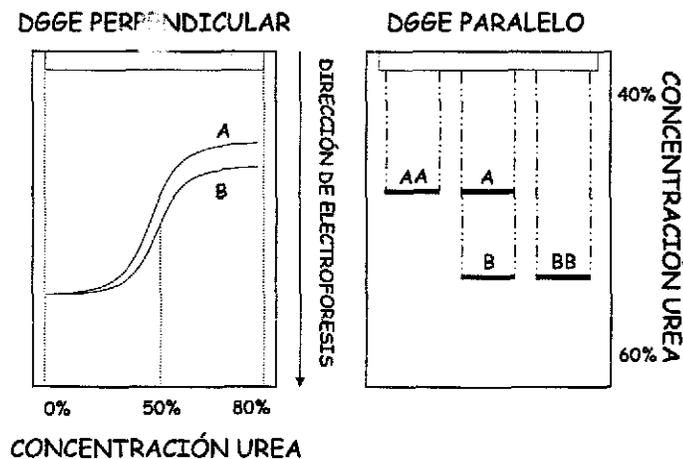


Figura 3.3. En el gel perpendicular se somete a electroforesis una muestra y se observa que en el lado izquierdo del gel con menor concentración de urea no hay diferencia en la migración de los dos alelos, y en el extremo derecho, en el que las concentraciones de urea son altas se observa el distinto patrón de migración del alelo **A** más lento, con respecto al alelo **B**. En el DGGE paralelo se realiza con un gradiente del 40 al 60% que cubre un rango de 20% con respecto al 50% de concentración de urea que se observa en el gel perpendicular es el punto en el que ambos alelos pueden distinguirse. En el gel paralelo se muestra en tres carriles el comportamiento de los alelos de 3 individuos diferentes, dos homocigotos AA y BB y un heterocigoto AB (Modificado de Lessa, 1992).

Posterior al desarrollo de la PCR (Saiki *et al.* 1985) es posible dirigir los análisis de RFLP's hacia regiones específicas del genoma de un organismo. Los fragmentos amplificados con PCR son sometidos a restricción (corte) con endonucleasas, para posteriormente visualizar los fragmentos de restricción con métodos sencillos de tinción (bromuro de etidio o tinción con plata) en geles de agarosa o poliacrilamida.

La combinación de PCR con RFLP es útil, pues permite detectar diferencias en secuencias de distintos individuos aprovechando la sensibilidad de PCR para amplificar regiones específicas de un genoma y la resolución de RFLP para comparar secuencias. Este método ha sido empleado previamente en tortugas marinas con buenos resultados (Avise y Karl, 1993).

EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DGGE Y RFLP PARA SECUENCIAS DE TORTUGAS MARINAS USANDO SIMULACIONES

Para evaluar la capacidad de los DGGE y RFLP para diferenciar secuencias de tortugas marinas se analizaron las características de los 17 haplotipos de la región control del DNAm_t de tortuga verde (*Chelonia mydas*) reportadas por Encalada *et al.* (1996).

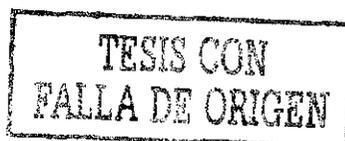
Primero se calculó la T_m de las 17 secuencias empleando el programa diseñado por Breslauer y colaboradores (1986). Presumiblemente, diferentes T_m generan diferente velocidad de migración en un sistema de DGGE.

Los mapas de restricción (patrones de fragmentos que serían obtenidos con las endonucleasas disponibles comercialmente) de las 17 secuencias fueron determinados con el programa Webcutter 2.0 (Heiman, 1997).

Previo al análisis de las secuencias se realizó el alineamiento de las mismas con ClustalV para PC versión 1.7 (Thompson *et al.* 1994) y revisado a ojo empleando GeneDoc para PC versión 2.2.0 (Nicholas *et al.* 1997) para verificar que los 17 haplotipos fueran diferentes en al menos una posición; de lo contrario no sería posible encontrar diferencia entre estos (Figura 3.4).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos son una predicción de lo que podría obtenerse aplicando estas técnicas en el laboratorio. El objetivo de estas simulaciones fue detectar cuál de las dos técnicas; PCR-RFLP o DGGE, sería la más sensible para distinguir a los 17 distintos haplotipos analizados.



Con la técnica de RFLP se identificaron 42 enzimas que tienen sitios de restricción dentro de las secuencias. Sin embargo, sólo 19 de estas podrían generar cortes informativos (que permitan diferenciar a las secuencias), el resto (23 enzimas) generarían el mismo patrón de corte (enzimas sombreadas en la Tabla 3.1).

A partir del análisis teórico de restricción, se agruparon las enzimas que generaron un mismo patrón. Por ejemplo, la enzima Alu-I, tiene la capacidad de distinguir dos grupos en los haplotipos empleados; el primero constituido por las secuencias 1, 2, 3, 4, 9, 13, 14, 17, 15, 16, 18 y el segundo por las secuencias 5, 6, 8, 10, 11, 12. La enzima Mwo-I agrupa a las mismas secuencias y por esta razón se le agrupo con la enzima Alu I (ver tabla 3.2.).

De este análisis se distinguen 11 enzimas de las 19 seleccionadas previamente con las cuales es posible teóricamente distinguir 12 de las 17 secuencias sometidas al análisis (70 % de los haplotipos analizados).

Con respecto a las simulaciones del comportamiento de las mismas 17 secuencias en un DGGE, los valores de T_m obtenidos (Tabla 3.3) sugieren que sólo sería posible detectar únicamente 8 secuencias diferentes (47% de las secuencias).

Los valores de T_m se ven afectados por la concentración de sales y de DNA de una solución determinada, por lo que se buscó aumentar la capacidad de resolución de la técnica empleando distintos valores de las concentración de sales y DNA para detectar diferencias entre dos secuencias que en un principio fueron indistinguibles. Si bien el cambio de las variables afectó los valores de T_m este cambio fue uniforme para todas las secuencias, lo que impidió aumentar la resolución (ver tabla 3.4).

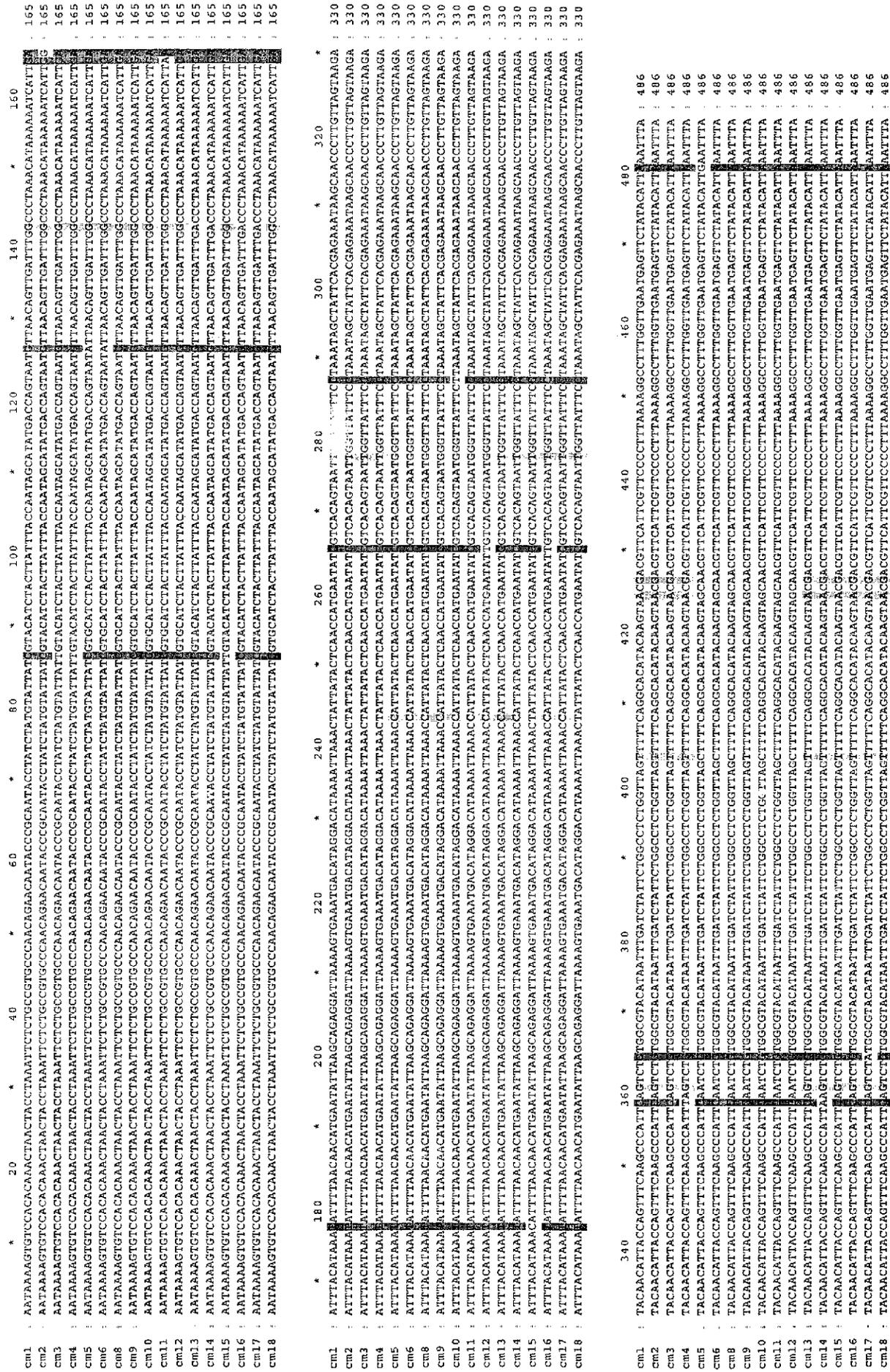


Figura 3.4. Alineamiento de los 17 haplotipos (secuencias) empleados en las simulaciones de RFLP y DGGE

Tabla 3.1 En la primera Columna están los nombres de enzimas de restricción, En la primera fila están las secuencias analizadas, en la intersección de la primera fila y columna están la posición de los distintos sitios de corte separados por una diagonal. Se muestra en sombreado las enzimas no informativas para ninguna de las 17 secuencias

| | cm1 | cm2 | cm3 | cm4 | cm5 | cm6 | cm7 | cm8 | cm9 | cm10 | cm11 | cm12 | cm13 | cm14 | cm15 | cm16 | cm17 | cm18 |
|--------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| AclI | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 | 53423 |
| AluI | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 | 191295 |
| ApolI | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 |
| BclII | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 | 28458 |
| BngI | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 | 46440 |
| BstI | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 | 37449 |
| BspI2 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 | 48438 |
| BstI | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 | 117146223 |
| BssSI | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 | 185301 |
| CjeI | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 | 232254 |
| ClePI | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 | 120366 |
| DpnI | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 | 104382 |
| DraI | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 |
| EcoNI | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 | 39447 |
| FauI | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 | 70416 |
| HaeIII | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 | 3361392 |
| HaeIII | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 | 3361143249 |
| HincII | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 |
| HpaI | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 | 129357 |
| MaeIII | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 | 65155266 |
| MspI | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 | 83196207 |
| NdeI | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 | 113373 |
| NheI | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 | 68192226 |
| RsaI | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 | 89115282 |
| SauI6 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 | 142344 |
| SauI6 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 | 106380 |
| SspI | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 | 17178291 |
| SstI | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 | 33453 |
| TalI | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 | 58431 |
| Tsp45 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 | 220266 |
| Tsp4c | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 | 133139214 |
| XcmI | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 | 125361 |
| XmnI | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 | 19467 |
| BstCI | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 | 87389 |
| CvrII | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 | 80396 |
| MstII | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 | 213273 |
| NcoI | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 | 77409 |
| PstI4: | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 | 58428 |
| SmaI: | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 | 144342 |
| SnaI: | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 | 99387 |
| Tad | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 | 89397 |
| Tsp60 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 | 532133316 |

Tabla 3.2. Patrones de restricción esperados. Se presenta en columnas (verticales) de distinto tono (gris o blanco) las enzimas que generan la misma asociación de grupos de las secuencias analizadas. 0 indica que la enzima no tiene sitios de restricción, 1,2,3,4 indican el número de cortes esperados. Las líneas (horizontales) en distintos tonos agrupan las secuencias que no son distinguibles (3,4; 5,6; 10,11; 13,14 y 17).

| haplotipo | Enzima de restricción | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------|------|------|------|--------|------|-------|--------|--------|--------|------|------|-------|-------|---------|------|----------|------|------|
| | AluI | MwoI | ApoI | CgeI | MaeIII | CvrI | MstII | HaeIII | Sau96I | HincII | HpaI | RsaI | SfaNI | BsrGI | Tsp509I | SspI | Psp1406I | SimI | TatI |
| Cm I | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Cm II | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Cm III | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Cm IV | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Cm V | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Cm VI | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Cm VIII | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Cm IX | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Cm X | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Cm XI | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Cm XII | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 1 |
| Cm XIII | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Cm XIV | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Cm XVII | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Cm XV | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Cm XVI | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Cm XVIII | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

Es posible que un análisis combinado con ambas técnicas permita diferenciar más secuencias. Por ejemplo, las secuencias 3 y 4 son indistinguibles empleando RFLP con las enzimas seleccionadas, pero estas mismas secuencias presentan diferente valor de T_m , por lo que su comportamiento en un DGGE sería

diferente. Sin embargo, las secuencias cm17 y 14 muestran un comportamiento homogéneo frente a ambas simulaciones, por lo que son indistinguibles.

Tabla 3.3. En esta tabla se presentan los distintos valores obtenidos de T_m y entre líneas gruesas se presentan los grupos de secuencias que se pueden distinguir

| Secuencia | Tamaño pb. | T_m esperada* |
|-----------|------------|--------------------|
| CM4 | 486 | 90.4 |
| CM14 | 486 | 90.6 |
| CM17 | 486 | 90.6 |
| CM1 | 486 | 90.6 |
| GM1 | 486 | 90.7 |
| CM16 | 486 | 90.7 |
| CM13 | 486 | 90.8 |
| CM15 | 486 | 90.8 |
| CM2 | 486 | 90.8 |
| CM18 | 486 | 90.9 |
| CM11 | 486 | 91.1 |
| CM6 | 486 | 91.1 |
| CM10 | 486 | 91.2 |
| CM12 | 486 | 91.2 |
| CM9 | 486 | 91.2 |
| CM5 | 486 | 91.3 |
| CM8 | 486 | 91.3 |

Con estas evaluaciones concluyo que no es posible distinguir con las dos técnicas toda la variabilidad genética de los 17 haplotipos. Ambas técnicas son más económicas que la secuenciación, que ofrece la máxima resolución para detectar la variabilidad genética de la región control, pero desafortunadamente no son eficientes para detectar toda la variabilidad genética. Esta conclusión motivó el uso de secuencias de nucleótidos para el presente trabajo.

El principal argumento para usar secuencias en lugar de RFLP, es que con esta técnica no siempre se pueden discernir entre todos los haplotipos presentes en una población. Esto se evidenció con la simulación del análisis de enzimas de restricción para los cinco haplotipos encontrados en este trabajo; el alineamiento de estos haplotipos (E, F, H, I, M) se muestra en el capítulo IV.

Tabla 3.4. Se observa como el comportamiento de T_m variando la concentración de sal y DNA tiene el mismo efecto para las dos secuencias impidiendo diferenciarlas.

| Concentración de DNA nM | Concentración de Sales en mM | T_m observada °C | |
|-------------------------|------------------------------|--------------------|-------|
| | | cm10 | cm12 |
| 50 | 1 | 63.0 | 63.0 |
| 50 | 200 | 101.2 | 101.2 |
| 50 | 500 | 107.8 | 107.8 |
| 50 | 1000 | 112.8 | 112.8 |
| 1 | 50 | 90.9 | 90.9 |
| 50 | 50 | 91.2 | 91.2 |
| 200 | 50 | 91.3 | 91.3 |
| 500 | 50 | 91.4 | 91.4 |
| 1000 | 50 | 91.5 | 91.5 |
| 1000 | 1 | 63.3 | 63.3 |
| 1 | 1000 | 112.5 | 112.5 |

El análisis se realizó con el programa Webcutter 2.0 (Heiman, 1997), que busca los sitios de reconocimiento de mas de 400 enzimas de restricción sobre los distintos haplotipos. Evaluando los resultados se comprueba que de los cinco haplotipos encontrados en este trabajo, sólo se pueden diferenciar tres (E, F e I) y los dos restantes (H y M) son indistinguibles con los patrones de restricción generados.

En este análisis (ver tabla 3.5) es claro que de haber empleado una estrategia como la muestreada en la Figura 3.1, los haplotipos E, H y M no se habrían diferenciado.

A pesar de que en este caso no fueron eficientes las técnicas económicas para diferenciar los haplotipos encontrados, este tipo de simulaciones son recomendables como estudios preliminares que pueden hacer potencialmente más accesible el proyecto, lo que se traduce en un análisis de un mayor número de muestras.

Tabla 3.5. Enzimas de restricción que permiten diferenciar los haplotipos E, F e I. Los haplotipos H y M (en contorno) no son distinguibles entre si. El signo + indica presencia de sitio de corte en el haplotipo y el signo – ausencia de sitio de corte. El mapa de restricción se refiere a los distintos patrones de restricción obtenidos.

| Enzima(s) | Posición | Haplotipos | | | | |
|--|-------------|------------|---|----------|---|----------|
| | | <i>E</i> | F | <i>H</i> | I | <i>M</i> |
| HindI | 56- g/antc | + | + | + | - | + |
| TfiI | 56- g/awtc | + | + | + | - | + |
| DpnII, NdeII, Sau3AI, Bsp143I, Kzo9I, MboI | 56- /gatc | - | - | - | + | - |
| BstYI, BstX2I, MfiI, XhoII | 56- r/gatcy | - | - | - | + | - |
| BamHI, BstI | 56- g/gatcc | - | - | - | + | - |
| NlaIV, PspN4I | 58- ggn/ncc | - | - | - | + | - |
| DpnI | 58- ga/tc | - | - | - | + | - |
| MnII | 98- cctc | - | + | - | - | - |
| Sse9I, TspEI, Tsp509I | 97- /aatt | + | - | + | + | + |
| BsoFI, Fsp4HI, ItaI | 184- gc/ngc | - | + | - | - | - |
| Mapa de restricción | | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 |

CAPÍTULO IV VARIACIÓN GENÉTICA DE LA TORTUGA NEGRA EN MICHOACÁN.

INTRODUCCIÓN.

Con el desarrollo de la Biología de la Conservación se ha vuelto de gran importancia conocer los niveles de variabilidad y diferenciación genética; particularmente, de las especies amenazadas o en peligro de extinción (Avice, 1994, Frankel y Soulé 1981). Desde los años 60 se han realizado análisis de diferenciación y variabilidad genética empleando técnicas moleculares; sin embargo, en las dos décadas pasadas, con el desarrollo de nuevas herramientas moleculares, se hizo posible su estudio más detallado.

Existen distintas medidas de variabilidad genética, que dependen del tipo de marcador molecular, así como de la técnica de análisis empleada. En este capítulo se presentan las medidas empleadas para secuencias de ácidos nucleicos aplicadas a la región control del mtDNA.

La variabilidad genética, tiene un componente de particular interés para los genetistas de poblaciones, el de la distribución de la misma entre las unidades demográficas; es decir, cómo se encuentran distribuidos en el espacio y en el tiempo los alelos o haplotipos. Esta distribución tiene implicaciones importantes para la conservación. Se dice que una población tiene "estructura" genética cuando las distintas subpoblaciones tienen diferentes frecuencias alélicas y genotípicas entre subpoblaciones mientras que en una población "sin estructura" no hay diferencia en las frecuencias alélicas y genotípicas entre subpoblaciones (Hartl y Clark, 1989).

La estructura genética de las poblaciones se ve afectada por el flujo génico entre subpoblaciones. El flujo génico se define como el número de migrantes efectivos por generación entre dos subpoblaciones (Hartl y Clark 1989). Se consideran migrantes efectivos aquellos individuos que logran reproducirse dentro de la población a la que migran de manera que exista intercambio de genes entre

las dos subpoblaciones. Si un individuo migra de una subpoblación a otra, pero no logra reproducirse, sus genes no se intercambian y esta migración no constituye flujo génico.

Si se conoce la distribución actual de la variabilidad genética, se pueden hacer inferencias acerca de las relaciones entre dos subpoblaciones, partiendo del supuesto que poblaciones que experimentan un intercambio de genes serán más parecidas genéticamente que aquellas que no intercambian material genético.

Uno de los objetivos más importantes de la genética de poblaciones cuando se busca una aplicación práctica, es la definición o identificación de las unidades de conservación. La identificación de estas unidades, es útil al jerarquizar las poblaciones de una especie amenazada y dirigir de manera más eficiente los esfuerzos y recursos para la conservación. A la fecha se han planteado dos niveles diferentes de agrupación de las poblaciones de acuerdo con marcadores genéticos (Moritz, 1994):

- Las poblaciones o grupos de poblaciones que están aisladas y han evolucionado de manera independiente por largos periodos de tiempo son definidas como Unidades Evolutivas Significativas (ESU, siglas en inglés para Evolutionary Significant Units).
- Poblaciones demográficamente independientes (con limitado flujo genético entre ellas) dentro de las ESU, definidas como Unidades de Manejo (MU, siglas en inglés para Management Units).

Las ESU pueden distinguirse por diferencias entre poblaciones en marcadores mitocondriales o nucleares y son monofiléticas, mientras que las Unidades de Manejo (MU) muestran diferencias significativas (p. ej. en frecuencias alélicas) en cualquier marcador, pero no son monofiléticas.

En tortugas marinas resulta relevante determinar las unidades de manejo para dirigir las actividades de conservación. En este contexto es importante definir lo que se representa en una unidad de manejo: ¿una playa?, ¿varias playas de un

mismo estado de la república? o ¿una región costera que comprende varios estados?

Para detectar MU es necesario determinar los niveles de aislamiento reproductivo entre las colonias de anidación lo cual es posible mediante el análisis de marcadores moleculares.

OBJETIVOS

- Estimar los niveles de variabilidad genética de la población anidadora de la tortuga negra, en el estado de Michoacán, México.
- Determinar la distribución de la variabilidad genética en el espacio y tiempo de la población anidadora de la tortuga negra en el estado de Michoacán, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Alineamiento de la secuencias nucleotídicas

Cuando se tienen las secuencias de nucleótidos de todos los individuos es necesario alinearlas para poder evaluar el número y posición de sitios polimórficos, que a su vez permiten identificar a los distintos haplotipos. Para el presente trabajo se realizó el alineamiento con el programa ClustalV para PC versión 1.7 (Higgins, 1991), revisando el alineamiento a ojo, empleando el programa GeneDoc para PC versión 2.2.0 (Nicholas *et al.* 1997).

Estimación de variabilidad genética

Posterior al alineamiento de las secuencias se estimó: La diversidad genética, Diversidad nucleotídica (π_n) y Número promedio de diferencias pareadas con Arlequín para PC versión 1.1. (Schneider *et al.* 2000). Para la estimación de Theta por sitio se empleo DNAsp ver 3 (Rozas y Rozas 1999).

Diversidad genética (H)

Esta medida, también conocida como diversidad haplotípica cuando se usa para analizar secuencias de DNA (Nei, 1987), es equivalente a la heterocigosis esperada obtenida con marcadores de diploides, y se define como la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes (Nei, 1987).

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

Su varianza es calculada por la siguiente formula:

$$V(H) = \frac{2}{n(n-1)} \left[2(n-2) \sum_{i=1}^k p_i^3 \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^k p_i^2 \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right]$$

Donde: H es la diversidad genética, $V(H)$ es la varianza de la diversidad genética, n es el número de copias de genes en la muestra, k es el número de haplotipos y p_i es la frecuencia del i ésimo haplotipo en la muestra

Número promedio de diferencias pareadas (π)

Es el número promedio de diferencias entre todos los pares de haplotipos en la muestra y está dado por:

$$\pi = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k P_i P_j d_{ij}$$

Donde: d_{ij} es el estimado del número de diferencias entre los haplotipos i y j , k es el número de haplotipos y P_i es la frecuencia del haplotipo i . La varianza total, asumiendo que no hay recombinación entre los sitios y que los haplotipos son selectivamente neutrales, se obtiene con la siguiente formula (Tajima, 1993).

$$V(\pi) = \frac{3n(n-1)\pi - 2(n^2 + n + 3)\pi^2}{11(n^2 - 7n + 6)}$$

Diversidad nucleotídica (π_n)

Es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes. Esta medida es equivalente a la diversidad genética a nivel nucleótido (Tajima, 1983 y Nei 1987 pp. 257).

$$p_n = \frac{\sum_{i < j}^k P_i P_j d_{ij}}{L}$$

La varianza se obtiene de

$$V(p_n) = \frac{n-1}{3(n-1)L} p_n + \frac{2(n^2-1+n-3)}{9n(n-1)} p_i^2$$

Donde: L es el número de loci (nucleótidos) en los haplotipos analizados

Theta (θ)

Este es un parámetro que se puede obtener si conocemos el tamaño efectivo, N_e , y la tasa de mutación, μ , con la siguiente formula $\theta = 4N_e\mu$ (en el caso de genes haploides la formula es $\theta = 2N_e\mu$). Dado que ambos parámetros son difíciles de conocer en las poblaciones naturales. Se han desarrollado métodos indirectos para estimar el parámetro θ . En este trabajo se estimó con el método propuesto por Watterson (1975) y la varianza empleando la formula desarrollada por Tajima (1989), como sigue:

$$\theta = \frac{S}{a_1}$$

Donde S es el número de sitios polimórficos y $a_1 = \sum_{i=1}^n \frac{1}{i}$

La varianza de θ se obtiene con la fórmula

$$V(q) = \frac{a_1^2 S^2 + a_2^2 S^2}{a_1^2 (a_1^2 + a_2^2)}$$

Donde: $a_2 = \sum_{i=1}^m \frac{1}{f_i^2}$

Frecuencia haplotípica

Si un haplotipo es observado x_i veces en una muestra que contiene n secuencias, entonces la frecuencia del haplotipo i (P_i) se obtiene con la siguiente fórmula (Schneider *et al.* 2000)

$$P_i = \frac{X_i}{n}$$

Y la varianza esta dada por:

$$V(P_i) = \frac{P_i(1 - P_i)}{n}$$

Análisis de estructura genética

Para estimar la estructura genética de la población se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), empleando el algoritmo correspondiente en el programa Arlequín para PC versión 2.0 (Schneider *et al.* 2000). Este análisis es similar a otros que emplean la varianza de las frecuencias génicas, pero considera también el número de mutaciones que ocurren entre haplotipos empleando un análisis jerárquico para evaluar las diferencias dentro y entre individuos de una subpoblación y entre subpoblaciones, para definir los índices de fijación definidos por Wright (1965) en función de coeficientes de endogamia, y posteriormente en cuanto a tiempos de coalescencia por Slatkin (1991).

$$F_{st} = \frac{f_0 - f_1}{1 - f_1} = \frac{\bar{t}_1 - \bar{t}_0}{\bar{t}_1}$$

Donde f_0 es la probabilidad de que dos genes tomados de la misma población sean idénticos por descendencia; f_T es la probabilidad de que dos genes tomados de diferentes poblaciones sean idénticos por descendencia; \bar{t}_1 es el tiempo promedio a la coalescencia de dos genes tomados de diferentes poblaciones y \bar{t}_0 es el tiempo promedio a la coalescencia de dos genes tomados al azar de una misma población.

Para el análisis de estructura genética se obtuvieron los valores de F_{st} a partir de distintas agrupaciones de los datos poblacionales, para evaluar si hay diferencia significativa entre la distribución de alelos (estructura genética) de las playas en el espacio y el tiempo:

- A. Para evaluar la presencia de estructura genética espacial y temporal entre todas las playas se utilizaron las secuencias de dos temporadas de anidación (temporada 96-97 designadas; Colola 1, Maruata 1, Paso de Noria 1 y Arenas Blancas 1; para la temporada 97-98; Colola 2, Maruata 2 y así respectivamente para el resto de las localidades de Michoacán).
- B. Para evaluar si hay estructura genética temporal se consideró a todas las playas de cada temporada como una subpoblación.
- C. Para evaluar la presencia de estructura genética sólo en el espacio, entre las playas de anidación sin considerar el tiempo, se realizó un análisis uniando las secuencias de las dos temporadas de muestreo para cada playa.

Para cada valor de F_{st} se estimó el valor de p para la siguiente hipótesis nula. *Ho: Valor de F_{st} observado es igual a un valor de F_{st} generado al azar en 1000 permutaciones.*

Estimación del Flujo Génico

Es posible estimar el flujo génico (Nm) entre las subpoblaciones de manera indirecta (a partir de F_{st}) si (a) se considera que la tasa de mutación μ es muy baja

tal y como ha sido reportado para tortugas marinas (Awise *et al.* 1992) y (b) existe una relación de equilibrio entre la migración y la deriva génica. Entonces,

$$F_{st} = \frac{1}{2M + 1}$$

donde M es el número absoluto de migrantes intercambiados (Nm) entre las dos poblaciones. Despejando M se obtiene:

$$M = \frac{1 - F_{st}}{2F_{st}}$$

En general, se acepta que valores de flujo génico mayor que uno son suficientes para mantener a las poblaciones unidas de manera que no se produzca diferenciación genética entre las mismas (Lewontin, 1974). Sin embargo algunos autores como Mills y Allendorf (1996) demuestran que Nm igual a uno es suficiente en un escenario teórico, pero en poblaciones naturales $Nm \approx 10$ es requerido para garantizar la conectividad genética incluso entre poblaciones con diferencias significativas en su tamaño efectivo.

RESULTADOS

Variabilidad genética

Se obtuvieron 123 secuencias de cuatro playas del estado de Michoacán de dos temporadas de anidación (tabla 4.1). En estas secuencias se identificaron cinco haplotipos diferentes con ocho posiciones polimórficas, seis transiciones, dos transversiones y ninguna inserción deleción (indel) en los 400 pares de bases analizados. A cada haplotipo se le asignó una letra de manera arbitraria para identificarlos (E, F, H, I, M).

En la figura 4.1 se muestra el alineamiento de los cinco haplotipos. El número de individuos para cada haplotipo y la frecuencia relativa de los mismos para todo Michoacán se muestra en la tabla 4.2. El tipo de substituciones

(transiciones y transversiones) y posición en la que se presentan en los cinco haplotipos se muestra en la tabla 4.3.

Tabla 4.1. Se muestran los sitios de colecta, el número de muestras, secuencias y frecuencia de los haplotipos por playa

| Temporada | Playa | Secuencias | E | F | H | I | M |
|----------------------------|----------------|------------|----|----|---|---|---|
| 96-97 | Colola | 33 | 21 | 10 | | 2 | |
| | Maruata | 11 | 6 | 4 | 1 | | |
| | Paso de Noria | 2 | 1 | 1 | | | |
| | Arenas Blancas | 8 | 4 | 1 | | | 3 |
| 97-98 | Colola | 37 | 27 | 10 | | | |
| | Maruata | 8 | 4 | 4 | | | |
| | Paso de Noria | 13 | 12 | 1 | | | |
| | Arenas Blancas | 11 | 7 | 4 | | | |
| Agrupando ambas temporadas | Colola | 70 | 48 | 20 | | 2 | |
| | Maruata | 19 | 10 | 8 | 1 | | |
| | Paso de Noria | 15 | 13 | 2 | | | |
| | Arenas blancas | 19 | 11 | 5 | | | 3 |
| | Totales | 123 | 82 | 35 | 1 | 2 | 3 |

En la tabla 4.4 se muestran los resultados de los distintos indicadores de variabilidad genética. La primera fila tiene los valores de las 123 secuencias de Michoacán consideradas como una población. En las siguientes ocho filas se encuentran los valores de cada playa muestreada por temporada. En las siguientes cuatro filas se encuentran los valores obtenidos para las playas de anidación considerando a las muestras de las dos temporadas juntas y en la última fila se encuentra el promedio de todos los datos. Todas las muestras obtenidas entre septiembre de 1996 y enero de 1997 se les asigna 1, y las muestras obtenidas entre septiembre de 1997 y enero de 1998 se les asigna el número 2.

Tabla 4.2. Haplotipos encontrados, número de individuos por haplotipo y frecuencia relativa de los mismos en las playas de anidación.

| Haplotipo | Numero de individuos | Frecuencia relativa |
|-----------|----------------------|---------------------|
| E | 82 | 0.667 |
| F | 35 | 0.285 |
| H | 1 | 0.008 |
| I | 2 | 0.016 |
| M | 3 | 0.024 |
| Total | 123 | 1.000 |

Tabla 4.3. Posiciones polimórficas y tipos de sustitución en los cinco haplotipos encontrados. En gris oscuro se muestran las transversiones.

| | | Haplotipo | | | | |
|----------|-----|-----------|---|---|---|---|
| | | E | F | H | I | M |
| Posición | 57 | A | A | A | G | A |
| | 98 | A | G | A | A | A |
| | 183 | G | G | A | G | G |
| | 184 | T | C | T | T | T |
| | 257 | T | T | T | T | C |
| | 317 | C | T | C | T | C |
| | 399 | T | T | T | T | A |
| | 400 | T | T | T | T | G |

Tabla 4.4. Playa de anidación, número de secuencias y niveles de variabilidad genética con distintos estimadores para 400 pb región control DNAm_t de la tortuga negra. Para diversidad haplotípica, promedio de diferencias pareadas y diversidad nucleotídica (entre paréntesis se muestran las varianzas). Para Theta (θ) (entre paréntesis se muestran las desviaciones estándar). Los números de las playas se refieren a la temporada en que fueron obtenidas las muestras y playas sin número tienen los valores por playa de las dos temporadas. La primera fila tiene los valores de las 123 secuencias de Michoacán consideradas como una población. En las siguientes 8 filas se encuentran los valores de cada playa muestreada por temporada. En las penúltimas cuatro filas se encuentran los valores obtenidos para las playas de anidación considerando a las muestras de las dos temporadas juntas y en la última fila se encuentra el promedio de todos los datos.

| Colonia de anidación | N | Diversidad haplotípica, H | Promedio diferencias pareadas | Diversidad nucleotídica, π | Theta θ /sitio |
|----------------------|------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Michoacán | 123 | 0.48 (0.04) | 1.45 (0.89) | 0.0036 (0.0024) | 0.00361 |
| Colola 1 | 33 | 0.51 (0.07) | 1.48 (0.92) | 0.0037 (0.0025) | 0.00361 |
| Colola 2 | 37 | 0.40 (0.07) | 1.22 (0.80) | 0.0031 (0.0022) | 0.00305 |
| Maruata 1 | 11 | 0.62 (0.10) | 1.72 (1.08) | 0.0043 (0.0031) | 0.00430 |
| Maruata 2 | 8 | 0.57 (0.09) | 1.73 (1.12) | 0.0043 (0.0032) | 0.00431 |
| Paso de Noria 1 | 2 | 1.00 (0.50) | 3.02 (2.46) | 0.0076 (0.0087) | 0.00758 |
| Paso de Noria 2 | 13 | 0.15 (0.13) | 0.46 (0.43) | 0.0012 (0.0012) | 0.00116 |
| Arenas Blancas 1 | 6 | 0.60 (0.21) | 2.01 (1.31) | 0.0050 (0.0039) | 0.00594 |
| Arenas Blancas 2 | 13 | 0.64 (0.10) | 2.25 (1.32) | 0.0056 (0.0037) | 0.00384 |
| Colola | 70 | 0.45 (0.05) | 1.32 (0.83) | 0.0033 (0.0023) | 0.00332 |
| Maruata | 19 | 0.57 (0.06) | 1.65 (1.01) | 0.0041 (0.0028) | 0.00415 |
| Paso de Noria | 15 | 0.25 (0.13) | 0.74 (0.58) | 0.0018 (0.0016) | 0.00186 |
| Arenas Blancas | 19 | 0.60 (0.09) | 2.09 (1.23) | 0.0052 (0.0034) | 0.00521 |
| Promedios | 20.5 | 0.53 | 2.25 | 0.0056 | 0.00399 |

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
E : TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTTGGCCCTAAACATGAAAATTATTCATCCACATAAAATATTTTGATAAC : 80
F : TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTTGGCCCTAAACATGAAAATTATTCATCCACATAAAATATTTTGATAAC : 80
H : TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTTGGCCCTAAACATGAAAATTATTCATCCACATAAAATATTTTGATAAC : 80
I : TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTTGGCCCTAAACATGAAAATTATTCATCCACATAAAATATTTTGATAAC : 80
M : TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTTGGCCCTAAACATGAAAATTATTCATCCACATAAAATATTTTGATAAC : 80

      *      100     *      120     *      140     *      160
E : ATGAATATTAAGCAGAGATTAAAAGTGAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTC : 160
F : ATGAATATTAAGCAGAGATTAAAAGTGAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTC : 160
H : ATGAATATTAAGCAGAGATTAAAAGTGAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTC : 160
I : ATGAATATTAAGCAGAGATTAAAAGTGAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTC : 160
M : ATGAATATTAAGCAGAGATTAAAAGTGAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTC : 160

      *      180     *      200     *      220     *      240
E : ACAGTAATTGGTTATTTCTTAAAGTCTATTCACGAGAAAATAAGCAACCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTC : 240
F : ACAGTAATTGGTTATTTCTTAAAGTCTATTCACGAGAAAATAAGCAACCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTC : 240
H : ACAGTAATTGGTTATTTCTTAAAGTCTATTCACGAGAAAATAAGCAACCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTC : 240
I : ACAGTAATTGGTTATTTCTTAAAGTCTATTCACGAGAAAATAAGCAACCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTC : 240
M : ACAGTAATTGGTTATTTCTTAAAGTCTATTCACGAGAAAATAAGCAACCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTC : 240

      *      260     *      280     *      300     *      320
E : AGGCCCATTTAGTTTATAGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCCTCTGGTIGTCTTTTCAGGCACATACAAATAAAGAAC : 320
F : AGGCCCATTTAGTTTATAGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCCTCTGGTIGTCTTTTCAGGCACATACAAATAAAGAAC : 320
H : AGGCCCATTTAGTTTATAGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCCTCTGGTIGTCTTTTCAGGCACATACAAATAAAGAAC : 320
I : AGGCCCATTTAGTTTATAGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCCTCTGGTIGTCTTTTCAGGCACATACAAATAAAGAAC : 320
M : AGGCCCATTTAGTTTATAGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCCTCTGGTIGTCTTTTCAGGCACATACAAATAAAGAAC : 320

      *      340     *      360     *      380     *      400
E : GTTCATTCGTTCCCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTTT : 400
F : GTTCATTCGTTCCCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTTT : 400
H : GTTCATTCGTTCCCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTTT : 400
I : GTTCATTCGTTCCCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTTT : 400
M : GTTCATTCGTTCCCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTTT : 400

```

Figura 4.1 Alineamiento de los cinco haplotipos encontrados en la población de tortuga negra *Chelonia agassizii* del estado de Michoacán. Los sitios variables son resaltados con fondo gris.

Estructura genética

De las distintas agrupaciones empleadas para analizar la estructura genética se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla correspondiente. Para cada una de ellas. Se obtienen dos tipos de valores de F_{st} :

- Valores pareados de F_{st} debajo de la diagonal entre las poblaciones. Arriba de la diagonal su significancia obtenida a partir de 1023 permutaciones de los datos (H_0 = no hay diferenciación entre poblaciones). Se presenta con

un signo (+) los valores significativamente diferentes de 0 y con (-) valores no significativamente diferentes de 0.

- Valores de F_{st} de todas las poblaciones, con su p que representa la probabilidad de que un valor obtenido al azar sea igual al observado. Los valores negativos de F_{st} representan la ausencia de estructura genética.

En A no se observa estructura genética entre las playas de anidación, de manera que la variación genética está distribuida homogéneamente el valor de F_{st} calculado para todas las poblaciones es de 0.00171 con una $p < 0.01$. Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Arriba de la diagonal valores de p inferiores a 0.5 muestran que F_{st} es significativamente diferentes de 0, debajo de la diagonal se muestran los valores de F_{st} pareados. Los valores de F_{st} negativos representan ausencia de estructura genética.

| | Colola 1 | Colola 2 | Maruata 1 | Maruata 2 | P. Noria 1 | P. Noria 2 | A. Blancas 1 | A. Blancas 2 |
|--------------|----------|----------|-----------|-----------|------------|------------|--------------|--------------|
| Colola 1 | | 0.603 | 0.762- | 0.396- | 0.99- | 0.059 | 0.455 | 0.287- |
| Colola 2 | -0.0181 | | 0.406 | 0.188 | 0.990 | 0.346 | 0.317 | 0.346 |
| Maruata 1 | -0.0504 | -0.0342 | | 0.604 | 0.990 | 0.051 | 0.297 | 0.544 |
| Maruata 2 | -0.0116 | 0.0440 | -0.0758 | | 0.990 | 0.029 | 0.109 | 0.455 |
| P. Noria 1 | -0.2486 | -0.1605 | -0.3519 | -0.4545 | | 0.247 | 0.218 | 0.990 |
| P. Noria 2 | 0.0943 | 0.0541 | 0.1405 | 0.3247 | 0.3460 | | 0.188 | 0.099 |
| A. Blancas 1 | 0.0079 | -0.0086 | -0.0134 | 0.0760 | -0.1632 | -0.0049 | | 0.812 |
| A. Blancas 2 | -0.0072 | -0.0011 | -0.0410 | -0.0116 | -0.2638 | 0.0855 | -0.1037 | |

En B se observa que no existe estructura temporal entre las tortugas anadoras de dos temporadas de Michoacán. El valor de F_{st} calculado para todas las poblaciones es de -0.0106. Tabla 4.6.

Tabla 4.6. F_{st} de las playas entre dos años bajo de la diagonal y arriba la diagonal está superior a 0.05, esto representa que no hay diferencia significativa de F_{st} con 0

| | Temporada 1996-1997 | Temporada 1997-1998 |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| Temporada 1996-1997 | | 0.637 |
| Temporada 1997-1998 | -0.0106 | |

En C se observa que no hay estructura entre las distintas playas de anidación. El valor de F_{st} calculado para todas las poblaciones es de -0.0106 con una $p < 0.01$. Tabla 4.6.

Tabla 4.7. Debajo de la diagonal, se presentan los valores de F_{st} asumiendo que la composición genética de las playas de anidación no cambia en el tiempo, la p de cada F_{st} se muestra arriba de la diagonal.

| | Colola | Maruata | P. Noria | A. Blancas |
|------------|--------|---------|----------|------------|
| Colola | | 0.289 | 0.288 | 0.223 |
| Maruata | 0.0036 | | 0.128 | 0.196 |
| P. Noria | 0.0242 | 0.1233 | | 0.263 |
| A. Blancas | 0.0198 | 0.0287 | 0.0233 | |

Flujo génico

Al no presentarse diferenciación genética ni espacial ni temporal, no se realizaron estimaciones de flujo génico.

DISCUSIÓN

Variabilidad genética

En las 123 secuencias obtenidas se observa que dos haplotipos (E y F) representan el 95.2 % de la población y los tres restantes (H, I, M) representan el 4.8 %. La baja frecuencia de estos haplotipos podría explicarse por tener un origen reciente, de manera que no se han dispersado en la población, o que son antiguos pero han sido eliminados parcialmente por procesos azarosos (deriva génica) como consecuencia de la reducción del tamaño poblacional.

La diversidad haplotípica (H) es igual que la heterocigosis esperada, medida empleada frecuentemente en estudios de electroforesis de isoenzimas. Esta medida de variabilidad tiene poco valor en el análisis de secuencias debido a que dos secuencias que difieren en un nucleótido o más son consideradas como haplotipos (alelos) diferentes, por lo que generalmente los valores de H obtenidos de secuencias son altos (Li, 1997).

Cuando se trabaja con secuencias de DNA, la H se interpreta como la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes. Es importante observar que la varianza de H se ve afectada por el

tamaño de muestra de individuos y nucleótidos analizados de cada subpoblación (Li 1997).

El valor más alto de diversidad haplotípica (H) es para la playa de Paso de Noria 1 (temporada 96-97). Sin embargo, este resultado es consecuencia del tamaño de muestra; sólo se tienen dos secuencias de esa playa y son haplotipos diferentes. El valor más pequeño de H es también para la playa de Paso de Noria, para las muestras obtenidas en la temporada 97-98. Cuando se observan valores altos de H es por dos razones: o hay un tamaño de muestra pequeño o los haplotipos de esa muestra tienen frecuencias similares. Valores bajos de H no están asociados a tamaños de muestra grandes, pero sí a una distribución sesgada de la frecuencia de un haplotipo con respecto al resto.

El promedio de diferencias pareadas más alto se presenta en la playa de Paso de Noria 1 y el valor más bajo es para Paso de Noria 2. Esta medida es más interesante que la H, porque es más informativo saber el número de nucleótidos diferentes entre dos secuencias que sólo saber que son diferentes (Li, 1997). Es claro que el valor de Paso de Noria 1 tiene es alto por el escaso tamaño de muestra. El promedio de diferencias pareadas depende del número, frecuencia y tipo de haplotipos en la población. Este valor es alto cuando hay más de un haplotipo y la frecuencia de estos es homogénea y es cero cuando sólo hay un haplotipo en la población.

La diversidad nucleotídica (π_n) es la medida más comúnmente empleada para medir diversidad genética con secuencias nucleotídicas. Esta medida es equivalente a la diversidad genética a nivel nucleótido. El valor teórico más alto de diversidad nucleotídica es de 0.25 y el menor es de 0.0. El valor más alto de π_n en las poblaciones analizadas es para Paso de Noria 1 (nuevamente este valor es alto por la escasa representatividad de esta muestra poblacional) y el más bajo es de Paso de Noria 2.

Una manera de saber si los niveles de variabilidad genética son altos o bajos es por medio de comparaciones con estos parámetros en otras poblaciones

de la misma especie, o especies cercanas. Existe un trabajo realizado por Encalada (1996) en el que se describen los niveles de variabilidad de poblaciones anidadoras de tortugas verdes, *Chelonia mydas*, en el Atlántico. Las muestras analizadas por Encalada (1996) pertenecen a poblaciones de distinto tamaño y son empleadas para comparar los valores de variabilidad reportados considerando a la población de Michoacán como una población panmítica (ver tabla 4.11.).

El valor más alto para ambas medidas de variabilidad es de Quintana Roo, a pesar de que la población anidadora de esta playa es inferior a unas 500 hembras por año. La población de Florida tiene un valor de diversidad haplotípica superior a los de Michoacán y Costa Rica. El valor de la diversidad nucleotídica en la población de Michoacán tiene un valor más alto que el de Florida y Costa Rica. Contrariamente a lo esperado, la población de Costa Rica, en la que está incluida la playa Tortuguero, que es la más grande del Atlántico en por lo menos un orden de magnitud con respecto a Michoacán (Bjorndal *et al.* 1999), tiene los valores de variabilidad más bajos.

Tabla 4.11. Valores de variabilidad genética de poblaciones de tortugas verdes *Chelonia mydas* del océano Pacífico (Michoacán) y el Atlántico (Costa Rica, Quintana Roo y Florida), Los datos de Michoacán son del presente trabajo y las tres poblaciones restantes son de Encalada (1996).

| Nombre común | Población | Tamaño de muestra (n) | Diversidad Haplotípica (H) | Diversidad Nucleotídica (π) | No. Haplotipos |
|---------------|--------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------|
| Tortuga negra | Michoacán* | 123 | 0.48 (0.040) | 0.00361 | 5 |
| Tortuga verde | Costa Rica * | 15 | 0.13 (0.110) | 0.00028 | 2 |
| | Quintana Roo | 21 | 0.82 (0.058) | 0.00570 | 7 |
| | Florida | 24 | 0.56 (0.047) | 0.00130 | 3 |

* Más de 500 nidos anuales, sin asterisco playa con menos de 500 nidos anuales.

La reducción en la variabilidad genética de una población que ha sufrido un cuello de botella, es provocada por endogamia y deriva génica. Para que estos procesos se manifiesten es necesario que transcurran varias generaciones. El

tiempo generacional para una tortuga es largo, se estima que las tortugas del género *Chelonia* adquieren su madurez sexual a los 35 años (Hirt, 1997); si consideramos que la explotación que generó el cuello de botella en las tortugas marinas, fue hace un par de décadas, esto implica que no ha transcurrido el tiempo suficiente para que se observe una reducción de la variabilidad genética en las colonias anidadoras de Michoacán. Es cierto que la reducción de la variabilidad genética ocurre también en el momento mismo del cuello de botella, pero para que este proceso sea más evidente se requiere que transcurran varias generaciones.

Es importante que se acumulen más datos de variabilidad genética de tortugas marinas para hacer comparaciones objetivas. Sería ideal tener los valores de diversidad genética para especies con tamaños poblacionales grandes (p. ej. tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*) y muy pequeños (p. ej. tortuga lora, *Lepidochelys kempii*) para hacer una mejor comparación.

La disminución de la variabilidad genética puede tener un efecto negativo sobre la adecuación de los organismos. Este proceso es más frecuente en poblaciones pequeñas y puede desencadenar una serie de eventos que se retroalimentan positivamente cuando la población es pequeña (Caughley 1994):

- La frecuencia de apareamientos entre individuos emparentados se incrementa.
- Los apareamientos entre individuos emparentados generan una disminución de la heterocigosis de la progenie.
- Se expresan los alelos recesivos semiletales y letales.
- Se reduce la fecundidad e incrementa la mortalidad.
- La población se reduce en tamaño y si persiste esta tendencia se puede extinguir por diferentes razones, la mas importante la estocasticidad demográfica.

Para que estos procesos se presenten se requiere que la población mantenga tamaños poblacionales pequeños por períodos largos.

El parámetro q (Watterson, 1975) no es una medida directa de variabilidad genética. Sin embargo, este valor se ve afectado por parámetros que están directamente relacionados con los niveles de variabilidad genética: el tamaño efectivo de población N_e y la tasa de mutación, μ , siguiendo la siguiente relación:

$$q = 2N_e\mu$$

De manera que si se obtiene q y se conoce la tasa de mutación puede obtenerse N_e con la siguiente ecuación

$$N_e = \frac{q}{2\mu}$$

Para la población anidadora del estado de Michoacán el parámetro q por sitio es de 0.00361 y para tortugas se estima que el porcentaje de divergencia de secuencias de la región control por cada millón de años es de 0.6 % (Awise *et al.* 1992). Con esta información, se puede obtener la tasa de mutación por generación, si consideramos un tiempo generacional para las tortugas del género *Chelonia* de 35 años (Hirt, 1997). Entonces para los 400 pb analizados se espera que exista un 2.4 bases diferentes en un millón de años (0.6 % de 400 pb). En un millón de años hay 28,571.42 generaciones de tortuga marina ($1,000,000/35 = 28,571.42$), finalmente si dividimos el número de bases diferentes entre el número de generaciones que hay en un millón de años obtenemos la tasa de mutación del gene por generación ($2.4/28,571.42 = 8.4 \times 10^{-5}$) y dividiendo este valor entre los 400 pb obtenemos la tasa de mutación por sitio por generación de 2.1×10^{-7} substituyendo obtenemos.

$$N_e = \frac{0.00361}{2(2.1 \times 10^{-7})} = 8,595.2$$

Este tamaño efectivo de población es un tamaño efectivo histórico y no es comparable con el calculado a partir de datos demográficos. Este valor se encuentra dentro del rango reportado para otros autores en animales (Kaessmann

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

et al. 1999) pero de tres ordenes de magnitud inferior al reportado para angiospermas (Cumplings y Clegg, 1998).

Estructura genética y flujo génico

La medida de estructura genética empleada en este trabajo es la F_{st} derivada del análisis molecular de varianza de las secuencias de DNA (en sentido estricto de un AMOVA se obtiene Φ_{st} , que es análogo a F_{st}). Los valores de F_{st} reflejan la manera en que se encuentra distribuida la variación genética entre poblaciones y adquiere valores de entre 0 y 1. Si F_{st} tiene valores cercanos a 0, implica que la variación genética se encuentra distribuida homogéneamente, de manera que si conservamos cualquier subpoblación, estamos conservando la mayor parte de la variación genética de la especie. Si se obtiene un valor para F_{st} de 1, implica que la variación genética esta distribuida heterogéneamente entre las subpoblaciones.

Con fines de conservación, si existen valores bajos de F_{st} , esto indica que al menos desde el punto de vista genético no es necesario conservar todas las subpoblaciones. Este no es un criterio que se deba usar indiscriminadamente, pero puede ser útil cuando existen recursos limitados y es necesario jerarquizar a las distintas subpoblaciones de una especie para optimizar los recursos destinados a conservación. Sin embargo, es importante considerar los elementos demográficos de la especie, de manera que sea posible hacer una propuesta integral. Se ha propuesto también que subpoblaciones aisladas conservan la variabilidad genética de manera más eficiente que una sola población panmítica de tamaño similar (Pope, 1996).

A pesar de que los indicadores de estructura genética muestran que la variabilidad genética de las poblaciones anidadoras del estado de Michoacán está distribuida de manera homogénea, es evidente que existen algunas playas que tienen características genéticas peculiares, en las que es importante se desarrollen actividades de conservación para salvaguardar estos haplotipos "privados" (*sensu* Slatkin, 1985):

- En la colonia que anida en Colola, en donde se encontraron 2 tortugas con haplotipo I.
- Maruata, en donde se encontró una tortuga con Haplotipo H.
- Arenas Blancas, en la que se encontraron 3 tortugas respectivamente que tenían el haplotipo M.

La estimación indirecta del flujo génico contiene información relevante desde el punto de vista histórico y no de la dinámica actual de la población. Las estimaciones de flujo génico obtenidas a partir de F_{st} no deben considerarse como precisas (Withlock y Mccauley 1999). Sin embargo, obtener estimaciones directas del flujo génico de tortugas marinas es logísticamente muy complicado por lo que recurrimos en este trabajo al cálculo del flujo génico de manera indirecta.

Para determinar el grado del aislamiento reproductivo de las playas empleamos las frecuencias haplotípicas partiendo del siguiente hecho: Si dos poblaciones se encuentran aisladas por periodos de tiempo significativos en marcadores neutrales se puede dar un cambio cualitativo y cuantitativo de las frecuencias alélicas por mutación, deriva génica y/o endogamia (la región control del DNAm no está sujeta a selección ni sufre recombinación (Anderson *et al.* 1981; Giles *et al.* 1980; Cann *et al.* 1987). Se ha determinado que si un par de poblaciones no se encuentran aisladas reproductivamente, intercambiando al menos un organismo migrante que se reproduzca por generación, no es posible que ocurran procesos de diferenciación genética (Scott y Allendorf, 1995). Es posible, por tanto, estimar la cantidad flujo génico (Nm) a partir de la diferenciación genética entre dos poblaciones.

Con respecto a los valores de flujo génico obtenidos, se observa que en todos los casos el valor obtenido es mayor a 1, por lo que suponemos que no existe diferenciación genética entre las subpoblaciones. La única excepción es la colonia que anida en Paso de Noria (tabla 4.6a); esto refleja una conectividad histórica cercana entre las distintas colonias. Las comparaciones en las que se

obtiene un valor infinito indica que el valor de flujo génico es muy grande y rebasa los límites de estimación del algoritmo, pero no es infinito en sentido estricto.

De lo anterior se puede concluir que no es posible diferenciar a cada una de las playas de anidación analizadas como unidades de manejo independientes.

CAPÍTULO V RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO *Chelonia*

INTRODUCCIÓN

Es deseable que la clasificación taxonómica refleje las relaciones filogenéticas de los organismos vivos, con la finalidad de comprender el proceso y las rutas evolutivas de los eventos de especiación. Sin embargo, existen diversas complicaciones que afectan la identificación del inicio y terminación de estos eventos; es decir, cómo se puede definir objetivamente el límite entre una especie y otra. Existen múltiples conceptos de especie que hacen énfasis en diversos atributos de los organismos. Futuyma (1998) plantea que al menos existen siete definiciones de especie, de manera que no siempre es posible que una especie sea considerada como tal bajo todas las definiciones.

Mientras que no es un objetivo de esta tesis hacer una revisión sobre los diversos conceptos de especie, es indispensable mencionar que el *Concepto Biológico de Especie* propuesto por Mayr (1942) es el que se emplea comúnmente (aunque no es aplicable a todas las formas vivas p. ej. en organismos con reproducción asexual) y hay otros conceptos como el *Evolutivo* propuesto por Simpson (1951) y Wiley (1978), o el *Filogenético* propuesto por Cracraft (1989) y de Queiroz y Donoghue (1990) que presumiblemente tienen una aplicación más universal y objetiva.

Actualmente, la situación taxonómica de la tortuga negra es motivo de controversia. Algunos autores sugieren que la tortuga negra, es una especie independiente (*Chelonia agassizii*), mientras que otros autores sugieren que es una población regional o una subespecie (*Chelonia mydas* o *Chelonia mydas agassizii* respectivamente). La controversia se debe a que existen evidencias a favor y en contra de la asignación de especie para la tortuga negra:

- Se ha encontrado que la *C. agassizii* y *C. mydas* son especies que ocurren de manera simpátrica en algunas localidades (Islas Galápagos y Nueva Guinea)

sin que a la fecha se tenga evidencia de eventos reproductivos entre estas, por lo que Pritchard (1997) considera que existe aislamiento reproductivo y por consiguiente es válida la existencia *Ch. agassizii* como especie.

- La tortuga negra es diferente en cuanto a forma, tamaño y coloración del caparazón, de acuerdo a un trabajo en el que se comparan tortugas del estado de Michoacán (México, océano Pacífico) y de la playa Tortuguero, (Costa Rica, océano Atlántico) (Figueroa y Alvarado 1990).
- Kamezaki y Matsui (1995) analizaron medidas craneales de siete playas de anidación, dos del Atlántico y 5 del Pacífico, concluyendo que la diferenciación morfológica que ellos encuentran entre *C. mydas* y *C. agassizii* es suficiente para clasificarla sólo como la subespecie: *C. mydas agassizii*.
- Bowen *et al.* (1992) analizaron el DNAmT con enzimas de restricción sobre muestras de 15 colonias dentro de la área de distribución global del género *Chelonia*, encontrando una clara distinción entre las poblaciones del Indo-Pacífico con respecto a las del Atlántico y Mediterráneo. Sin embargo, no encontraron evidencia, para considerar que la tortuga negra forme un linaje independiente con respecto a las demás tortugas de este género, por lo tanto no se apoya la asignación de especie independiente.
- Karl *et al.* (1992) analizaron genes nucleares de copia única, con enzimas de restricción para evaluar la diferenciación genética entre tortuga negra y verde. En su análisis filogenético no se apoya la asignación de especie para *C. agassizii*.
- Dutton *et al.* 1996a secuenciaron dos segmentos mitocondriales de tortuga negra y verde (ND4 y región control) sin que el análisis filogenético demuestre una distinción clara de la tortuga negra con respecto a la tortuga verde.
- Karl y Bowen (1999) secuenciaron 1,341 pares de bases de tres loci usados por Karl *et al.* (1992), sin observar que las tortugas negras analizadas formen un grupo monofilético distinto al resto de las *Chelonias*.

Los trabajos previamente realizados con tortuga negra tienen tamaños de muestra pequeños ($n < 8$) para las poblaciones de Michoacán donde se encuentran las principales playas de anidación para la tortuga negra. En este trabajo se incrementó significativamente el tamaño de muestra ($n = 135$), con el propósito de contar con una base más amplia, en los análisis de similitud y filogenético de esta tortuga marina.

OBJETIVOS

- Comparar las secuencias de la región control del DNAm_t obtenidas de las colonias anidadoras de tortuga negra con aquellas disponibles en la literatura.
- Establecer las relaciones de similitud en el género *Chelonia* con base en la región control del mtDNA
- Establecer las relaciones filogenéticas dentro del género *Chelonia* con base en la región control del mtDNA

MATERIALES Y MÉTODOS

Los haplotipos empleados para este análisis son (tabla 5.1.):

- Todos los encontrados en este trabajo (ver figura 4.1) originados en las colonias anidadoras de tortuga negra del Pacífico Oriental Mexicano (5 haplotipos)
- Haplotipos de colonias de *Chelonia*, provenientes de trabajos publicados: Dos haplotipos de colonias del Pacífico central, uno de colonias del Pacífico occidental, y cuatro haplotipos encontrados en poblaciones del Atlántico.
- Se eligió también una secuencia de tortuga caguama *Caretta caretta* y tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* como grupo externo del género *Chelonia*.

Tabla 5.1. Haplotipos empleados en la reconstrucción filogenética, océano de origen y referencia.

| Espece | Secuencia | Localización | Fuente |
|--|------------|---|----------------------------|
| Tortuga negra <i>Chelonia agassizii</i> | Haplo-E | Pacífico Oriental México (Michoacán) | Este trabajo |
| | Haplo-F | | |
| | Haplo-H | | |
| | Haplo-I | | |
| | Haplo-M | | |
| | CA/Dutton | | Dutton <i>et al.</i> 1996a |
| Tortuga verde <i>Chelonia mydas</i> | CMHAW/Nor | Pacífico central Hawai | Norman <i>et al.</i> 1994 |
| | CMPA/Dutt | | Dutton <i>et al.</i> 1996a |
| | CMJVAa/Nor | Pacífico occidental Java | Norman <i>et al.</i> 1994 |
| | CMCGC/All | Atlántico occidental Florida | Allard <i>et al.</i> 1994 |
| | CM5/Encal | Atlántico occidental Surinam | Encalada 1996 |
| | CM8/Encal | Atlántico Oriental Guinea-Bissau | Encalada 1996 |
| | CM9/Encal | Mediterráneo Chipre | Encalada 1996 |
| Golfina <i>Lepidochelys Olivacea</i> | Olivacea | Grupo externo | Dutton <i>et al.</i> 1996a |
| Caguama <i>Caretta caretta</i> | Caretta | Grupo externo | Dutton <i>et al.</i> 1996 |

De tortugas marinas del género *Chelonia* se encuentran mas de 50 registros de secuencias de la región control del mtDNA en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html>) pero no todas se pueden utilizar en este análisis debido a las siguientes razones: algunas secuencias corresponden a distintos fragmentos de la región control y no son del mismo tamaño, en otros casos los haplotipos son distintos en solo una posición

con respecto al resto de los haplotipos (una autapomorfia) por lo que no resultan ser secuencias redundantes. Por estas razones se seleccionaron las secuencias anteriormente mencionadas.

Con las 14 secuencias seleccionadas se realizó el alineamiento, con ClustalV para PC versión 1.7 (Higgins, 1991) y se revisó a ojo sobre la visualización de las secuencias proporcionadas por el programa GeneDoc para PC versión 2.2.0 (Nicholas *et al.* 1997).

El alineamiento de las secuencias es un proceso crucial para el establecimiento de relaciones filogenéticas, pues en este proceso se forman hipótesis de homología (taxica o transformacional *sensu* De Luna y Mishler, 1996). El alineamiento obtenido se presenta en la figura 5.1.

RELACIONES DE SIMILITUD DEL GÉNERO *Chelonia*

Con el alineamiento mostrado en la figura 5.1 se realizó un "bootstrap" (mil replicas) con SEQBOOT (PHYLIP 3.5 Felsenstein, 1993) y posteriormente se generaron las matrices de distancias genéticas empleando el programa DNADIST de PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1993). Las distancias se calcularon con el modelo de Kimura de dos parámetros con una proporción de transición : transversión de 14:1 propuesto por Karam (1997). Con las matrices de distancias se generaron los fenogramas empleando el algoritmo de NEIGHBOR de PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1993 basado en el procedimiento "Neighbor Joining" de Saitou y Nei, 1987). Con los fenogramas obtenidos se realizó un consenso, para determinar las relaciones de similitud entre los 15 haplotipos. El árbol obtenido se editó empleando *Treeview* versión 1.5.2. (Page, 1996).

RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO *Chelonia*

Para la reconstrucción filogenética se uso el mismo alineamiento presentado en la figura 5.1. Se realizaron varios análisis. En primera instancia una búsqueda heurística del cladograma más parsimonioso usando Winclada como interfase para Nona (Nixon, 1999).posteriormente se realizó una Bootstrap (10 mil

replicas) con un análisis heurístico de cada una de las matrices, y a partir de los cladogramas obtenidos se generó un cladograma consenso. Finalmente se le realizó un análisis para obtener el índice de decaimiento "decay index" con SEPAL Versión 1.4. (Salisbury, 2001).

RESULTADOS

RELACIONES DE SIMILITUD DEL GENERO *Chelonia*.

En el fenograma obtenido (figura 5.2.) se observa que los haplotipos del Pacífico y Atlántico caen en distintos grupos. Los haplotipos de tortuga negra marcados en gris se encuentran muy cercanos en distancia con los haplotipos de *C. mydas* del Pacífico.

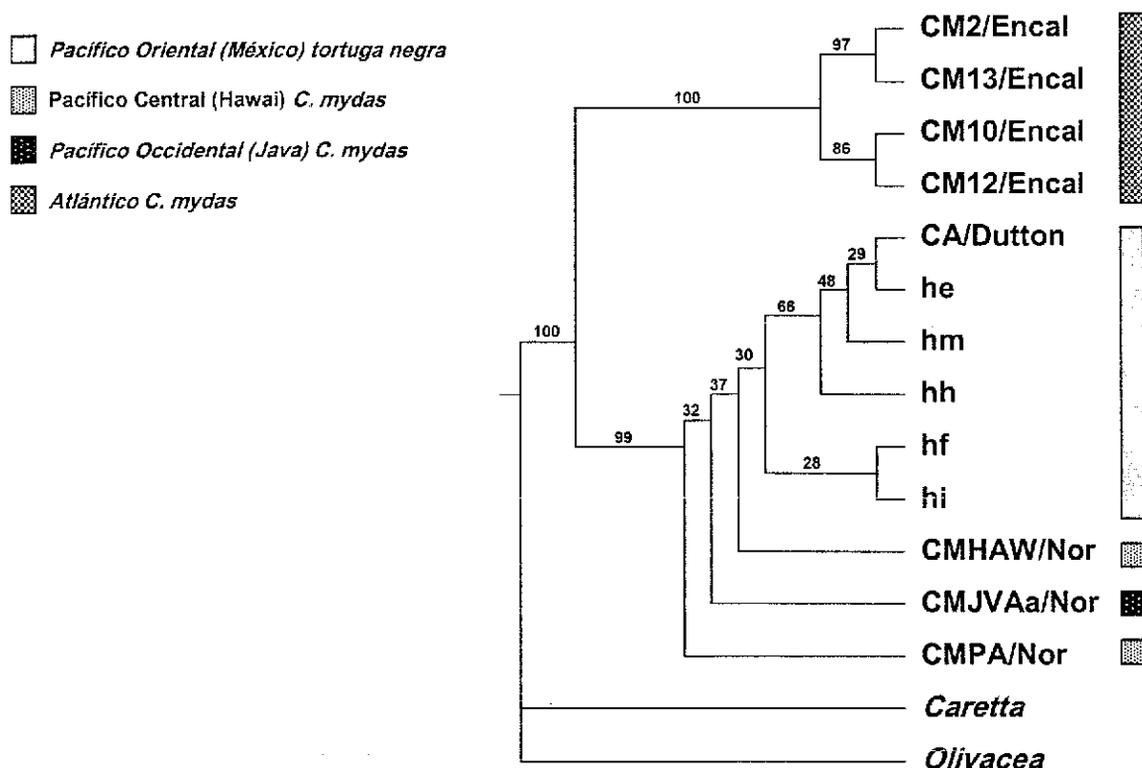


Figura 5.2. Fenograma obtenido a partir de las distancias genéticas entre haplotipos de *Chelonia* en colonias del Pacífico y Atlántico. Los números en las ramas representa el porcentaje de aparición de las mismas en un análisis de bootstrap .

RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO *Chelonia*

Con el análisis heurístico se obtuvieron ocho árboles igualmente parsimoniosos. En la figura 5.3. se muestra uno de los árboles igualmente

parsimoniosos, la raíz del árbol fue definida por los grupos externos (secuencias de *Caretta caretta* y *Lepidochelys olivacea*).

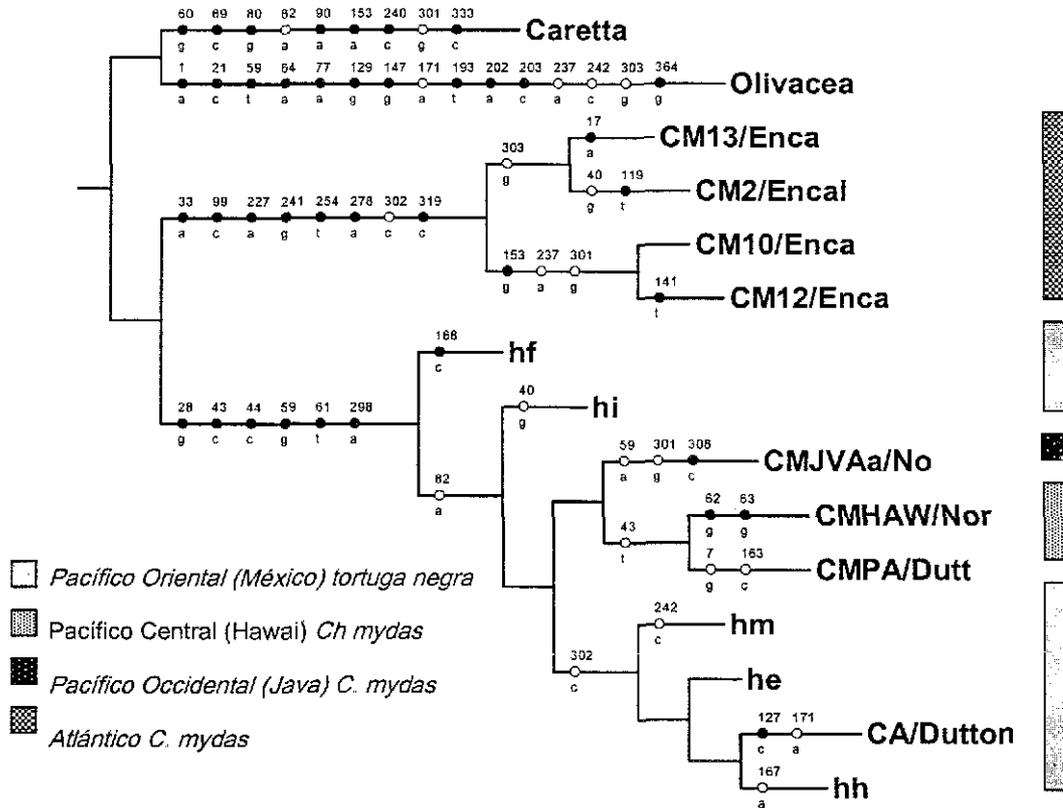


Figura 5.3 Uno de 8 cladogramas igualmente parsimoniosos obtenidos en una búsqueda heurística, los valores de este cladograma son los siguientes. Largo del cladograma = 103 índice de consistencia = 81 índice de retención = 85. los círculos negros representan cambios no homoplásicos (sinapomorfias o autapomorfias) y círculos blancos representan caracteres homoplásicos. Los números arriba de los círculos representan la posición en la que se encuentran los cambios, y la letra debajo de las ramas representa el estado de carácter.

El cladograma obtenido muestra que los haplotipos de tortuga negra (marcados con rectángulo gris) forman un grupo polifilético dentro del clado de poblaciones de *C. mydas* del Pacífico central (marcados con rectángulo de puntos negros y fondo blanco) y de las poblaciones de *C. mydas* del Pacífico occidental (rectángulo de puntos blancos fondo negro). Aparte, en otro clado, se encuentran los haplotipos de *C. mydas* del océano Atlántico (marcados con rectángulo de cuadros pequeños blanco y negro).

Los valores de Índice de consistencia (CI) son una medida que determina el nivel de homoplasias en una filogenia, un índice de consistencia igual a uno representa una filogenia que no tiene caracteres homoplásicos. El valor de índice de consistencia obtenido en esta filogenia es bueno. Se ha observado que el valor del índice de consistencia se encuentra negativamente correlacionado con el número de taxa terminales (OTUs) y el número de datos. Esto limita su uso particularmente cuando se pretende comparar este valor obtenido en cladogramas con distinto número de OTUs y caracteres (Siebert, 1994).

El índice de retención es una medida más robusta de evidencia de soporte de los clados formados con respecto al CI y representa la fracción de aparentes sinapomorfias en los caracteres que son retenidas como sinapomorfias en el cladograma final (Lipscomb, 1998). El índice de retención posee la ventaja sobre el índice de consistencia en el sentido de que los caracteres no-informativos, autapomorfias, ni simplisimorfias no lo hacen crecer. El valor obtenido de índice de retención indica que una alta proporción (0.85) de las sinapomorfias en los datos se mantienen como sinapomorfias en el cladograma.

En la figura 5.4. se muestra al análisis de decaimiento de la filogenia generada. El índice de decaimiento representa número de pasos que puede relajarse un clado sin colapsarse. Esto es, si un grupo monofilético está presente en todos los cladogramas mayores en 5 pasos con respecto al cladograma más parsimonioso, pero no en los cladogramas de 6 pasos, entonces ese grupo monofilético tiene un índice de decaimiento de 6. En la figura se observan politomias que no se mantienen si se aumenta el número de pasos.

La figura 5.5. presenta el cladograma obtenido después de 10 mil replicas de bootstrap. Los clados obtenidos en los tres análisis son los mismos (en el análisis de decaimiento y bootstrap se observan politomias en algunas ramas por las razones que se explican en el texto), esta evidencia aunada a los valores de IC, IR, sugieren que la reconstrucción filogenética es robusta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

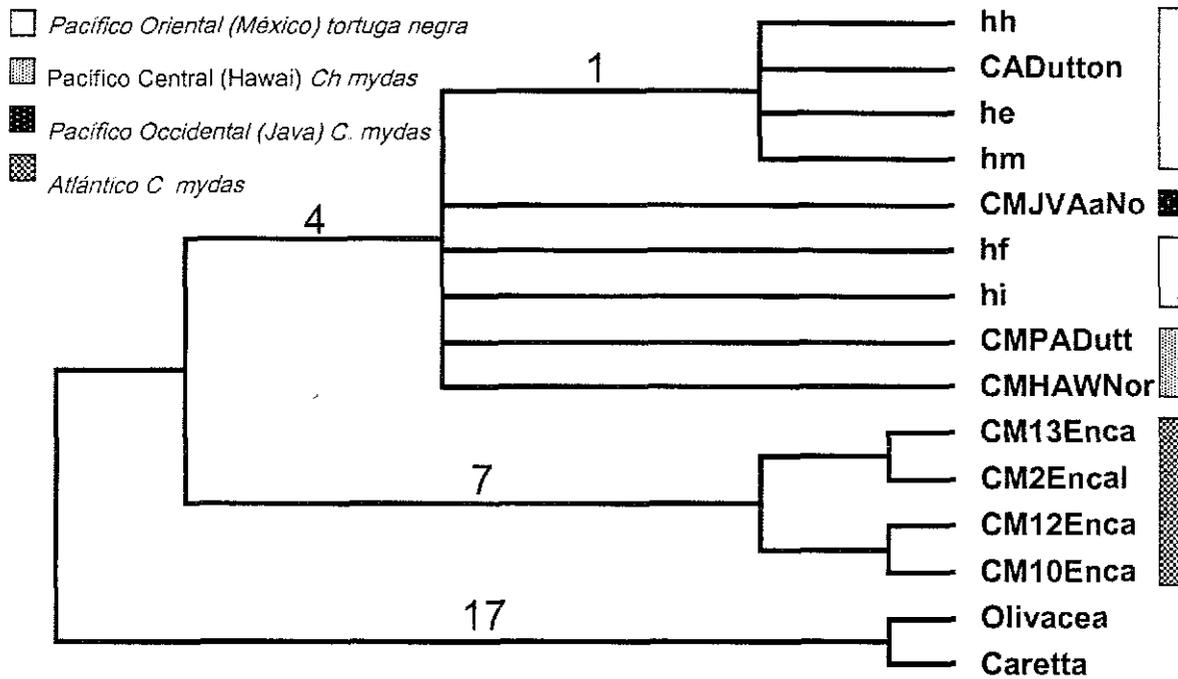


Figura 5.4. Cladograma en el que se muestra el análisis de decaimiento. Los números sobre las ramas son los valores de decaimiento. Las politomias se encuentran agrupando OTUs que no se mantienen al incrementar el número de pasos en el árbol.

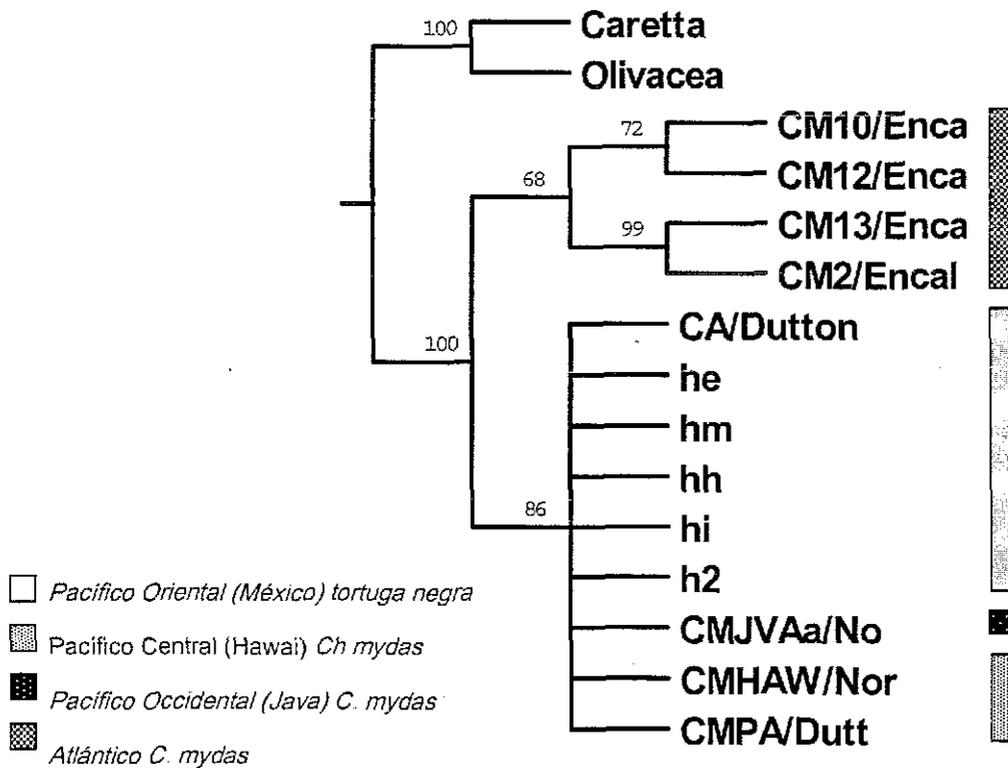


Figura 5.5. Cladograma de consenso estricto de 10 mil cladogramas. Los valores arriba de las clados representa su porcentaje de aparición en los 10 mil cladogramas analizados.

DISCUSIÓN

Antes de empezar con la discusión de las relaciones filogenéticas cabe decir que a partir de la filogenia observada en la figura 5.3 se observa que existen 14 sustituciones entre los haplotipos del Atlántico y Pacífico, esto implica que hay un 4.66 % de diferenciación entre los haplotipos de estas dos cuencas oceánicas, que se separaron aproximadamente hace 3.5 millones de años (Collins *et al.* 1996), esto implica que hay un 1.33 % de diferenciación en una secuencia por cada millón de años, con lo que se puede inferir existe una disminución en la tasa de evolución de 33.5 % inferior con respecto a la tasa de evolución de los vertebrados (2 % de divergencia por cada millón de años) y seis veces mayor que el valor reportado para este género por Avise *et al.* (1992) esto es debido a que este autor estimo el grado de diferenciación basándose en información de RFLP's que como se ha discutido anteriormente (ver capítulo 3) subestiman la variación genética al no detectar todas las posiciones polimórficas.

En este trabajo se realizaron análisis fenéticos y cladistas pues no hay consenso en cual es la metodología correcta para reconstruir filogenias. En las simulaciones realizadas para determinar que metodología es más robusta los resultados no son concluyentes, algunos autores plantean que el desempeño de los algoritmos es similar en el sentido de que logran la reconstrucción de la historia evolutiva con un alto grado de exactitud (Hillis *et al.* 1994), otros autores plantean que los algoritmos basados en matrices de distancia (fenéticos) son más robustos (Sourdis y Nei 1988) sin embargo Crisci y López (1983) han planteado que las relaciones obtenidas con métodos fenéticos no siempre son congruentes con las relaciones genealógicas base de las especies.

Cuando se trabaja con a similitud para reconstruir la filogenia se corre el peligro de interpretar de manera errónea las relaciones filogenéticas, esto es en el sentido de que no necesariamente los individuos más similares están más estrechamente relacionados desde el punto de vista filogenético, como se muestra en la figura 5.6. este tipo de fenómenos se pueden observar como resultado del

análisis de caracteres homoplásicos resultado de convergencias, paralelismos y reversiones Crisci y López (1983).

Del los análisis obtenidos por métodos fenéticos (figura 5.2) y cladísticos (figura 5.3., 5.4. y 5.5.) se puede discutir lo siguiente.

Si la tortuga negra se hubiera diferenciado como especie independiente como propone Pritchard (1997, 1999) se esperaría que los haplotipos de ésta se agruparan aparte del resto de los haplotipos del genero *Chelonia*, por el patrón de sinapomorfias constituyendo un grupo monofilético.

En los cladogramas obtenidos (figura 5.3., 5.4., 5.5.) y el fenograma (figura 5.2) se observa que las tortugas del género *Chelonia* del Atlántico y Pacífico se encuentran, efectivamente, en clados diferentes manteniendo un patrón filogeográfico congruente con la separación geográfica de las poblaciones. Sin embargo a no puede observarse un patrón filogeográfico perfecto cuando se observan los haplotipos de las tortugas del Pacífico.

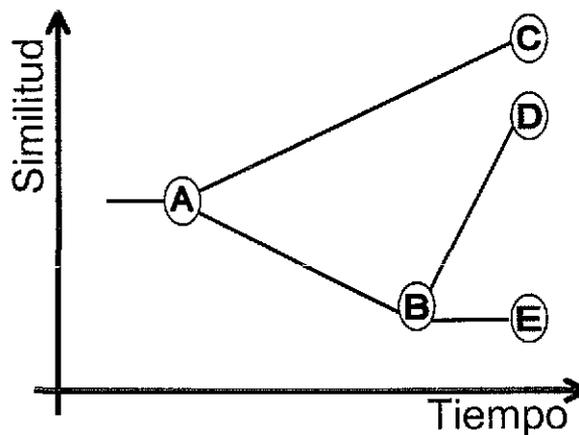


Figura 5.6. representación gráfica de las relaciones filogenéticas entre 5 OTU's hipotéticos, (A, B, C, D y E) en la que se muestra que los OTU's C y D son similares pero se encuentran evolutivamente distantes.

El resultado del presente análisis no apoya la asignación de especie (*sensu* Concepto Filogenético de Especie Cracraft, 1989., de Queiroz y Donaghue 1990)

debido a que la tortuga negra forma un grupo monofilético con los haplotipos de tortuga verde del Pacífico y los haplotipos de tortugas verdes del Atlántico se agrupan en un grupo monofilético distinto. En la sistemática actual no se duda que las *C. mydas* de ambas cuencas oceánicas pertenecen a una misma especie. Una asignación de especie independiente a la tortuga negra requeriría que esta se encontrara en un grupo monofilético independiente separado de el grupo de haplotipos de tortuga verde tanto del Atlántico como del Pacífico. El resultado respecto a la situación taxonómica de la tortuga negra es el mismo en los análisis realizados con el método fenético o cladístico (ver figuras 5.2., 5.3., 5.4. y 5.5.).

Actualmente la evidencia proporcionada por la sistemática molecular genera una hipótesis de trabajo que puede ser mejorada conforme se adicionen datos no sólo moleculares y entonces de modo que con una enfoque holista se pueda definir la situación taxonómica del complejo *Chelonia*.

De la evidencia existente en contra y a favor de la asignación de especie de la tortuga negra discutiré a continuación lo pertinente para cada una de ellas.

Pritchard, 1997 indica que *C. mydas* y *agassizii* son simpátricas en algunas localidades (Islas Galápagos y Nueva Guinea). Esto implica que ambas "especies" comparten una misma localidad pero no se reproducen. Sin embargo a la fecha no existe un estudio en el que se demuestre que las *C. agassizii* se apareen con las *C. mydas* sin producir descendencia pero tampoco existe evidencia de que no lo pueden realizar, por lo tanto este argumento no es relevante hasta que se tenga alguna evidencia concreta.

Los trabajos realizados por Figueroa y Alvarado (1990) y por Kamezaki y Matsui (1995), presentan evidencia morfológica de forma y tamaño del caparazón y cráneo respectivamente. Figueroa y Alvarado (1990) proponen que la tortuga negra es una especie, mientras que Kamezaki y Matsui (1995) la consideran una subespecie. El trabajo de Kamezaki y Matsui fue realizado con base a muestras de siete playas de anidación, dos del Atlántico y cinco del Pacífico; Alvarado y Figueroa consideran muestras de dos sitios de anidación, Colola, Michoacán en el

Pacífico y Tortuguero, Costa Rica en el Atlántico. Es evidente que hace falta obtener información morfológica del área de distribución del género *Chelonia* para que estos análisis sean mas robustos, información molecular de toda el área de distribución del género *Chelonia* se encuentra disponible.

El trabajo de Bowen *et al.* (1992) ha sido criticado por los defensores del status de especie para la tortuga negra (Pritchard, 1999) por la aparente incongruencia obtenida en los árboles de similitud en los que los haplotipos de Michoacán son más similares a los de Omán del océano indico que a los de las Islas Galápagos. Karl y Bowen (1999) responden de la siguiente manera "*La información genética (y no la morfológica) han vislumbrado el único patrón zoogeográfico de esta especie que tiene sentido: la separación de las poblaciones del Atlántico-Mediterráneo e Indico-Pacífico en una escala de un par de millones de años. La similitud de dos colonias ampliamente separadas (del océano Indico y Pacífico) no es sorprendente en el contexto de los recientes estudios que demuestran que las tortugas marinas cruzan regularmente las cuencas oceánicas (Bowen et. al.1995)*"

Se ha criticado a los trabajos de sistemática molecular con tortugas marinas porque en un principio se realizaron trabajos únicamente con DNAm, pero en la actualidad existen trabajos con secuencias de marcadores nucleares (Dutton *et al.* 1996a, Karl y Bowen 1999) y la evidencia aportada por estos trabajos es congruente con el DNAm, en el sentido de que la tortuga negra esta más estrechamente relacionada con las tortuga verdes del océano Pacífico que las tortugas verdes del Pacífico con las del Atlántico, de manera que no se soporta la asignación de especie a la tortuga negra.

Karl y Bowen 1999 proponen que a la tortuga negra se le considere una especie geopolítica definida como un grupo de individuos confinados a un área geográfica o políticamente definida que han recibido el status de especie independientemente de los criterios, morfológicos, genéticos o de aislamiento reproductivo. Evidentemente esta definición carece de valor biológico, pero es relevante si se considera en el marco de los esfuerzos de conservación.

Una crítica que no se ha realizado en particular en la discusión de la posición taxonómica de esta tortuga es que en el caso de las filogenias realizadas con genomas mitocondiales es que es posible que estemos reconstruyendo un árbol de genes y no árbol de especies (Li, 1997). Sin embargo para evitar este problema se sugiere usar varios genes, y en los análisis moleculares de la posición sistemática se han empleado genes nucleares y mitocondiales.

Definir la importancia para la conservación de una población de acuerdo con su situación taxonómica es inadecuado. A la fecha entre los defensores y opositores de que la tortuga negra sea una especie independiente existe consenso con respecto a que: la tortuga negra es peculiar en cuanto a composición genética (sus haplotipos solo se encuentran en la tortuga negra) y características morfológicas y es posible que esta población se encuentre en proceso de especiación. Lo más importante sin duda es que preocuparse por la definición de la posición taxonómica de la tortuga negra es absurdo si esta población continua disminuyendo en tamaño y no muestra señales de recuperación a pesar de los esfuerzos de conservación realizados.

CAPÍTULO VI CONCLUSIONES.

Del capítulo 3

- I. A partir de simulaciones se demuestra que los RFLP y DGGE son ineficientes para diferenciar todos los haplotipos de la región control del mtDNA de tortuga verde reportados por Encalada (1996) y los haplotipos de tortuga negra encontrados en el presente trabajo.
- II. La herramienta molecular que permite detectar con mayor eficiencia la variabilidad genética de la región control del DNAm_t es la secuenciación de ácidos nucleicos.

Del capítulo 4

- I. Los niveles de variabilidad genética de la población anidadora de Michoacán son altos con respecto a valores obtenidos para poblaciones del género *Chelonia* con tamaños poblacionales más grandes (Tortuguero, Costa Rica).
- II. A pesar de la reducción del tamaño poblacional de la tortuga negra, los valores de variabilidad genética son altos debido a que no ha transcurrido tiempo suficiente desde la explotación de este recurso a la fecha para que la deriva génica o endogamia impacten significativamente la variabilidad.
- III. El tamaño efectivo histórico calculado a partir del parámetro θ es de 8,595.2 individuos y se encuentra dentro del valor estimado para otros vertebrados.
- IV. La variabilidad genética de la población anidadora de tortuga negra en el estado de Michoacán se encuentra distribuida de manera homogénea (no hay estructura genética); por lo tanto, no es posible identificar unidades de manejo independientes (sensu Moritz 1994).

- V. La ausencia de estructura genética entre las playas de anidación de la tortuga negra en el estado de Michoacán refleja una conectividad histórica reciente entre esas poblaciones.
- VI. Las playas de Colola, Maruata y Arenas Blancas, presentan haplotipos privados por lo que merecen especial atención en labores de conservación.

Del capítulo 5

- I. Las poblaciones del género *Chelonia* del océano Atlántico se encuentran claramente diferenciadas de las del océano Pacífico.
- II. Las relaciones de similitud de la tortuga negra con respecto al resto de las poblaciones del género *Chelonia* no demuestran que la asignación de especie a la tortuga negra sea adecuada
- III. Las relaciones filogenéticas establecidas entre la tortuga negra y el resto de las poblaciones del género no sustentan la asignación de especie para esta población debido a que los haplotipos de esta población forman un grupo polifilético.
- IV. La posición taxonómica de la tortuga negra es independiente de la relevancia de esta población para la conservación que es singular desde el punto de vista genético y morfológico.

APÉNDICE I

Solución lítica para preservación de sangre en el campo:

100 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM EDTA, pH 8, 10 mM NaCl; 1.0% (w/v) SDS (sodio dodecil sulfato)

Solución Sal-DMSO para preservación de tejido sólido en el campo:

20 % DMSO, 250 mM EDTA pH 7.5-8 y NaCl hasta saturación

TAE 50X:

Trisma base 242 gr, Ácido Acético Glacial 57.1 ml, 100 ml EDTA 0.5M

Colorante.

Bromofenol 0.25%, Xileno-Cianol 0.25%, Glicerol 30%

Buffer de extracción DNA STE:

100 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0

TE:

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5

Fenol en buffer: fenol saturado en Tris-HCl

Solución FCI: fenol, cloroformo, alcohol isoamílico (25:24:1)

Solución CI: cloroformo, alcohol isoamílico (24:1)

SDS: sodio lauril sulfato (= sodio dodecil sulfato) solución 20% (peso / volumen)

Acetato de sodio: solución 3M

Protocolo de obtención de ADN con solventes orgánicos y precipitación con etanol reportado por Hillis y colaboradores (1996).

Procedimiento:

1. Para tejido o células de sangre, homogenice aproximadamente 100 mg (un vol. de aproximadamente 0.3 cm³) en 1000 μ l de buffer STE con el homogeneizador de cristal. Si se está utilizando sangre sin amortiguador lítico

(SDS) el procedimiento se facilita si se congela la muestra y se raspa el volumen necesario de sangre con una hoja de bisturí.

2. Para sangre en buffer lítico, transfiera aproximadamente 0.3 ml a un tubo de 1.5 ml. Añada 0.5 ml de STE y proceda al paso 3.
3. Transferir el homogeneizado a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, añadir 70 μ l 20% SDS y agite suavemente.
4. Calentar el material lisado a 50-65 °C durante 15 minutos
5. Centrifugar durante 5 minutos a 7000 g para formar una pastilla.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo fresco de 1.5 ml. Descartar la pastilla.
7. Añadir 700 μ l de fenol en buffer. Mezclar suavemente por completo e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se observará un color grisáceo homogéneo.
8. Centrifugar por 5 min a 7000 g.
9. Cuidadosamente remover la fase acuosa (superior). Transferir a un nuevo tubo de 1.5 ml, tratando de no transferir los restos celulares ubicados en la interfase fenol/STE.
10. Si la transferencia de la fase acuosa es impedida por restos celulares, repetir los pasos 6, 7, y 8.
11. Añadir 700 μ l de FCI, mezclar con suavemente pero por completo e incube a temperatura ambiental durante 5 min.
12. Centrifugar por 5 min a 7000 g.
13. Cuidadosamente remover la fase acuosa (superior). Transferir a un nuevo tubo de 1.5 ml, tratando de no transferir los restos celulares ubicados en la interfase fenol/STE.
14. Re-extraer la fase acuosa con FCI (repetir los pasos 10-12)
15. Añadir 700 μ l de Cl, mezclar suavemente e incubar por 5 min. Invertir los tubos una vez cada minuto para evitar la separación de las fases.
16. Centrifugar por 3 min (7000 g). Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
17. Re-extraer la fase acuosa con Cl (y repetir los pasos 13-15)
18. Añadir 1/10 volumen (aproximadamente 50 μ l) de acetato de sodio (STE) 3M y afore el tubo con etanol 100% frío (-20 °C) de 10 a 20 minutos. Agite bien

invirtiendo los tubos varias veces para que se precipite el DNA. Es posible que se observe el DNA como hilos blancos.

19. Incubar en un congelador (-20 °C) o, preferiblemente un ultracongelador (-70 a -80° C), durante 20 min o toda la noche.*
20. Centrifugar durante 15 min (7000 g o 13,000 r.p.m.) preferiblemente bajo refrigeración. Generalmente se observa un precipitado pequeño, blanco de DNA en el fondo del tubo.
21. Decantar el alcohol 100%. Secar el precipitado en una centrífuga con vacío, o volteando los tubos en una gradilla a temperatura ambiente durante 1 hora para evaporar el etanol restante.
22. Enjuagar con 1 ml etanol 70% frío (-20 °C) añadido cuidadosamente. Agitar levemente, centrifugar durante 1 min (a temperatura ambiente) y decantar el etanol.
23. Decantar el etanol y secar el precipitado de DNA repitiendo el paso 20.
24. Re-suspender el precipitado en 250 μ l de TE si se va a almacenar el DNA por largos periodos o en Agua destilada si va a emplearse rápido, el EDTA del TE puede interferir en las reacciones de PCR al capturar el Mg de la reacción.

*este es un punto adecuado para detener el proceso y guardar el material hasta el siguiente día.

APÉNDICE II

GUÍA PARA LA COLECTA DE MUESTRAS DE SANGRE Y TEJIDO EN EL CAMPO

TEJIDO SÓLIDO

1. De 35 a 40 nidos puestos por distintas madres, **muestrear una** cría muerta por cada nido. (no importa si la cría tiene varios días de muerta, esta parasitada por larvas, si el tejido esta seco o la muestra es obtenida de un embrión muerto antes de la eclosión) Nota: si no se tiene un control de las hembras anidadoras se puede evitar muestrear a la misma madre más de una vez si se obtienen todas las muestras dentro de un período no mayor que 13 días. **Importante:** si existe la posibilidad de que dos o más muestras sean de nidos puestos por una misma tortuga, favor de anotarlo en la hoja de campo, ¡no dejar de coleccionar estas muestras!. **Si se encuentran ejemplares muertos coleccionar tejido también** (no importa el grado de descomposición), sí sólo esta el caparazón, un fragmento óseo de aproximadamente. 10 gramos son suficiente.
2. Cortar la piel del cuello de la cría, asegurando incluir el músculo asociado (cualquier tejido blando es mejor que piel o cartílago). Se necesita aproximadamente. 0.5-5 gramos de tejido. Si es posible extraer el hígado también. (se requiere una cantidad equivalente al tamaño de 2 o 3 chícharos para cada muestra).
3. Realizar varios cortes al tejido para facilitar el contacto con la solución. Introduzca la muestra a las botellas asegurando que quede cubierta por la solución fijadora. **Importante:** no tocar las muestras con las manos para evitar contaminar las muestras con su DNA ¡Use siempre guantes!. En caso de que los guantes o navajas no sean suficientes, NO los use para la obtención de distintas muestras, a menos que los limpie con alcohol para la obtención de muestras distintas.

4. Las muestras pueden ser almacenadas a temperatura ambiental durante varios meses (5 meses) o en refrigerador hasta un año. Evite exposición al calor o luz solar.

SANGRE

1. Coloque a la Tortuga en la posición que se muestra en la figura 1 (con la parte anterior más baja con respecto a la posterior) para hacer esto se puede aprovechar la pendiente de la "cama" o generar la pendiente removiendo la arena.
2. Inserte con cuidado la punta de la aguja de una jeringa de las proporcionadas en el paquete, para coleccionar sangre de los senos cervicales que se encuentran en la parte dorsal (superior) del cuello de la tortuga como se señala en la figura 2. Asegúrese de que la aguja entre perpendicularmente a la superficie dorsal del cuello de la tortuga.
3. Introducir la aguja entre 1 y 3 cm de profundidad generando succión con el embolo de la jeringa. Obtener aproximadamente un mililitro (1 c.c.) Nota: si la extracción de esta cantidad resulta problemática, se puede utilizar una muestra más pequeña. En caso de que esto ocurra, anótelos en los comentarios de la hoja de registro. Usar siempre material estéril (nuevo) en cada tortuga. Nota: el cuello de la tortuga tiene dos senos cervicales uno del lado derecho y otro del izquierdo, en caso de no lograr la obtención de la muestra de un lado se puede intentar del otro lado.
4. Inmediatamente que se obtenga la muestra de sangre, transfírela al envase de plástico que contiene la solución preservadora (buffer lítico SDS).
5. Invierta el tubo varias veces para mezclar bien. Importante: Evitar tocar las superficies internas de los envases o la sangre con sus manos lo que contaminaría las muestras con su DNA.

6. Anotar sobre la etiqueta del frasco: una abreviación de la playa de anidación y número del frasco, registrar los datos en la hoja de campo e incluirla en su envío.

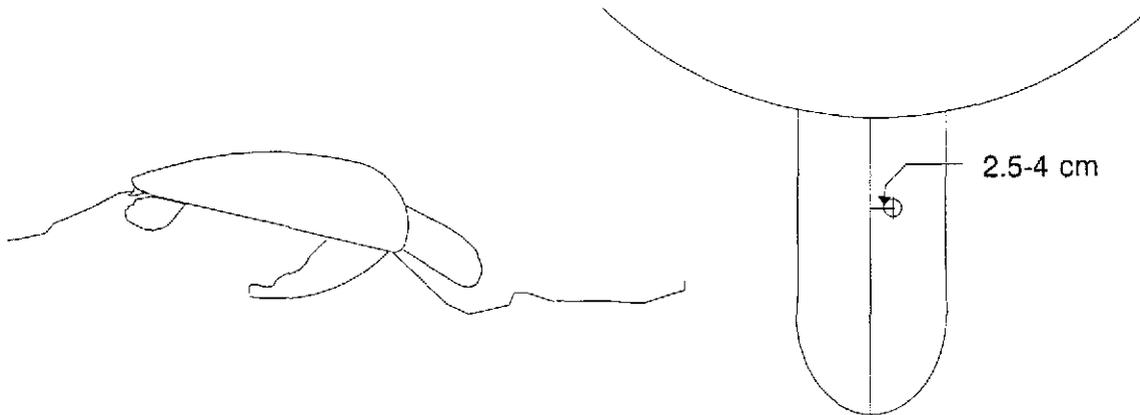


Figura 1. Posición de la tortuga para la colecta de sangre

Figura. 2. Diagrama de la vista dorsal del cuello de una tortuga marina, mostrando en un círculo el sitio aproximado de la inserción de la aguja para la obtención de sangre.

PARA ENVIAR LAS MUESTRAS:

- Envuelva la parte superior de la botella cerrada con el *Parafilm*, estirando éste conforme se envuelve. Esto evitará que se derrame el contenido durante el transporte; revise que quedaron bien sellados los frascos.
- Las muestras pueden ser almacenadas a temperatura ambiental durante varios meses o en refrigerador hasta un año. Evite exposición al calor o luz solar.
- Antes de enviar el material, cerciórese que los datos quedaron bien especificados en las hojas de campo y que los frascos estén bien sellados para evitar fugas
- Envíe las muestras por paquetería a la siguiente dirección, notificando por teléfono, fax o correo electrónico los detalles del envío:

Omar Chassin Noria.

Instituto de Ecología, UNAM.

Laboratorio de Genética y Evolución.

Circuito Exterior s/n CU.

04510, México, D.F.

Tel Laboratorio. 622-90-01. Particular 573-01-53

FAX 622-89-95 y 616-19-76

e-mail : ochassin@miranda.ecologia.unam.mx

APÉNDICE III. INFORMACIÓN BÁSICA DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN ESTE TRABAJO

| No. Col. | Fecha Col. | Playa | Localización | Tipo de Muestra | Colector | Observaciones | Haplótipo |
|----------|------------|----------------|------------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|-----------|
| 1 | 27-nov-96 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 2 | 27-nov-96 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 3 | 27-nov-96 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | H |
| 14 | 27-nov-96 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 18.7 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 15 | 27-nov-96 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 18.7 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | M |
| 16 | 28-nov-96 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 18 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 19 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 20 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 21 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 22 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | Contaminada con sangre humana | F |
| 23 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Leyva V. Domingo | N/A | F |
| 24 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 26 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 27 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 28 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | I |
| 29 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | I |
| 30 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 31 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 32 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 33 | 29-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 34 | 30-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 35 | 30-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 36 | 30-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 37 | 30-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 38 | 30-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 39 | 30-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 40 | 30-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 41 | 30-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 42 | 30-nov-96 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 43 | 19-ene-97 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 44 | 20-ene-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N// | E |

| No. Col. | Fecha Col. | Playa | Localización | Tipo de Muestra | Colector | Observaciones | Haplotipo |
|----------|------------|----------------|------------------------|-----------------|-----------------|--|-----------|
| 46 | 20-ene-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 47 | 20-ene-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 53 | 20-ene-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 54 | 20-ene-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 55 | 20-ene-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 56 | 20-ene-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 57 | 20-ene-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 59 | 21-ene-96 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 63 | 21-ene-96 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 64 | 21-ene-96 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 67 | 22-ene-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 18.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 68 | 22-ene-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 18.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 69 | 22-ene-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 18.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 70 | 22-ene-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 18.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | M |
| 71 | 22-ene-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 18.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | M |
| 72 | 22-ene-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 18.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 77 | 23-ene-97 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 78 | 23-ene-97 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | Albina | E |
| 79 | 23-ene-97 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 80 | 23-ene-97 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 81 | 23-ene-97 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 82 | 23-ene-97 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 83 | 09-oct-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | Marca del INP, Manz, Col. | F |
| 85 | 10-oct-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | Fractura de escudo preneural y escudo neural | E |
| 86 | 04-nov-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 87 | 04-nov-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 88 | 04-nov-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 89 | 04-nov-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 90 | 04-nov-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 93 | 05-nov-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 94 | 05-nov-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 95 | 05-nov-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 96 | 05-nov-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 97 | 05-nov-97 | Colola | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |

| No. Col. | Fecha Col. | Playa | Localización | Tipo de Muestra | Colector | Observaciones | Haplotipo |
|----------|------------|----------------|------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------|-----------|
| 98 | 06-nov-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 99 | 06-nov-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 100 | 06-nov-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 101 | 07-nov-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 105 | 06-nov-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 18.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 106 | 06-nov-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 107 | 06-nov-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 108 | 06-nov-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 109 | 06-nov-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 110 | 06-nov-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | Es asimétrica en el numero de escudos | E |
| 111 | 06-nov-97 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 113 | 11-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 114 | 11-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 116 | 11-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | Le falta aleta posterior derecha | E |
| 117 | 12-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 118 | 12-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 119 | 12-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 120 | 12-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 121 | 12-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 122 | 12-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 123 | 13-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 124 | 13-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 125 | 13-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 126 | 13-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 128 | 13-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 129 | 13-ene-98 | Coloia | 18 18 38.0-103.26.50.0 | Sangre | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 130 | 14-ene-98 | Maruata | 18 12 47 1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | Tortuga albina | F |
| 131 | 14-ene-98 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 134 | 14-ene-98 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 138 | 14-ene-98 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 139 | 14-ene-98 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 140 | 14-ene-98 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | F |
| 141 | 14-ene-98 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |
| 142 | 14-ene-98 | Maruata | 18 12 47.1-103 15 02.7 | Tejido sólido | Chassin N. Omar | N/A | E |

| No. Col. | Fecha Col. | Playa | Localización | Tipo de Muestra | Colector | Observaciones | Haplotipo |
|----------|------------|----------------|------------------------|--------------------|----------------|---------------|-----------|
| 168 | 28-sep-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 | 18.7 Tejido sólido | José Valencia | N/A | F |
| 169 | 29-sep-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 | 18.7 Tejido sólido | José Valencia | N/A | E |
| 170 | 03-oct-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 | 18.7 Tejido sólido | José Valencia | N/A | E |
| 171 | 05-oct-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 | 18.7 Tejido sólido | José Valencia | N/A | E |
| 172 | 15-nov-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 | 18.7 Tejido sólido | José Valencia | N/A | F |
| 173 | 15-nov-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 | 18.7 Tejido sólido | José Valencia | N/A | E |
| 174 | 17-nov-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 | 18.7 Tejido sólido | José Valencia | N/A | F |
| 175 | 16-nov-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 | 18.7 Tejido sólido | José Valencia | N/A | E |
| 176 | 17-nov-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 | 18.7 Tejido sólido | José Valencia | N/A | E |
| 177 | 17-nov-97 | Arenas Blancas | 18 12 47.7-103 02 | 18.7 Tejido sólido | José Valencia | N/A | E |
| 178 | 10-nov-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 179 | 10-nov-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 180 | 10-nov-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | F |
| 181 | 19-nov-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 186 | 23-nov-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 187 | 23-nov-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 188 | 23-nov-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 189 | 30-nov-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 190 | 30-nov-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 195 | 09-dic-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 200 | 29-dic-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 201 | 29-dic-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |
| 204 | 06-nov-97 | Paso de Noria | 18 15 37.2-103 18 25.6 | Tejido sólido | Juvenal Arroyo | N/A | E |

LITERATURA CITADA

- Allard, W.M., Miyamoto, M.M. Bjorndal, A.K., Bolten, B.A. y Bowen, B.W. (1994). Support for Natal Homing in Green Turtles from Mitochondrial DNA Sequences. *Copeia*. 1:34-41.
- Allendorf, F. W y Leary, F. R. (1986) Heterozygosity, and Fitness in Natural Populations of Animals. En Soulé, M. (editor) *Conservation Biology, The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates. pp 57-76.
- Alvarado, J. y Figueroa, A. (1989). *Ecología y conservación de las Tortugas marinas de Michoacán, México*. U.M.S.N.H. México. 72 pp.
- Alvarado J. y Figueroa, A. (1990). The ecological recovery of sea turtles of Michoacán México. Special attention to the black turtle (*Chelonia agassizi*). Final report U.S. Fish and Wildlife Service, New Mexico. 51 pp.
- Alvarado, J. y Figueroa, A. (1992) Recapturas Post-Anidatorias de Hembras de tortuga marina negra (*Chelonia agassizi*) Marcadas en Michoacán México. *Biotropica*. 24:560-566.
- Awise, C.J., Bowen, W.B., Lamb, T., Meylan, B.A. y Bermingham, E. (1992). Mitochondrial Evolution at a Turtle's Pace: Evidence for Low Genetic Variability and Reduced Microevolutionary Rate in Testudines. *Molecular Biology and Evolution* 9:457-473.
- Awise, C.J. and Karl, A.S. (1993). PCR-based Assays of Mendelian polymorphisms from Anonymous Single-Copy Nuclear DNA: Techniques and Applications for Population Genetics. *Molecular Biology and Evolution*. 10:342-361.
- Awise J.C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman y Hall. 510 pp.
- Baker, C.S., Perry, A., Bannister, J.L., Weinrich, M.T., Abernethy, R.B., Calambokidis, J., Lien, J. Lambertsen, R.H., Ramirez, J.U., Vasquez, J., Clapham, P.J., Alling, A., O'Brien, S.J. y Palumbi, S.R. (1993) Abundant Mitochondrial DNA Variation and World-Wide Population Structure in Humpback Whales. *Proceedings of the National Academy of Science*. 90: 8239-8243.
- Bass, A. (1994). Population genetics of hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* in the Caribbean. Trabajo presentado en el 14 Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Hilton Head, South Carolina, USA. 1-5 de marzo, 1994.
- Bjorndal, K., Wetherall, J., Bolten, A. y Mortimer, J. (1999). Twenty-Six years of green turtle nesting at Tortuguero, Costa Rica: An Encouraging Trend. *Conservation Biology*. 13:126-134.
- Bocourt, M. (1868) Description de quelques cheloniens nouveaux appartenant a la faune Mexicaine *Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale*; Vol. 10, pp. 121-122.
- Bollmer, J.L. (1999). Multiple paternity in loggerhead turtle clutches. *Copeia*. 1999:475-478

- Bonhomme, F., Salvidio, S., LeBeau, A. y Pasteur, G. (1987) Genetic comparison of green turtles (*Chelonia mydas*) from the Atlantic, Indian and Pacific oceans: An apparent illustration of the classic Mullerian theory of population genetic structure Comparison genetique des tortues vertes (*Chelonia mydas*) des oceans Atlantique Indien et Pacifique: Une illustration apparente de la theorie Mullerienne classique de la structure genetique des populations?. *Genetica*. 74:89-94.
- Bowen, W.B., Meylan, A.B., Ross, J.P., Limpus, C.J., Balazs, G.H. y Avise, C.J. (1992). Global Population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution*. 46:865-881.
- Bowen, W.B., Nelson, S.W. y Avise, C.J (1993). A molecular phylogeny for marine turtles: Trait Mapping, rate assessment and conservation relevance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90:5574-5577.
- Bowen, W.B., Abreu-Gorbois, F.A., Balazs, C.H., Kamezaki, N., Limpus, M.J. y Ferl, L.J. (1995). Trans-Pacific migrations of the Loggerhead Turtle *Caretta caretta* demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92 3731-3734
- Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky L.A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83:3746-50.
- Cann, L.R., Stoneking, M. y Wilson, C.A. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325:31-36.
- Caughley, G. (1994). Directions in conservation biology. *Journal of Animal Ecology*. 63: 215-244.
- Cummings, M.P. y Clegg, M.T. (1998) Nucleotide sequence diversity at the alcohol dehydrogenase 1 locus in wild barley (*Hordeum vulgare ssp. spontaneum*): An evaluation of the background selection hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 5637-5642.
- Cliffton, K., Cornejo, D. y Felger, S. (1982). Sea turtles of the pacific coast in México. En *Biology and Conservation of sea turtle*. Bjrnadal, K.(Editor). Smithsonian Institution Press. Washington D.C. 199-209
- Collins, L.S., Budd A.F. y Coates A.G..(1996) Earliest evolution associated with closure of the Tropical American Seaway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 93.6069-6072.
- CONABIO (1999). Regiones Prioritarias Terrestres. Escala 1:1'000,000. México.
- Cracraft, J. (1989). Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and process of differentiation. En *Otte, D. y Endler, J.A. editors. Speciation and its consequences*. Sinauer Associates. pp 29-59.

- Crisci, J.V. y Lopez, F.A. (1983). Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. OEA-Programa regional de desarrollo científico y Tecnológico. Washington D.C. 133 pp.
- De Luna, E. y Mishler B.D. (1996) El concepto de homología filogenética y la selección de caracteres taxonómicos. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 59:131-146.
- De Queiroz, K. Y Donaghue, M.J. (1990). Phylogenetic systematics or Nelson's version of cladistics?. 6:61-75.
- Dutton, P.H., Davis T.G. y Owens, D. (1996a). Molecular Phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-Leucine tRNA and control region of mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution. 5:511-521.
- Dutton, P.H. (1996b). Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies. En Bowen, B.W. y Witzell, W.N. Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics. NOAA Technical Memorandum. NMFS-SEFSC-396. pp 17-24.
- Ellegren, H. (1996) Limited polymorphism at Major Histocompatibility Complex (MHC) loci in the Swedish moose. Molecular Ecology. 5:3-9.
- Encalada, E.S. (1996). Conservation genetics of Atlantic and Mediterranean green turtles: inferences from mtDNA sequences En Bowen, B.W. y Witzell, W.N. Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics. NOAA Technical Memorandum. NMFS-SEFSC-396. pp 33-40
- Encalada, S.E., Lahanas, P.N., Bjordnal, K.A., Bolten, A.B., Miyamoto, M.M. y Bowen, B.W. (1996). Phylogeography and population structure of Atlantic and Mediterranean green turtle (*Chelonia mydas*): a mitochondrial DNA control region sequence assessment. Molecular Ecology. 5:473-484).
- Felsenstein, J. (1993). Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.5. University of Washington, Seattle.
- Figuroa, A. y Alvarado, J. (1990). Morphometric comparison of the *Chelonia* populations of Michoacán, Mexico and Tortuguero, Costa Rica. Pp. 179-182 En Richardson J.I. Proceedings of the tenth Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA Tec. Mem. NMFS-SEFC. 286 pp.
- FitzSimmons, N. (1998). Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). Molecular Ecology. 7:575-584
- Fischer, S.G. y Lerman, L.S. (1980). Separation of random Fragments of DNA according to properties of their sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences. 77:4420-4424.
- Frankel O.H. y Soulé M.E. (1981). Conservation and evolution. Cambridge. 327 pp.
- Franklin, I.R. (1980). Evolutionary Change in small populations. En. Conservation Biology an Evolutionary-Ecological Perspective. Soulé, M.E. y Wilcox, B.A editores. Sinauer Associates. pp 135-149.

- Futuyma J.D. (1998). *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates. 763 pp.
- García, Enriqueta. (1988) *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. 4ª edición 217 pp.
- Giles, E.R., Blanc, H., Cann, M.H. y Wallace, C.D. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 77:6715-6719.
- Grombridge, B. y Luxemoore, R. (1989). *The Green Turtle and Hawksbill (Reptilia : Cheloniidae)*. World status, exploration and trade. CITES Secretariat, lausanne Switzerland. 601 pp.
- Gray, W.M. (1989) Origin and Evolution of Mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology* 5:25-50.
- Harry, J.L. (1988). Multiple paternity in the loggerhead turtle *Caretta-caretta* *Journal of Heredity*. 79: 96-99.
- Hartl, D. y Clark, A. (1989). *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates. 682 pp.
- Heiman, M. (1997) Webcutter 2.0, disponible de manera gratuita en la internet <http://www.ccsi.com/firstmarket/firstmarket/cutter/cut2.html>
- Higgins, D.G. Bleasby, A.J. and Fuchs, R. (1991) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS*. 8:189-191.
- Hillis, D.M., Huelsenbeck J.P y Cunningham C.W. (1994). Application and Accuracy of Molecular Phylogenies. *Science*. 264:671-677.
- Hillis, D.M., Mable, K.B., Larson, A., Davis S.K. y Zimmer E.A. (1996) *Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning*. En: Hillis, D.M. y C. Moritz (eds) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates. pp. 321-381.
- Hillis, D.M., Moritz, C. y Mable B.K. (1996). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates. 655 pp.
- Hirth, F.H. (1997). *Synopsis of the Biological Data on The Green Turtle, Chelonia mydas (Linnaeus, 1758)*. Biological Report 97(1) FWS-US. 120 pp.
- Hutchinson, C.A.III., Newblod, E.J., Potter, S.S., y Hall, M.E. (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*. 251:536-538.
- Kaessmann, H., Wiebe, V. y Pääbo, S. (1999). Extensive nuclear DNA sequence diversity among chimpanzees. *Science*. 286:1159-1162.
- Kamezaki, N. y Matsui, M. (1995). Geographic variation in the skull morphology of the green turtle, *Chelonia mydas*, with a taxonomic discussion. *Journal of Herpetology* 29: 1-60.

- Karam M., S. (1997). Patrones de sustitución nucleotídica de la región de control del DNA mitocondrial de tortugas marinas. Tesis Biología, Facultad de Ciencias, Univ. Nacional Autónoma de México; pp 72.
- Karl, S.A., Bowen B.W. y Avise, J.C. (1992). Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. *Genetics* 131:163-173.
- Karl, S.A. y Bowen, W.B. (1999). Evolutionary Significant Units versus Geopolitical taxonomy: Molecular Systematics of an Endangered Sea Turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology*. 13:990-999.
- Kichler, K. (1999) Detection of multiple paternity in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling *Molecular Ecology*. 8:819-830.
- Kumazawa, Y. and Nishida, M (1999) Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink statistical evidence for archosaurian affinity of turtles. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 784-792.
- Lahanas, P.N., Miyamoto, M.M., Bjordnal, K.A. y Bolten, A.B. (1994). Molecular evolution and population genetics of greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Genetica*. 94:57-66.
- Ledig, T.F. (1986) Heterozygosity, Heterosis, and Fitness in Outbreeding Plants. En Soulé, M. (editor) *Conservation Biology, The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates. pp 77-104.
- Lande, R. y Barrowclough, G. (1987). Effective population size, genetic variation, and their use in population management. En. *Viable Populations for Conservation*. Soulé, M. Editor. Cambridge. pp 87-123.
- Lessa, E.P. (1992). Rapid Surveying of DNA Sequence Variation in Natural Populations. *Molecular Biology and Evolution*. 9:323-330.
- Lewontin, R.C. (1974). *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York.
- Li, W-H. (1997). *Molecular Evolution*. Sinauer. 487 pp.
- Lipscomb, D. (1998) *Basics of cladistic analysis*. George Washington University. Washington D.C. 75 pp
- Lutz, L. y Musick, A.J. (1997). *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press. 432 pp.
- Márquez, R.J. (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, Rome, FAO. 81 pp.
- May, B. (1992). Starch gel electrophoresis of allozymes. En. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Hoelzel, A.R. (Editor). IRL Press, Oxford University Press. pp 1-28.

- Mayr, E. (1942). Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press.
- Miller, D.J. (1997). Reproduction in Sea turtles. En Lutz, L. y Musick, A.J. (Editores). The Biology of Sea Turtles. CRC Press. pp 51-81.
- Mills, L.S., Allendorf, F.W. (1996). The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. Conservation Biology 10:1509-1518.
- Meylan, B.A., Bowen, W.B. y Avise, C.J. (1990). A Genetic test of the Natal Homing Versus Social Facilitation Models for Green Turtle Migration. Science. 248:724-26.
- Moritz, C. (1994). Defining "evolutionary significant units" for conservation. Trends in Ecology and Evolution. 9:373-375.
- Myers, R.M., Maniatis, T. y Lerman, L.S. (1987). Detection and Localization of single Base Change by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Methods in Enzymology. 155:501-527
- Nei, M. (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. 512. pp.
- Nicholas, K.B. y Nicholas, H.B. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distribuido por el autor.
- Nixon, K. C. (1999). Winclada (BETA) ver. 0.9.9 PUBLISHED BY THE AUTHOR, ITHACA, NY.
- Norman, J.A., Moritz, C. y Limpus, C.J. (1994). Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. Molecular Ecology. 3:363-373.
- O'Brien, S. J., Roelke, M. E., Marker, A. N., Winkler, C. A., Meltzer, D., Colly, L., Evermann, J. F., Bush, M. y Wildt, D.E. (1985). Genetic Basis for Species Vulnerability in the Cheetah. Science. 227:1428-1434.
- Oligo versión 4.1. Primer Análisis Software. National Biosciences, INC. Copyright 1989-1992.
- Owens, W.D. y Ruiz, G.J. (1980). New Methods of Obtaining Blood and Cerebrospinal Fluid from Marine Turtles. Herpetologica. 36:17-20.
- Packer, C. (1979). Inter-troop Transfer and Inbreeding Avoidance in *Papio anubis*. Animal Behavior. 27:1-36.
- Page, R. D. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.
- Peare, T. (1994). Multiple paternity in green turtles (*Chelonia mydas*): conservation implications. Found in Proceedings of the Fourteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC. pp. 115-118.

- Pearson, W.R. y Lipman, D.J. (1988). FASTA searches a protein or DNA sequence data bank. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:2444-2448. disponible en: <http://www.fasta.genome.ad.jp/SIT/FASTA.html>
- Poland, R. (2000). Pagina de acceso gratuito en la internet, dirección: <http://www.exeter.ac.uk/telematics/EuroTurtle/homep.htm>.
- Pope, T.R. (1996). Socioecology, population fragmentation, and patterns of genetic loss in endangered primates. En Avise, J.C. y Hamrick, J.L. editores *Conservation genetics, case histories from nature*. Chapman y Hall USA pp 119-159.
- Pritchard, P.C. (1997). Evolution, Phylogeny, and Current Status. En Lutz, L. y Musick, A J.(Editores). *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press. pp. 1-28.
- Pritchard, P.C. (1999). Status of the Black Turtle. *Conservation Biology*. 13:1000-1003.
- QIAquick (2001). QIAquick® Spin Handbook ©2001. QIAGEN, all rights reserved.
- Ralls, K., Harvey, P. y Lyes, A. (1986). Inbreeding in Natural Populations of Birds and Mammals. En Soulé, M. (editor) *Conservation Biology, The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates. pp 35-56.
- Reich, D.E., Wayne, R.K. y Goldstein, D.B. (1999). Genetic evidence for a recent origin by hybridization of red wolves. *Molecular Ecology* 8:139-144.
- Roy, M.S; Girman, D.J., Taylor, A.C., Wayne, R.K. (1994) The use of museum specimens to reconstruct the genetic variability and relationships of extinct populations. *Experientia*. 50:551-557.
- Rozas, J. y Rozas, R. (1999). DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.
- Rzedowski, J. (1990). Vegetación Potencial. Atlas Nacional de México. Vol II. Escala 1:4 000 000. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Saiki , R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230:1350-1354.
- Saitou, N. y Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstruing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.
- Salisbury, B. A. (1999). Strongest evidence: maximum apparent phylogenetic signal as a new cladistic optimality criterion. *Cladistics* 48:137 – 149.
- Scott, M. y Allendorf, F. (1996) The One-Migrant-per-Generation Rule in Conservation and Management. *Conservation Biology*. 6:1509-1518.
- Schneider, S., Roessli, D. y Excoffier, L. (2000) Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

- Siebert, J. D. (1994) Tree statistics; trees and "confidence"; consensus trees; alternatives to parsimony; character weighting; character conflict and its resolution. En: Forey, P. L., Humphries, Ch. J., Kitching, I. J., Scotland, R. W., Siebert, D. J., y Williams, D. M. *Cladistics: a practical course in systematics*. Oxford. pp 73-88.
- Simpson, G. G. (1951). The species concept. *Evolution*. 5:258-289.
- Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*. 39:53-65.
- Slatkin, M. (1991) Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetic Research Cambridge*. 58:167-175.
- Soulé, M.E. (1980). Thresholds for Survival: Maintaining Fitness and Evolutionary Potential. En Soulé, M.E. Y Wilcox, B.A. editores. *Conservation Biology. An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer Associates. pp 151-169.
- Sourdis, J. y Nei, M. (1988) Relative Efficiencies of the Maximum Parsimony and Distance-Matrix Methods in Obtaining the Correct Phylogenetic Tree. *Molecular Biology and Evolution*. 5:298-311.
- Tajima, F (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*. 105: 437-460
- Tajima, F (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123:585-595.
- Tajima, F. (1993). Measurement of DNA polymorphism,. En Takahata, N. y Clark, A. G. editores, *Mechanisms of Molecular Evolution*. Sinauer Associates. pp 37-59
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Watterson, G. (1975). On the number of segregating sites in the genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*. 7:256-276
- Wiley, E.O. (1981) *Phylogenetics: the Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. John Wiley and Sons. 489 pp.
- Whitlock, M.C. Mccauley, D.E. (1999). Indirect measures of gene flow and migration: F_{st} not equal to $1/(4Nm + 1)$. *Heredity*. 82: 117-125.
- Wright, S. (1965) The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 19:395-420.