



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS

**EFFECTO PATERNO SOBRE LA ADECUACIÓN DE LA
PROGENIE EN *Chelonia mydas* DE
LA COSTA MICHOACANA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ORIENTACIÓN BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓL. LIBNY INGRID LARA DE LA CRUZ

TUTOR: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA

**COMITÉ TUTOR: DR. MAURICIO R. QUESADA AVENDAÑO
DRA. SOFÍA SOLORIZANO LUJANO**

México, D.F.

Marzo, 2011.



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de enero del 2011, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) de la alumna **Lara De la Cruz Libny Ingrid** con número de cuenta **508019490** con la tesis titulada: **"Efecto paterno sobre la adecuación de la progenie en *Chelonia mydas* de la Costa Michoacana"** bajo la dirección del **Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa**.

Presidente:	Dra. Gabriela Parra Olea
Vocal:	Dr. Omar Chassin Noria
Secretario:	Dr. Mauricio R. Quesada Avendaño
Suplente:	Dr. José Jaime Zúñiga Vega
Suplente:	Dr. Andrés García Aguayo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 4 de marzo del 2011

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco-UNAM) y en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB-UMSNH), bajo la asesoría del Dr. A. Ken Oyama Nakagawa y el Dr. Omar Chassin Noria. Para el desarrollo del este trabajo se contó con el apoyo del proyecto: “Ecología molecular de tortugas marinas: sistema de apareamiento y genética de la conservación” CONACYT-CB-2007-01-79857.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Ken Oyama por abrirme las puertas de su laboratorio, por su asesoría, apoyo y comentarios certeros en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Omar Chassin mi tutor por tantos años, por su asesoría y apoyo durante todo este tiempo, y por su gran amistad.

Al Dr. Mauricio Quesada y Dra. Sofía Solórzano, miembros del comité tutor, por sus sugerencias y valiosas correcciones que contribuyeron al mejoramiento del escrito de esta tesis.

A los miembros del jurado: Dra. Gabriela Parra Olea, Dr. José Jaime Zuñiga Vega y Dr. Andrés García Aguayo, por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Luis Felipe Mendoza por su asesoría en los análisis de morfometría geométrica y de simetría.

A Giovanni Ramírez por su apoyo en la elaboración del mapa de ubicación del sitio de trabajo.

A Doña Lolis por su ayuda incondicional en el trabajo de laboratorio y por hacer que mi estancia en el laboratorio fuera placentera.

A la comunidad de Maruata, por su cooperación y apoyo durante el desarrollo de este estudio, especialmente a Don Vidal y a Don Salomón que me acompañaron durante las largas noches de trabajo de campo.

A mis compañeros y colegas de los laboratorios del CMEB y del CIEco: Rael, Krivsova, Daisy, Lety y Odette, por su apoyo durante el fatigante pero gratificante trabajo de campo; Ana, por su ayuda en los análisis de morfometría geométrica y simetría.

A mis padres por su paciencia y su amor, por estar siempre presentes brindándome todo su apoyo.

A mis grandiosos amig@s por todo su apoyo y jalones de oreja.

A todos los que me ayudaron de una u otra forma a culminar este trabajo.

A todos,

MUCHAS GRACIAS !!

ÍNDICE	PÁG.
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN GENERAL	16
CAPÍTULO I: ESTUDIO DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA, SIMETRÍA Y ESCUDOS SUPERNUMERARIOS EN <i>Chelonia mydas</i>	
1. INTRODUCCIÓN	22
1.1 Generalidades de las tortugas marinas	22
1.2 Clasificación de la tortuga verde	24
1.3 Morfometría geométrica	26
1.4 Asimetría fluctuante	27
1.5 Escudos supernumerarios	31
2. OBJETIVOS	35
2.1 GENERAL	35
2.2 PARTICULARES	35
3. HIPÓTESIS	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1 Trabajo de campo	36
4.2 Morfometría geométrica	37
4.3 Asimetría fluctuante	39
4.4 Escudos supernumerarios	40
4.5 Análisis estadísticos	40

5. RESULTADOS	41
5.1 Morfometría geométrica y asimetría fluctuante	41
5.2 Escudos supernumerarios	44
6. DISCUSIÓN	48
6.1 Morfometría geométrica y asimetría fluctuante	48
6.2 Escudos supernumerarios	49
7. REFERENCIAS	51

CAPÍTULO II: PATERNIDAD MÚLTIPLE Y ADECUACIÓN
DE *Chelonia mydas*

1. INTRODUCCIÓN	57
1.1 Sistema de apareamiento	57
1.2 Análisis moleculares en estudios de paternidad	62
1.3 Anatomía genitourinaria	65
1.4 Almacenamiento de semen y paternidad múltiple	67
1.5 Estimadores indirectos de adecuación	70
2. OBJETIVOS	72
2.1 GENERAL	72
2.2 PARTICULARES	72
3. HIPÓTESIS	72
4. MATERIALES Y MÉTODOS	74
4.1 Trabajo de Campo	74

4.2 Extracción de ADN	75
4.3 Amplificación de regiones microsatélite	76
4.4 Obtención de Genotipos	78
4.5 Morfometría geométrica, Asimetría Fluctuante y Escudos supernumerarios	78
4.6 Análisis estadísticos	78
5. RESULTADOS	79
5.1 Extracción de ADN y PCR de loci de microsatélite	79
5.2 Frecuencias alélicas y paternidad múltiple	79
5.3 Medidas de adecuación en hembras adultas	88
5.4 Medidas indirectas de adecuación en crías	89
5.4.1 Peso	89
5.4.2 Velocidad de incorporación	89
5.4.3 Tamaño (LRC)	90
5.4.4 Morfometría geométrica, simetría y escudos del caparazón	91
6. DISCUSIÓN	97
6.1 Paternidad múltiple y patrón de fertilización	97
6.2 Paternidad múltiple y adecuación en hembras adultas	102
6.3 Paternidad múltiple y medidas indirectas de adecuación en crías	103
7. REFERENCIAS	108
DISCUSIÓN GENERAL	117
CONCLUSIONES GENERALES	124
REFERENCIAS GENERALES	126

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1. Reducción del tamaño poblacional de tortugas del género *Chelonia* en la costa del Pacífico mexicano (modificado de Delgado, 2003).

CAPÍTULO I: ESTUDIO DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA, SIMETRÍA Y ESCUDOS SUPERNUMERARIOS EN *Chelonia mydas*

Figura 1. Rasgos morfológicos externos (escudos) de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) (tomado de Pritchard y Mortimer, 2000).

Figura 2. Ubicación del área de estudio.

Figura 3. Asignación de ejes de simetría y “landmarks” (en verde) en fotografías digitales de crías de *Chelonia mydas*.

Figura 4. Asignación de “landmarks” (en amarillo) en fotografías digitales de crías de *Chelonia mydas*.

Figura 5. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado a crías de 14 nidos de *Chelonia mydas*. Cada color corresponde a un nido diferente.

Figura 6. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado a crías de *Chelonia mydas* con el patrón normal de escudos (en azul) respecto a aquéllas con escudos supernumerarios (en rojo).

Figura 7. Resultado del análisis de placas delgadas de las crías con escudos supernumerarios.

Figura 8. Resultado del análisis de placas delgadas de las crías con el patrón normal de escudos

CAPÍTULO II

PATERNIDAD MÚLTIPLE Y ADECUACIÓN DE *Chelonia mydas*

Figura 1. Ciclo de vida generalizado de la tortuga marina *Chelonia mydas* (Tomado de Chassin, 2004).

Figura 2. Diagrama del sistema genitourinario de tortuga marina (tomado de Wyneken, 2004).

Figura 3. Oviducto maduro de una tortuga marina (tomado de Wyneken, 2004).

Figura 4. Amplificación de microsátélites de muestras de hembras anidadoras con la técnica de PCR Multiplex.

Figura 5. Frecuencias alélicas de hembras adultas para 3 microsátélites en la tortuga verde (*Chelonia mydas*) de la playa de Maruata, Michoacán. El número de individuos muestreados por locus fue: $n = 29$ (CM84), $n = 45$ (CM3), y $n = 21$ (CC117).

Figura 6. Nidos analizados de la localidad de Maruata, Michoacán, se puede observar el porcentaje de la progenie que correspondiente a cada macho. Los distintos tonos de gris de cada gráfica son excluyentes y no corresponden a los mismos machos.

Figura 7. Relación de la paternidad múltiple y capacidad reproductiva de las hembras (tamaño nidada y porcentaje de eclosión y tamaño de la hembra).

Figura 8. Resultado del análisis de variables canónicas realizado para los seis nidos de los que se analizó paternidad múltiple. Código de colores: nido dos – turquesa, nido siete – morado, nido 10 - rosa, nido 13 – verde, nido 14- azul, nido 15 – rojo.

Figura 9. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado para el nido 2, fertilizado por 5 machos. No se encontraron diferencias significativas al interior del nido, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos.

Figura 10. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado para el nido 7, fertilizado por 4 machos No se encontraron diferencias significativas al interior del nido, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos.

Figura 11. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado para el nido 10, fertilizado por 4 machos. No se encontraron diferencias significativas al interior del nido, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos.

Figura 12. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado para el nido 13, fertilizado por 3 machos. No se encontraron diferencias significativas al interior del nido, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos.

Figura 13. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado para el nido 14, fertilizado por 5 machos. No se encontraron diferencias significativas al interior del nido, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos.

Figura 14. Los 2 escenarios del orden de fertilización: A) corresponde a una fertilización ordenada, mientras que B) corresponde a una fertilización desordenada (reportado por Lara-De La Cruz *et al.*, 2010).

DISCUSIÓN GENERAL

Figura 1. Ejemplares de *Chelonia mydas* de la localidad de Maruata, Michoacán, que presentan malformaciones: a) cría que presenta malformación en la mandíbula; b) y c) crías albinas, ambas además del albinismo presentan anormalidades en el patrón de arreglo de los escudos del caparazón, la segunda adicionalmente presenta malformación del cráneo y ojos; d) cría con malformación del caparazón, e) gemelos desiguales que muestran tamaño y desarrollo distintos; f) hembra anidadora con malformación del caparazón.

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO I: ESTUDIO DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA, SIMETRÍA Y ESCUDOS SUPERNUMERARIOS EN *Chelonia mydas*

Tabla 1. Número y distribución de los escudos del caparazón de hembras adultas de *Chelonia mydas* de la costa michoacana y su frecuencia (%). El número de escudos se presenta en números separados por un guión cuando se refiere a la distribución de los mismos en lado izquierdo- lado derecho. En negritas se resalta el arreglo típico de los escudos de acuerdo a la literatura.

Tabla 2. Número y distribución de los escudos del caparazón de crías de *Chelonia mydas* de la costa michoacana y su frecuencia (%). El número de escudos se presenta en números separados por un guión cuando se refiere a la distribución de los mismos en lado izquierdo- lado derecho. En negritas se resalta el arreglo típico de los escudos de acuerdo a la literatura.

Tabla 3. Distribución de los escudos del caparazón de hembras adultas y crías de *Chelonia mydas* de la costa michoacana y su frecuencia (%). El número de escudos se presenta en números separados por un guión cuando se refiere a la distribución de los mismos en lado izquierdo- lado derecho. En negritas se resalta el arreglo típico de los escudos de acuerdo a la literatura.

CAPÍTULO II PATERNIDAD MÚLTIPLE Y ADECUACIÓN DE *Chelonia mydas*

Tabla 1. Algunos trabajos realizados sobre paternidad múltiple (PM) en tortugas marinas de las familias Cheloniidae y Dermochelyidae (modificada de Moore y Ball, 2002).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de microsatélites.

Tabla 3. Alelos encontrados por loci de microsatélite y valores de heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e), n = tamaño de muestra hembras adultas.

Tabla 4. Alelos encontrados por loci de microsatélite y valores de heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e), n = tamaño de muestra genotipos paternos.

Tabla 5. Valores de probabilidad de detección de paternidad múltiple (PM) para cada locus y para todos.

Tabla 6. Genotipos parentales inferidos a partir de loci de microsatélite. Se presenta el número de machos involucrados en la fertilización de los nidos (el número asignado a cada macho es independiente en cada nido) así como su respectivo número de crías.

Tabla 7. Datos de los nidos a los que se les realizó análisis de paternidad múltiple (PM), donde el índice de dominancia = no de crías del padre más común + no de crías del segundo padre más común / total de crías del nido. (Índice de dominancia tomado de Sivinski, 1984).

Tablas 8 y 9. Genotipos de las crías del nido 2 (cría 90 – 152) y del nido 7 (cría 427 – 472) respectivamente. Los distintos tonos de gris representan distintos genotipos paternos en los nidos.

Tablas 10 y 11. Genotipos de las crías del nido 10 (cría 585 – 651) y del nido 13 (cría 702 – 791) respectivamente. Los distintos tonos de gris representan distintos genotipos paternos en los nidos.

Tablas 12 y 13. Genotipos de las crías del nido 14 (cría 792 – 864) y del nido 15 (cría 865 – 924) respectivamente. Los distintos tonos de gris representan distintos genotipos paternos en los nidos.

Tabla 14. Longitud curva del caparazón y valores de adecuación de hembras de *Chelonia mydas*.

RESUMEN

Las tortugas marinas presentan una gran variación en la frecuencia de paternidad múltiple entre y dentro de las especies. La mayoría de los estudios se han enfocado en buscar explicaciones a las causas de esta variación. Sin embargo, los efectos de la paternidad múltiple sobre la adecuación y el desempeño de las crías no han sido explorados exhaustivamente. Uno de los efectos de la paternidad múltiple en la adecuación puede analizarse en el caparazón. El caparazón de las tortugas marinas las protege de la depredación y se ha sugerido que la forma del mismo puede influir en la supervivencia y adecuación de los individuos. Se ha observado que el caparazón puede presentar anomalías tanto en el patrón de distribución de escudos como en su número (escudos supernumerarios). En el presente estudio el sistema biológico fue la tortuga verde (*Chelonia mydas*) de la costa michoacana en México. Los objetivos de este trabajo fueron: a) estimar la proporción de individuos adultos y crías con escudos supernumerarios en el caparazón, b) realizar un análisis de morfometría geométrica y de asimetría del caparazón, c) analizar la frecuencia de paternidad múltiple, d) determinar el orden de fertilización dentro del tracto reproductivo de las hembras, y e) establecer si existe relación entre la frecuencia de paternidad múltiple y los valores indirectos de adecuación (simetría, peso, tamaño, vigor). Catorce nidos de la tortuga verde fueron seleccionados para realizar un análisis de morfometría geométrica y asimetría del caparazón. Se colectaron muestras de 645 crías de nidos con 11 a 82 crías, muestreando en promedio de 51 crías por nido. En seis nidos se conservó su orden de oviposición hasta el día de la eclosión para determinar el

orden de fertilización dentro del tracto reproductivo y paternidad múltiple. La paternidad se infirió utilizando los microsatélites CM3, CM84 y CC117, diseñados previamente para tortugas marinas. Se encontró que el 40% de las crías presentan asimetría en el patrón de escudos (escudos supernumerarios) principalmente en los escudos centrales. En los nidos analizados con marcadores moleculares se encontró que cinco presentaron paternidad múltiple ya que fueron fertilizados por tres, cuatro y cinco machos, pero estos nidos no mostraron un orden de fertilización dentro del tracto reproductivo. Este resultado indica que el semen que fertilizó los huevos dentro del tracto genital de las hembras es una mezcla del fluido seminal de varios machos. En los nidos analizados molecularmente no se encontraron diferencias significativas con los valores de peso, vigor y tamaño de las crías de los diferentes machos; pero sí con los valores de asimetría del caparazón. Por lo anterior, en este estudio no se encontraron evidencias del efecto positivo de la paternidad múltiple sobre indicadores indirectos de adecuación de las crías.

Palabras clave: Paternidad Múltiple, *Chelonia mydas*, Adecuación, Simetría.

ABSTRACT

Marine turtles present a great variation in the frequency of multiple paternity has been detected between and within species. Most of the studies have focused to explain the causes of this variation. However, the effects of multiple paternity on the performance of turtle hatchlings have been poorly explored. One of the effects could be studied in the turtles shell. The shell that owns the marine turtles protects them from the depredation. It has been suggested that the shell's form can influence in the survival and fitness of the individuals. It has been observed that the shell can present anomalies in the distribution pattern and in the number of scutes (supernumerary scutes). The specie under study was the green turtle (*Chelonia mydas*) from the Michoacana Coast, Mexico. The objectives of this study were to: a) estimate the proportion of adult and hatchlings with supernumerary shell scutes, b) make a geometric morphometrics and symmetry analysis of the shell, c) analyze the frequency of multiple paternity, d) determine the fertilization order within the reproductive tract, and e) estimate the performance of hatchlings (i.e., shell symmetry, weight, length and vigor) associated to turtles with different frequency of multiple paternity. Fourteen nests of green turtle were selected to realize a geometric morphometrics and asymmetry shell analysis. It was collected 645 hatchlings with a range between 11-82 hatchlings by nest and a mean number of 51 hatchlings by nest. The oviposition order of six nests was conserved until the day of its emergence, for studying a specific fertilization order within the reproductive tract and multiple paternity. We used the microsatellites CM3, CM84 and CC117 for the paternity analysis. We found that 40% of the hatchlings had an

irregular number of shell scutes (extra scutes) mainly at the central ones. Only five from the six analyzed nests presented multiple paternity. It was found that these clutches were fertilized by three to five males without a specific fertilization order within the reproductive tract. This evidence suggests that the sperm used for the fertilization of eggs is a mixture of seminal fluids present inside the genital tract of the female. In the analyzed nests, it was found that there were not significant differences between weights, length and vigor or asymmetry of different male hatchlings, the differences were significant just for asymmetry values, concluding that there is no evidence of multiple paternity effect on the performance of hatchlings.

Key words: Multiple Paternity, *Chelonia mydas*, Fitness, Symmetry.

INTRODUCCIÓN GENERAL

A lo largo de la historia las tortugas marinas han sido una fuente importante de recursos para las comunidades humanas que habitan en las zonas costeras. Su explotación indiscriminada, falta de conocimiento sobre aspectos de su biología y otras causas indirectas, como la destrucción del hábitat, han provocado la reducción de muchas de sus poblaciones. Esta problemática es un punto importante de discusión en la comunidad académica y en organizaciones conservacionistas nacionales e internacionales, por ello muchos países han promulgado regulaciones y establecido nuevas estrategias de conservación para protegerlas.

En el mundo existen siete especies de tortugas marinas, de las cuales seis tienen sitios de anidación en México. Todas las tortugas marinas, con excepción de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), son consideradas como especies amenazadas dentro de una variedad de instrumentos legales enmarcados en tratados de conservación con alcances regionales e internacionales. Estas especies están catalogadas como en Peligro y en Peligro Crítico, en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). También estas especies están consideradas en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). En la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 todas las tortugas marinas están consideradas como especies en peligro de extinción, con excepción de la tortuga aplanada (*Natator depressus*) porque no se encuentra en México sólo en Australia.

En particular las poblaciones del género *Chelonia* en la costa del Pacífico mexicano se han visto fuertemente sometidas a una intensa explotación para la obtención de piel, carne y huevos; así como una alta mortandad en sus áreas de alimentación debido a la captura incidental de barcos camaroneros (Alvarado *et al.*, 1985; Koch *et al.*, 2006).

Las playas de Colola y Maruata, en la costa michoacana, son los sitios más importantes de anidación del género *Chelonia* en el Pacífico oriental. Las poblaciones del género *Chelonia* que anidan en la costa michoacana han registrado una disminución drástica poblacional debido a su intensa explotación (Figura 1). En las décadas 1960 y 1970 se estimaban aproximadamente 25 000 hembras anadoras que decayeron a un promedio de 1 400 en el período comprendido entre 1982 y 2001 (Delgado, 2003).

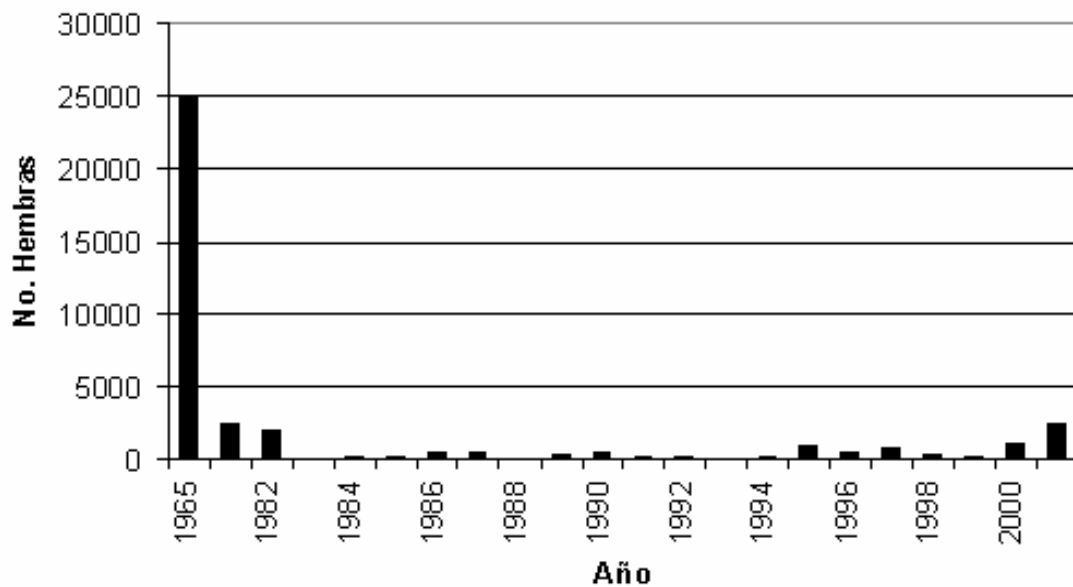


Figura 1. Reducción del tamaño poblacional de tortugas del género *Chelonia* en la costa del Pacífico mexicano (modificado de Delgado, 2003).

La posición taxonómica de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) con respecto a la tortuga negra (*Chelonia agassizii*) ha sido motivo de controversia; ya que algunos autores consideran a ésta última como especie y algunos otros no apoyan este estatus. Se considera a *Chelonia agassizii* como sinonimia de *Chelonia mydas*. De acuerdo con Chassin (2004), la controversia se ha generado a partir de las diferencias publicadas en estudios sobre la asignación de especie a la tortuga negra como los que se mencionan a continuación:

- I. *Chelonia agassizii* y *Chelonia mydas* son especies que ocurren de manera simpátrica en las Islas Galápagos y Nueva Guinea. Sin embargo, no hay evidencias de que se reproduzcan entre ellas por lo que Pritchard (1997) considera que existe aislamiento reproductivo y por lo tanto, considera válida la asignación de *C. agassizii* como especie.
- II. Figueroa y Alvarado (1990) compararon tortugas de la costa michoacana del Pacífico mexicano, con las de playa Tortuguero, Costa Rica del Océano Atlántico. Los resultados de esta comparación mostraron que la tortuga negra es diferente de la tortuga verde en cuanto a forma, tamaño y coloración del caparazón.
- III. Kamezaki y Matsui (1995) analizaron medidas craneales de tortugas de seis playas de anidación, dos del Atlántico (Comoros y Seychelles) y cinco del Pacífico (Japón, Ecuador, Costa Rica y Guyana). Concluyen que la diferenciación morfométrica entre *C.*

mydas y *C. agassizii* es suficiente para clasificarla sólo como la subespecie: *C. mydas agassizii*.

- IV. Bowen *et al.* (1992) analizaron el ADNmt con enzimas de restricción de muestras de 15 colonias dentro del área de distribución global del género *Chelonia*, encontrando una clara distinción entre las poblaciones del Indo-Pacífico (Islas Oman; Australia ; Japón; Hawaii, Polinesia Francesa; Michoacán en México; Isla Isabel,; Islas Galápagos; Ecuador) con respecto a las del Atlántico (Isla Ascención, Brasil, Suriname, Costa Rica, Florida en EUA) y Mediterráneo República de Chipre). Sin embargo, la evidencia no fue suficiente para apoyar la asignación de *C. agassizii* como especie independiente.
- V. Karl *et al.* (1992) analizaron genes nucleares, con enzimas de restricción para evaluar la diferenciación genética entre tortuga negra y verde; y en su análisis filogenético no se apoya la asignación de especie para *C. agassizii*.
- VI. Dutton *et al.* (1996) secuenciaron dos segmentos mitocondriales de tortuga negra y verde (ND4 y región control) sin que el análisis filogenético demuestre una distinción clara de la tortuga negra respecto a la tortuga verde.
- VII. Karl y Bowen (1999) secuenciaron 1 341 pares de bases de tres loci usados por Karl *et al.* (1992), sin encontrar que las tortugas negras

analizadas formen un grupo monofilético distinto al resto de las *Chelonias*.

Un aspecto importante a mencionar es que los trabajos citados anteriormente tienen tamaños de muestra pequeños ($n < 8$) para las poblaciones de Michoacán, que es donde se encuentran las principales playas de anidación de la tortuga negra.

Chassin (2004) realizó un análisis filogenético y de similitud de un total de 135 tortugas de 4 poblaciones de tortuga negra que anidan en la costa michoacana usando la región control del ADN mitocondrial. Los resultados de este autor no apoyan la asignación de especie para tortuga negra porque sus haplotipos formaron un grupo monofilético con los de tortuga verde del Pacífico, y los haplotipos de tortuga verde del Atlántico están agrupados en un grupo monofilético distinto. De modo que de acuerdo con la sistemática actual las tortugas verdes tanto del Pacífico como las del Atlántico pertenecen a una misma especie: *Chelonia mydas*. La asignación de especie a la tortuga negra requeriría que la misma se ubicara en un grupo monofilético independiente separado del conjunto de haplotipos de tortuga verde tanto del Atlántico como del Pacífico.

El rango taxonómico es un criterio importante en la evaluación de prioridades de conservación de un organismo amenazado: el único miembro de una familia distintiva recibirá mayor prioridad que una población semi-aislada de una especie (Karl y Bowen, 1999). En el caso particular del género *Chelonia*, el

estatus taxonómico pasa a segundo término a la luz de la evidencia de la reducción en el tamaño poblacional y la permanencia de las amenazas.

El presente trabajo se divide en dos capítulos sobre la población de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) que anida en Michoacán. En el primero, se analiza la morfometría geométrica, simetría y escudos supernumerarios del caparazón para conocer la proporción de individuos que presentan escudos supernumerarios y si la presencia de los mismos afecta la forma y la simetría del caparazón, ya que se ha sugerido que la forma del mismo puede influir en la supervivencia y adecuación de los individuos. En el segundo capítulo se aborda el tema de la paternidad múltiple y estimadores indirectos de adecuación en la progenie, entre ellos la simetría, para determinar si la paternidad múltiple confiere ventajas adaptativas a las crías.

CAPÍTULO I

ESTUDIO DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA, SIMETRÍA Y ESCUDOS SUPERNUMERARIOS EN *Chelonia mydas*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de las tortugas marinas

Las tortugas marinas presentan una distribución pantropical y habitan en todos los océanos, con excepción de dos especies: la tortuga aplanada o franca oriental (*Natator depressus*, Garman 1880) y la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*, Garman 1880) con una distribución restringida a Australia y al Golfo de México respectivamente.

Actualmente, existen siete especies agrupadas en dos familias y seis géneros: 1) la familia Dermochelyidae (de caparazón blando con textura de cuero), representada sólo por la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*, Linnaeus 1766) que se conoce puede incursionar hacia aguas frías, incluso polares; 2) la familia Cheloniidae (de caparazón duro), representada por seis especies; la tortuga aplanada o franca oriental (*N. depressus*) endémica de Australia, la tortuga lora (*L. kempii*) concentrada principalmente en el Golfo de México y la costa oriental de Estados Unidos, la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*, Eschscholtz 1829), la tortuga verde (*Chelonia mydas*, Linnaeus 1758), la tortuga caguama (*Caretta caretta*, Linnaeus 1758) y la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*, Linnaeus 1766) que presenta una distribución tropical.

En México, se encuentran playas de anidación para seis especies de tortugas marinas. En la costa del estado de Michoacán anidan la tortuga verde (*C. mydas*), la tortuga golfinia (*L. olivacea*) y la tortuga laúd (*D. coriacea*).

Las tortugas marinas presentan una morfología altamente derivada con muchas adaptaciones para la vida marina. Por ejemplo, todas las especies comparten caracteres como las extremidades en forma de aleta, presentan glándulas lacrimales alargadas con modificaciones para extraer el exceso de sales de los fluidos corporales que se acumulan por ingerir agua salada (Meylan y Meyland, 2000).

El caparazón de las tortugas marinas se caracteriza por una reducción en la cantidad de material óseo, respecto a las tortugas terrestres y dulceacuícolas. Presentan modificaciones en su forma que mejoran su eficacia hidrodinámica como el hueso coracoides del hombro que es más grande en comparación con el de otras tortugas y sirve como sitio de anclaje para los músculos pectorales que se utilizan durante la natación (Meylan y Meyland, 2000).

El tamaño y la forma del cuerpo tienen implicaciones fisiológicas, evolutivas y ecológicas para las tortugas marinas. Van Buskirk y Crowder (1994) y Van Dam y Diez (1998) plantean que las medidas corporales de la tortuga están correlacionadas con funciones reproductivas y fisiológicas como la regulación de la temperatura del cuerpo y la pérdida de agua por evaporación, entre otras.

1.2 Clasificación de la tortuga verde

Clasificación taxonómica de la tortuga verde. Reino: Animalia; Phylum: Chordata; Subphylum: Vertebrata; Clase: Reptilia; Subclase: Anápsida; Orden: Testudinata; Suborden: Cryptodira; Familia: Chelonidae; Género: *Chelonia*; Especie: *Chelonia mydas*.

Nombres comunes: tortuga verde, tortuga verde del pacífico oriental, peje blanco, tortuga blanca, tortuga negra, tortuga prieta.

Descripción. Posee un par de escamas prefrontales. Su caparazón es liso, con cuatro pares de escudos laterales, el color del mismo cambia con la edad del animal, es negro en las tortugas recién nacidas, cambia a marrón con canela en los juveniles, y verde oliva o verde grisáceo en los adultos, a veces presenta pequeñas manchas amarillas y marrones.

El plastrón es blanco en los recién nacidos, posteriormente cambia a amarillo cremoso, a veces pasando por una fase rosada o gris, dependiendo de la población de tortugas. Con excepción de las tortugas verdes melánicas (las llamadas tortugas negras) que se encuentran principalmente en el Pacífico Oriental, los adultos tienen el plastrón amarillo crema. Esta tortuga tiene una uña en cada extremidad, presenta cuatro escudos inframarginales de cada lado y dos poros de Rathke, uno en la escama axilar y el otro en la escama inguinal.

La tortuga verde es herbívora, se distribuye mundialmente en aguas templadas tropicales y subtropicales de aproximadamente 24°C. Esta especie se distribuye entre los 50°N y 40°S de latitud, aunque la mayoría de las playas de anidación se localizan entre los 20°N y 20°S del Ecuador (Hirth 1997). Esta tortuga

vive en aguas poco profundas, cerca de la costa y en áreas de arrecifes donde existen pastos marinos y algas que son su principal fuente de alimentación (Limpus *et al.* 1992; Lutz y Musick, 1997; Hirth, 1997).

Las partes que conforman las extremidades se encuentran fusionadas en forma de aletas. Las delanteras la utilizan para impulsarse, mientras las traseras le sirven como timón y para maniobrar dentro del agua. Ello le permite mantener velocidades de 30 y 40 km / h en distancias limitadas. Las hembras adultas utilizan las aletas traseras para la construcción del nido; los machos adultos presentan una cola prensil que utilizan para la cópula. El peso promedio es de 70 kg y pueden llegar a pesar hasta 120 kg (Pritchard y Mortimer, 2000; Wyneken, 2004).

Los programas de marcaje a la par de la utilización de herramientas moleculares han demostrado que las tortugas verdes son individuos filopátricos (FitzSimmons *et al.* 1997) que llevan a cabo grandes migraciones entre sus áreas de anidación y áreas de alimentación, cubriendo en ocasiones miles de kilómetros a través de fronteras internacionales, hasta alcanzar la madurez sexual. Es importante señalar que el proceso de maduración sexual, es un proceso biológico que demora entre 16 y 26 años (Hirth, 1997).

Esta especie anida en islas oceánicas aisladas, libres de depredadores así como en playas continentales. Las características de las playas de anidación para esta especie, es que sean playas abiertas o pequeñas, ensenadas protegidas y que no estén obstaculizadas por arrecifes o formaciones coralinas, o bien, por afloramientos rocosos (Pritchard y Mortimer 2000). Los factores determinantes en la arena incluyen la temperatura, la disponibilidad de humedad, la conductividad e

intercambio gaseoso, el grado de erosión y el grado de inundación (Mortimer, 1990).

1.3 Morfometría geométrica

La morfometría geométrica es la fusión entre la geometría y la biología; incluye el estudio de la forma en un espacio bi- o tri-dimensional que permite investigar los cambios morfológicos que sufren los organismos (Bookstain, 1982). La morfometría geométrica estudia los cambios en el tamaño y la forma partiendo del desplazamiento en el plano (2D) o en el espacio (3D) de un conjunto de “landmarks” o puntos morfométricos. Los “landmarks” son puntos basados en coordenadas que permiten deducir la forma de los organismos y pueden tener un significado filogenético, estructural, funcional o de desarrollo (Lele y Richtsmeier 1991). Los cambios en la forma, resultantes por presiones selectivas pueden identificarse con métodos de morfometría geométrica de manera gráfica permitiendo visualizar la dirección, localización y magnitud del cambio morfológico (Bookstain, 1982).

La forma del caparazón de las tortugas ha sido utilizada para realizar investigaciones sobre taxonomía y ecología adaptativa en Testudines, para describir la distinción entre especies muy cercanas o subespecies y para investigar la variación entre y dentro de poblaciones (Paquette y Lapointe, 2007). El caparazón de las tortugas, las protege de la depredación y es de vital importancia para el desempeño locomotor, se ha sugerido que la forma del

caparazón puede influir en la supervivencia y adecuación de los individuos (Myers *et al.*, 2006).

Existen pocos trabajos publicados sobre morfometría geométrica y simetría en tortugas y la mayoría se han realizado con tortugas dulceacuícolas (Claude *et al.*, 2003; Valenzuela *et al.*, 2004; Depecker *et al.*, 2006; Myers *et al.*, 2006; Davis y Grosse, 2008; Domokos y Várkony, 2008; Rivera y Claude, 2008). En la literatura se reporta un trabajo donde se utiliza la morfometría geométrica como herramienta para distinguir grupos morfológicos en términos de alometría y funciones adaptativas de la articulación del hombro de las tortugas e incluye 88 ejemplares de tortugas dulceacuícolas y 11 de tortugas marinas: tortuga verde (*C. mydas*), tortuga caguama (*C. caretta*) y tortuga carey (*E. imbricata*) (Depecker *et al.*, 2006).

Por otro lado, Nishizawa y colaboradores (2010) mediante morfometría geométrica compararon los cráneos de individuos adultos y juveniles de *C. mydas*, encontrando en los adultos, una elongación en la mandíbula; debido probablemente al cambio que ocurre en la dieta de los individuos.

1.4 Asimetría fluctuante

Existen tres tipos de desviación de la simetría bilateral perfecta: la asimetría fluctuante (AF), la asimetría direccional (AD) y la antisimetría (AS) (Van Valen, 1962). La AF mide la variación en las diferencias de los lados (izquierdo derecho) que se distribuyen alrededor de 0, mientras que en AD las diferencias izquierda derecha se distribuyen alrededor de un promedio que es

significativamente mayor o menor que 0 (esto ocurre por ejemplo cuando un lado de un carácter es consistentemente más grande que el otro. AS es la ausencia de simetría en rasgos normales del desarrollo (Van Valen, 1962; Palmer y Strobeck, 1986, 1992).

La AF se define como la desviación de la simetría bilateral perfecta. Comúnmente se utiliza como una medida de estabilidad del desarrollo, que es la habilidad de regular el desarrollo y producir un fenotipo a pesar de perturbaciones ambientales (Oxnevad *et al.*, 2002; Ayres-Fernández y Cordero-Rivera, 2004).

Oxnevad y colaboradores (2002) plantean que existe una correlación entre la simetría individual y componentes de adecuación como la sobrevivencia, fecundidad, crecimiento y apareamiento.

A nivel individual o de población, la AF ha sido reconocida como herramienta importante en la investigación con animales y en la conservación, ya que algunos trabajos realizados con peces, aves, ranas e incluso tortugas dulceacuícolas muestran que en localidades perturbadas se observan mayores niveles de AF que en localidades no perturbadas (Gallant y Teather, 2001; Utayopas, 2001; Bustnes *et al.*, 2002; Ayres-Fernández y Cordero-Rivera, 2004; Davis y Grosse, 2008).

Los factores que causan la AF pueden clasificarse en genéticos y ambientales. Dentro de los factores genéticos se pueden reconocer al menos cinco grandes categorías: la pérdida de variación genética, la homocigosis, la selección direccional, la hibridación y las mutaciones. En cuanto a los factores

ambientales, existe evidencia de que las temperaturas adversas, el estrés nutricional, factores químicos, la densidad poblacional, fragmentación de hábitat, enfermedades, el ruido y muchos otros factores que causen algún tipo de estrés durante el desarrollo, pueden provocar un aumento en la AF (Cuervo, 2000; Davis y Grosse 2008).

Debido a que la inestabilidad en el desarrollo puede ser causada por factores ambientales, la AF puede usarse como indicador del estado de los ecosistemas (indicador de impacto de una gran variedad de agentes contaminantes) y del estrés ambiental en muchos organismos, (Cuervo, 2000; Ayres-Fernández y Cordero-Rivera, 2004).

Recientemente los estudios sobre AF han cobrado una gran importancia. Por un lado se estudian las diferencias entre especies o poblaciones, mostrando unos valores mayores de asimetría aquellas que están sometidas a mayores niveles de estrés. Por otro lado se estudia si se presentan diferencias entre individuos dentro de una población, indicando la exposición de los individuos a agentes de perturbación durante el desarrollo o su resistencia ante los efectos perjudiciales de dichos agentes (Cuervo, 2000).

Dufour y Weatherhead (1998) realizaron un trabajo con aves y sugieren que la simetría podría ser un indicador confiable de la calidad fenotípica y tal vez genotípica, e incluso que la simetría podría ser un aspecto importante a considerar en la selección sexual. Møller y Pomiankowski (1993) proponen que si la simetría fuese un indicador de calidad, los individuos simétricos serían más exitosos que

sus contrapartes asimétricas en competencia intra-sexual, competencia por oportunidades para la cópula, así como en la competencia por otros recursos; por lo que la simetría podría tener implicaciones evolutivas, y estar relacionada con la estabilidad genética y la adecuación.

Una anomalía muy común en tortugas y que está relacionada directamente con la asimetría es la presencia de escudos extra, sea en el caparazón o en el plastrón de los individuos, y existe evidencia de que esto puede ser causado por factores como por ejemplo contaminación (Davis y Grosse, 2008).

Ayres-Fernández y Cordero-Rivera (2004) realizaron un estudio de AF en tortugas dulceacuícolas *Emys orbicularis*, de dos poblaciones de España, una ubicada en un área altamente industrializada, mientras que la otra ubicada en un área rural. Sus resultados muestran un mayor porcentaje de anomalías en los escudos del caparazón, con escudos extra y asimétricos para los individuos de la zona industrializada con respecto a aquellos de la zona rural.

Davis y Grosse (2008) realizaron un estudio de AF en tortugas dulceacuícolas *Trachemys scripta*, de Georgia, Carolina del Sur, Carolina del Norte, Florida y Alabama. Estos autores midieron el área de los seis pares de escudos del plastrón para generar estimadores de AF resultado de las diferencias en el área de los escudos del lado derecho en relación con los del lado izquierdo. Los resultados mostraron que los estimadores de AF dependen del sexo, tamaño y tipo de escudo (gular, humeral, pectoral, abdominal, femoral o anal). El sexo de los individuos tiene una gran influencia para explicar mejor los valores de AF,

encontrando que las hembras presentan escudos más simétricos que los machos; esto posiblemente debido a que las hembras tienen una tasa de crecimiento absoluto más rápido que la de los machos. Un crecimiento rápido en tortugas es un indicador de crecimiento eficiente (más simétrico) y con menores errores bilaterales.

1.5 Escudos supernumerarios

Los escudos del caparazón de las tortugas marinas son estructuras epidérmicas queratinosas que crecen encima de los huesos del caparazón. Los escudos pueden crecer de dos formas: aumentar de tamaño (área) en los márgenes, o bien el escudo entero aumentar en grosor. En la familia Cheloniidae los márgenes de los escudos del caparazón y las suturas de los huesos no están alineados unos con otros (Wyneken, 2004).

El arreglo típico de placas en *C. mydas* consiste de una serie media longitudinal de elementos impares, los escudos vertebrales, que a su vez están flanqueados a cada lado por una serie de escudos bilateralmente pareados, los escudos costales, rodeados exteriormente por otra serie de escudos bilateralmente pareados, los escudos marginales. Situados anteriormente entre el primer par de escudos marginales está el escudo nocal. Situado posteriormente entre el último par de marginales está un par de escudos supracaudales (Pritchard y Mortimer, 2000; Özdemir y Türkozan, 2006) (Figura 1).

El conteo de escudos supernumerarios así como subnumerarios ha sido observado en casi todas las especies de tortugas que poseen escudos. Entre las

tortugas marinas el género *Lepidochelys* es el que presenta la mayor desviación del patrón de escudos (Özdemir y Türkozan, 2006).

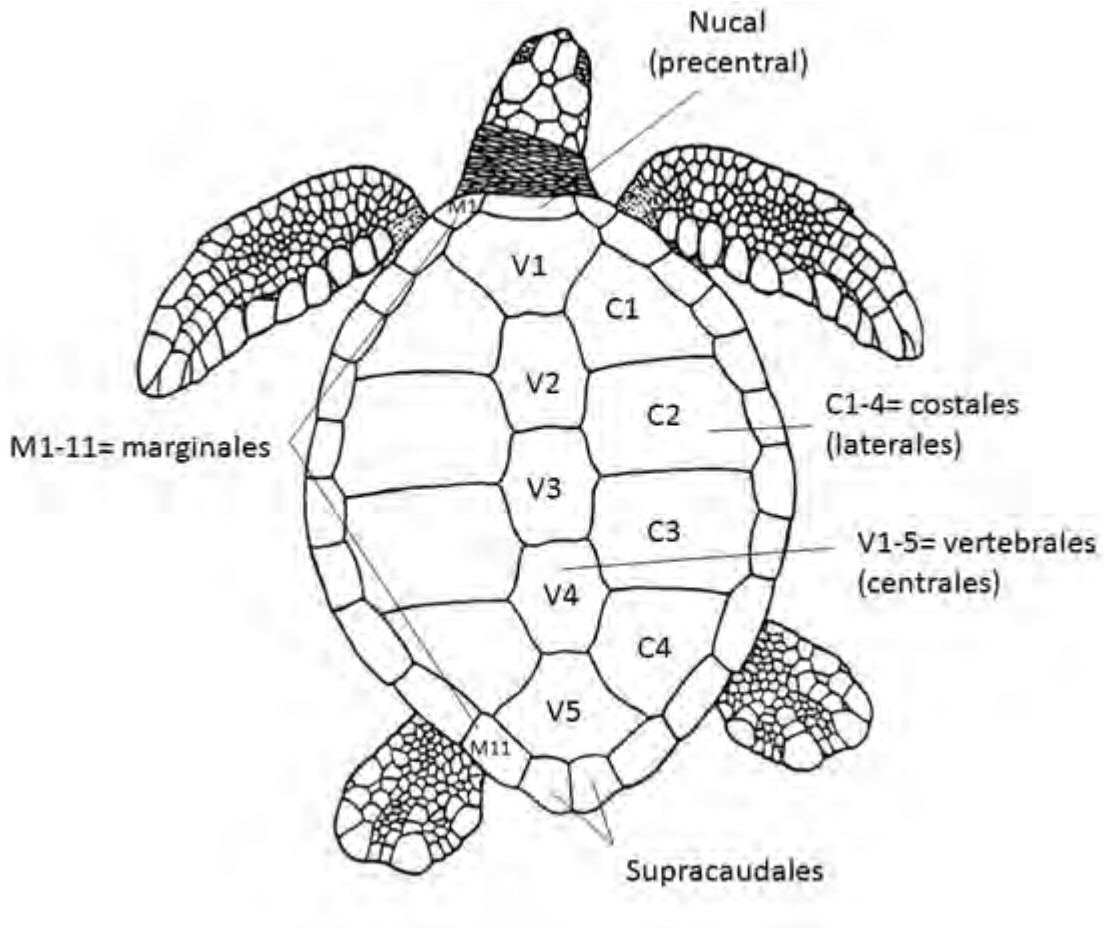


Figura 1. Rasgos morfológicos externos (escudos) de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) (tomado de Pritchard y Mortimer, 2000).

Para el caso de tortugas marinas existen a la fecha pocos trabajos sobre anomalías en el patrón de los escudos (escudos supernumerarios).

Gadow (1899) (en Özdemir y Türkozan, 2006) en su estudio con tortugas caguama (*C. caretta*), menciona que los ejemplares adultos tienen una menor

variación que las crías de la misma especie en relación a los escudos supernumerarios.

Suganuma *et al.* (1994) realizaron un estudio de anomalías en el patrón de escudos del caparazón de crías, hembras y machos de tortuga verde (*C. mydas*) en las islas Ogasawara en Japón. Estudiaron individuos adultos (1252 hembras y 661 machos) y crías de 232 nidos; 190 nidos fueron sembrados en vivero y 42 fueron nidos naturales. Los autores observaron que de los nidos que fueron sembrados en vivero, crías de 178 nidos (94%) presentaron escudos supernumerarios; mientras que de los nidos naturales, crías de 28 nidos (67%) presentaron escudos supernumerarios. En las hembras adultas observaron que sólo solo 63 (5%) de éstas presentaron irregularidades en el patrón de escudos. Por otro lado, en los machos adultos observaron que 22 (3.3%) de ellos presentaron escudos supernumerarios.

Bertolero (2000) realizó un estudio en la costa Cataluña, España; encontrando que sólo uno de cuatro ejemplares adultos de tortuga verde (*C. mydas*) presentó escudos extra.

Türkozan *et al.* (2001) realizaron un estudio con tortugas caguama (*C. caretta*), en cinco playas de la República de Chipre y Turquía y observaron la presencia de individuos con escudos subnumerarios y supernumerarios.

Estrades (2002) en Uruguay encuentra que de un total de 101 ejemplares adultos de tortuga verde (*C. mydas*), 4 presentaron escudos supernumerarios.

Özdemir y Türkozan (2006) analizaron el patrón de escudos del caparazón de 718 crías de *C. mydas* de 2 playas diferentes de la República de Chipre y encontraron que 290 crías (40.4%) presentaron variación en el patrón de escudos. Las series de escudos más variables fueron los vertebrales, costales y marginales.

Türkozan y Yilmaz (2007) analizaron el patrón de escudos del caparazón de 1922 crías de *C. caretta* de la playa Dalyan, Turquía. Encontraron que 53 crías (2.8%) presentaron variación en el patrón de escudos. Los escudos más variables fueron los vertebrales, costales y marginales.

Se ha propuesto que las desviaciones del patrón de escudos se debe a disturbios durante el desarrollo ontogenético, causado posiblemente por diferentes factores ambientales como pueden ser variaciones de temperatura y del suplemento de oxígeno durante la incubación; también se propone que puedan deberse al manejo de los huevos en una cierta etapa del desarrollo. Existe evidencia que sugiere que diferentes factores ambientales pueden influir en la variación del patrón de escudos durante la incubación (Özdemir y Türkozan, 2006, Reid *et al.* 2009). Hill (1971, en Türkozan *et al.*, 2001) menciona que en la tortuga golfina (*L. olivácea*) el manejo de los huevos en un cierta etapa del desarrollo es una fuente de variación en el patrón de escudos.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Determinar los patrones de simetría del caparazón que presentan hembras adultas y progenies de la tortuga verde (*C. mydas*) de la costa michoacana.

2.2 Particulares

1. Estimar la proporción de individuos adultos y crías de la tortuga verde (*C. mydas*) que presenten escudos supernumerarios.
2. Realizar un análisis individual y poblacional de morfometría geométrica de la tortuga verde (*C. mydas*).
3. Evaluar los índices de asimetría que presentan los individuos de tortuga verde (*C. mydas*).

3. HIPÓTESIS

La selección natural actúa eliminando la variación no favorable durante etapas tempranas de la vida. Por lo que los individuos adultos de la tortuga verde (*C. mydas*) de la costa michoacana presentarán una menor variación morfológica que las crías.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Trabajo de campo

La localidad de estudio fue la playa de Maruata en la costa michoacana. Esta playa es estrecha de 2.3 km de longitud, localizada a los 18°16' de latitud norte y 103° 20' de longitud oeste; limita al oeste con el río Maruata o Coire, y al este por el acantilado "Rincón Chiquero" (Figura 2).

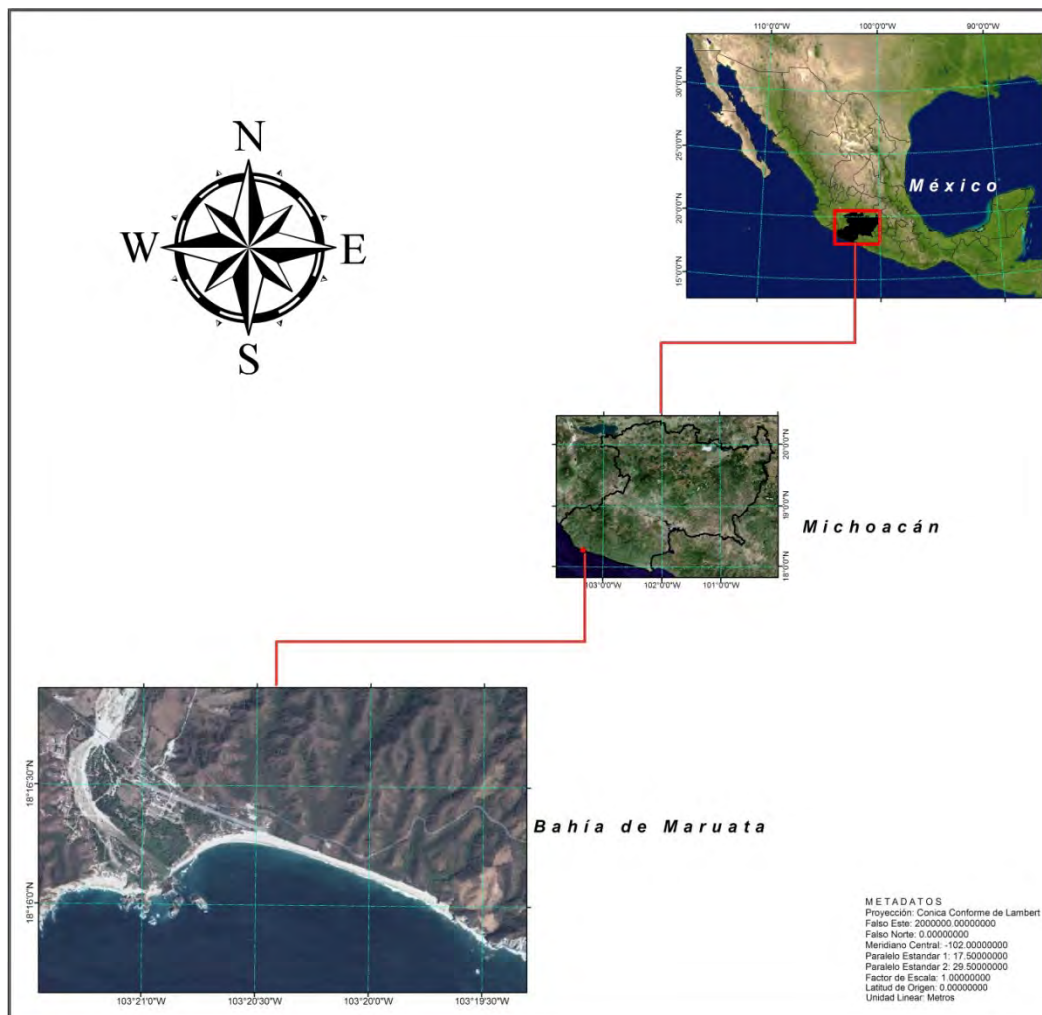


Figura 2. Ubicación del área de estudio.

Durante la temporada de anidación 2008-2009 se seleccionaron 645 crías de 14 nidos sembrados en vivero (promedio = 47, variación de crías entre nidos 11 a 79). Cada una de estas crías fue colocada sobre una superficie plana cubierta con papel milimétrico (como escala de referencia) para posteriormente fotografiarlas con una cámara digital (Sony, 7.2 megapíxeles, zoom óptico 3x).

En el campo se realizó el conteo de escudos nucleales, centrales, costales marginales y supracaudales del caparazón de 101 hembras anidadoras de la temporada 2009-2010, para determinar si estos individuos presentaban escudos extras.

4.2 Morfometría geométrica

El análisis morfométrico se basó en marcas anatómicas conspicuas y reproducibles del margen del caparazón de las tortugas (“landmarks”). Con el programa MakeFan6 de la serie IMP (“Integrated Morphometrics Package”) (<http://www2.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>) se generaron dos ejes de simetría a partir de dos “landmarks”. El primero de ellos ubicado en la unión del segundo escudo central con el primero y segundo escudos laterales del lado izquierdo; el otro ubicado en la posición mencionada anteriormente pero del lado derecho.

Las coordenadas (x, y) de un total de 17 “landmarks” fueron registrados en la unión de escudos marginales particulares y la unión del eje de simetría con el segundo escudo central, para cada imagen del caparazón de cada una de las

tortugas utilizando el programa TpsDig (Rohlf, 2005). Dos “landmarks” adicionales fueron colocados como escala de referencia sobre el papel milimétrico. (Figura 3).

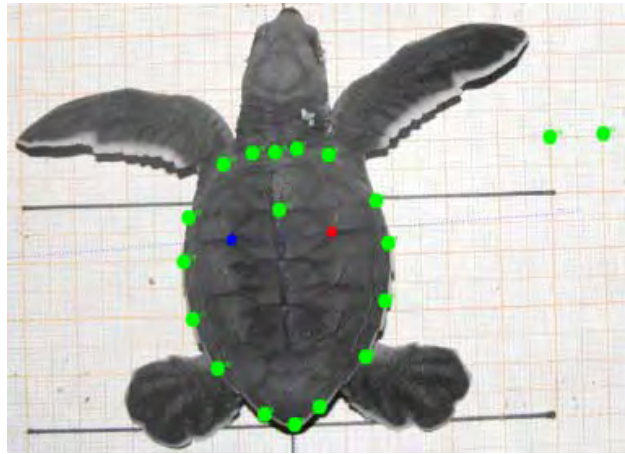


Figura 3. Asignación de ejes de simetría y “landmarks” (en verde) en fotografías digitales de crías de *Chelonia mydas*.

Se realizó un análisis de superimposición de Procrustes para la configuración de los “landmarks” utilizando el programa CoordGen6 de la serie IMP (<http://www2.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>). El primer paso de la configuración de superimposición de los “landmarks” es de dos dimensiones ($x_1 y_1, x_2 y_2...$) y es una superimposición generalizada de los mínimos cuadrados de los Procrustes, que permite minimizar las diferencias entre la configuración de los “landmarks” por medio de la traslación, escalación y rotación para quitar toda aquella información que no esté relacionada con la forma, así como para obtener variables de la misma (distancias Procrustes) (Rohlf, 1990).

Las variables de la forma (distancias Procrustes) de cada individuo se utilizaron para realizar un análisis de variables canónicas (CVA). El CVA es un análisis multivariado que describe diferencias entre grupos (Zelditch *et al.*, 2004).

4.3 Asimetría fluctuante

Para realizar este análisis se asignaron 22 “landmarks”, en la unión de escudos marginales particulares y la unión del eje de simetría con los escudos centrales utilizando el programa TpsDig (Rohlf, 2005). Dos “landmarks” adicionales fueron colocados sobre el papel milimétrico como escala de referencia (Figura 4).



Figura 4. Asignación de “landmarks” (en amarillo) en fotografías digitales de crías de *Chelonia mydas*.

Los niveles individuales de asimetría fluctuante del caparazón de las tortugas se obtuvieron utilizando el programa SAGE 1.0 (“Symmetry and Asymmetry in Geometric Data”) (Márquez, 2006). Este software analiza las coordenadas “x” y “y” de los 22 “landmarks” del caparazón de cada individuo, utilizando un protocolo de configuración que divide en dos lados el caparazón

considerando un eje de simetría. El protocolo de configuración utilizado en este trabajo considera 7 pares de “landmarks” para estimar los niveles de AF. El análisis de superimposición de “procrustes” se realiza con la configuración original y la configuración espejo de manera simultánea. Los mínimos cuadrados de los “procrustes” de las configuraciones de los “landmarks” y sus imágenes espejo son la forma perfectamente simétrica; mientras que AF es la desviación de la simetría bilateral perfecta (Klingenberg y McIntyre, 1998; Klingenberg *et al.*, 2002). El promedio cuadrado de las distancias “procrustes” de todos los ejemplares es la contribución individual al componente de AF de la variación del caparazón dentro de una muestra (Zelditch *et al.*, 2004).

La asimetría fue analizada con un ANOVA factorial de los “procrustes” con 1000 permutaciones usando el Software SAGE (Márquez, 2006).

4.4 Escudos supernumerarios

Utilizando las fotografías digitales tomadas en campo, se realizó el conteo de escudos nucales, centrales, costales, marginales y supracaudales de cada una de las crías para determinar si las crías presentaban escudos extras.

4.5 Análisis estadísticos

Los análisis de variables canónicas (CVA, por sus siglas en inglés) se realizaron con el software JMP 6.0 (SAS Institute).

5. RESULTADOS

5.1 Morfometría geométrica y asimetría fluctuante

Con respecto a la morfometría geométrica, el análisis de variables canónicas muestra que existen diferencias significativas entre la forma del caparazón de las crías de los 14 nidos analizados (Wilks' Lambda = 3.1987, $p = 0.0001$) (Figura 5); mientras que el análisis de variables canónicas realizado a crías con el patrón normal de escudos respecto a las crías con escudos supernumerarios mostró que no existen diferencias significativas entre ambos grupos (Wilks' Lambda = 0.035328, $p = 0.9897$) (Figura 6), lo que sugiere que los escudos de las crías con escudos supernumerarios se encuentran arreglados de manera tal que no modifican la forma del caparazón.

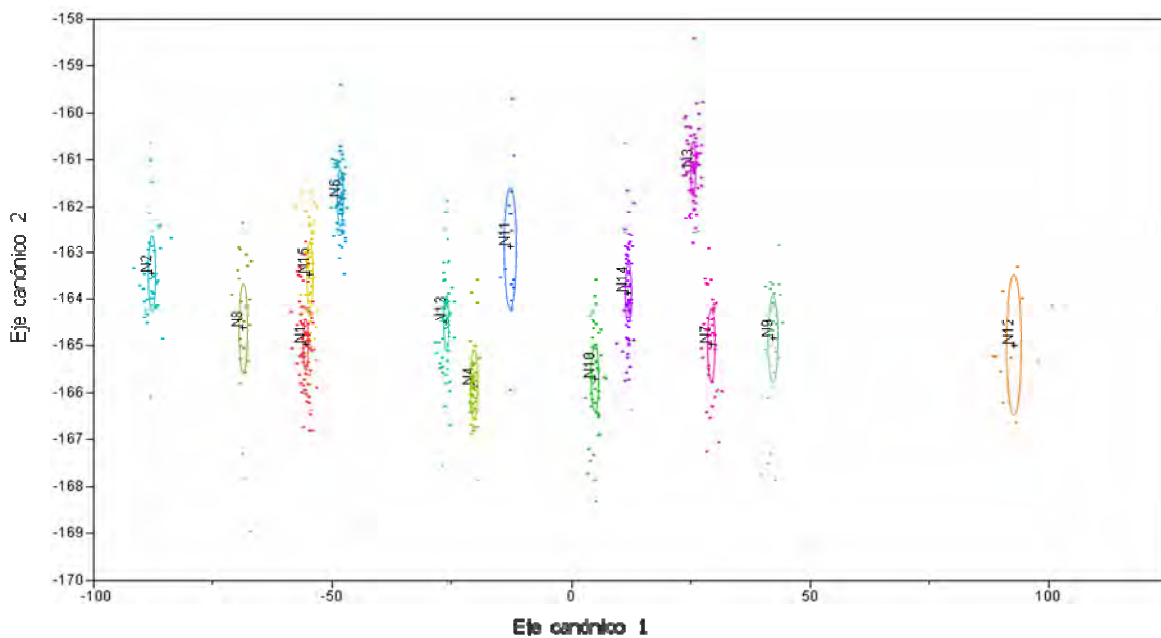


Figura 5. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado a crías de 14 nidos de *Chelonia mydas*. Cada color corresponde a un nido diferente.

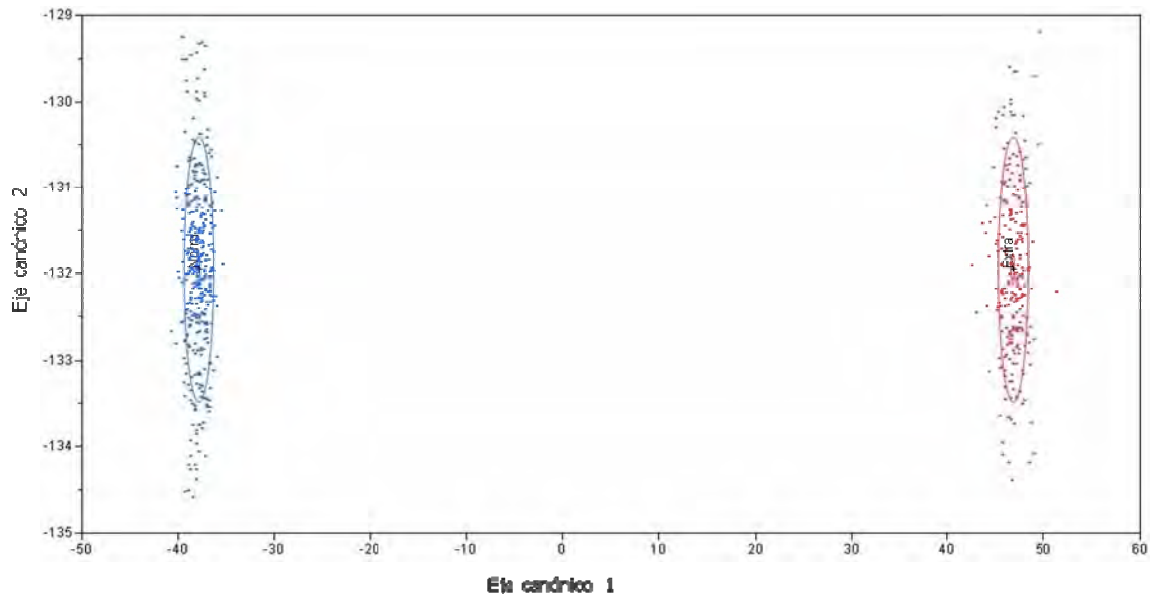


Figura 6. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado a crías de *Chelonia mydas* con el patrón normal de escudos (en azul) respecto a aquéllas con escudos supernumerarios (en rojo).

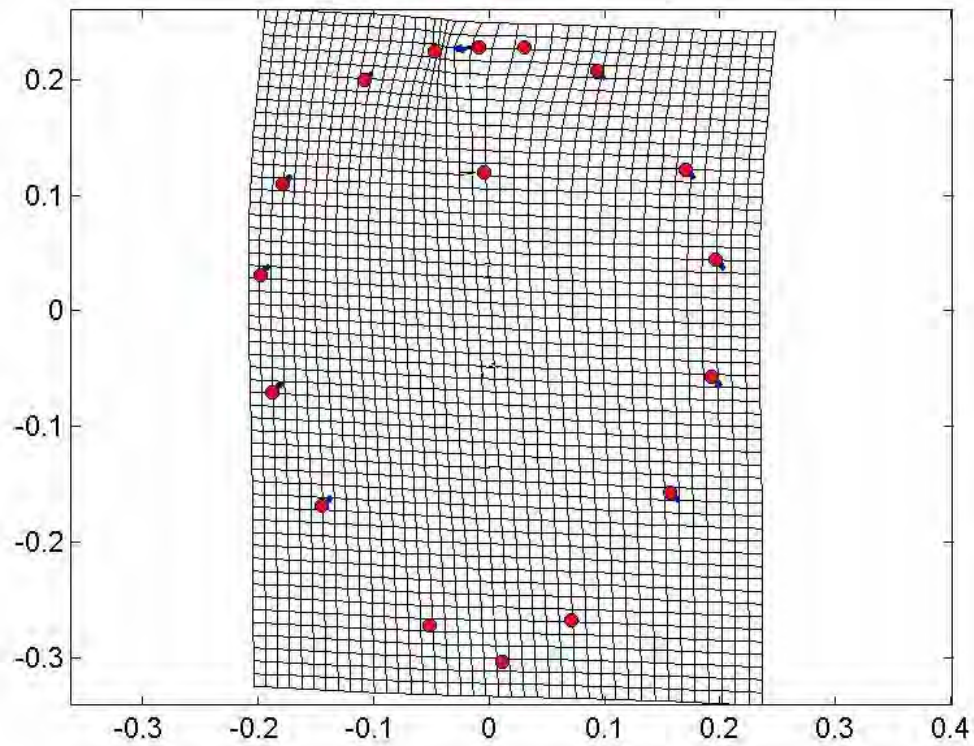


Figura 7. Resultado del análisis de placas delgadas de las crías con escudos supernumerarios.

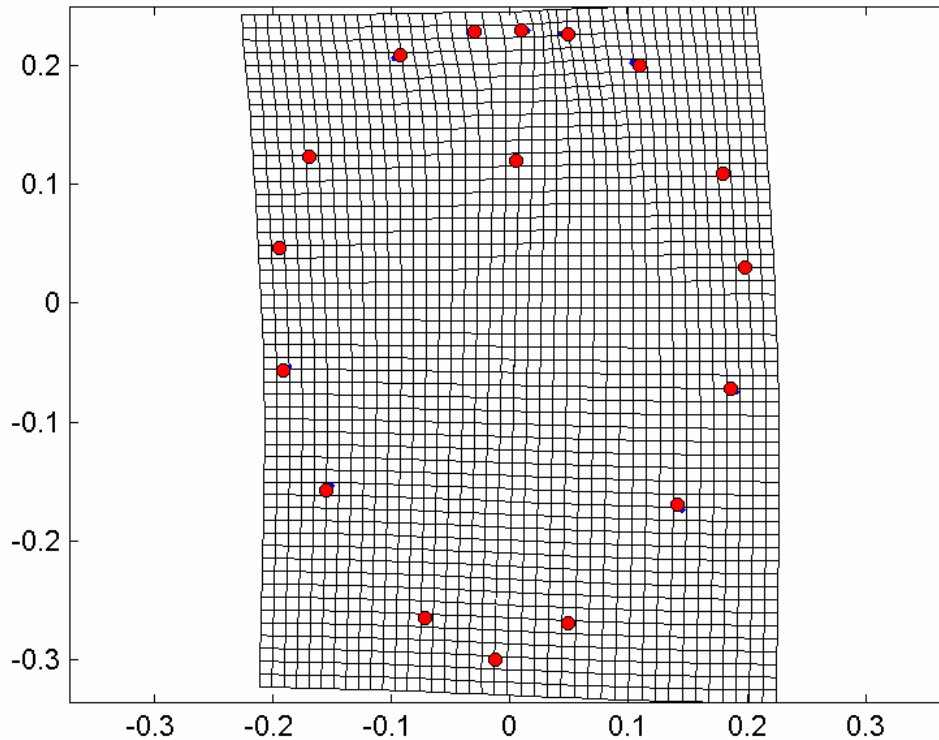


Figura 8. Resultado del análisis de placas delgadas de las crías con el patrón normal de escudos.

El índice de asimetría fluctuante del caparazón de las crías promedio fue de 0.00351081 (intervalo de variación de -0.20399506 a 0.150359484). Se encontró que existen diferencias significativas entre la asimetría de las crías de los 14 nidos estudiados ($F = 8.7482$, $P = 0.0001$), debidas probablemente a factores como efecto materno y diferencias microambientales (de incubación).

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de asimetría de las crías con el patrón normal de escudos del caparazón respecto a aquellas con escudos supernumerarios ($F = 3.2069$, $P = 0.9025$). Lo que sugiere que aunque los individuos presenten escudos supernumerarios no significa que dichos individuos sean asimétricos.

5.2 Escudos supernumerarios

De las 101 hembras anidadoras, se observó que 43 (42.5%) presentan escudos supernumerarios. Lo más común es que se presenten irregularidades en el patrón de distribución de los escudos centrales. En la Tabla 1 se puede observar cómo se presenta la distribución de los escudos en las hembras adultas.

Tabla 1. Número y distribución de los escudos del caparazón de hembras adultas de *Chelonia mydas* de la costa michoacana y su frecuencia (%). El número de escudos se presenta en números separados por un guión cuando se refiere a la distribución de los mismos en lado izquierdo- lado derecho. En negritas se resalta el arreglo típico de los escudos de acuerdo a la literatura.

	Número de escudos	N (%)
Nucal	1	98 (97.03)
	2	3 (2.97)
Centrales	5	74 (73.26)
	6	26 (25.75)
	7	1 (0.99)
Costales	4-4	88 (87.12)
	4-5	1 (0.99)
	5-4	4 (3.96)
	5-5	3 (2.98)
	6-4	1 (0.99)
	6-5	1(0.99)
	6-6	2 (1.98)
	6-7	1 (0.99)
Marginales	9-11	1 (0.99)
	11-11	87 (86.12)
	11-12	5 (4.96)
	12-11	5 (4.96)
	12-12	2 (1.98)
	13-12	1 (0.99)
Supracaudales	1-1	101 (100)

Tabla 2. Número y distribución de los escudos del caparazón de crías de *Chelonia mydas* de la costa michoacana y su frecuencia (%). El número de escudos se presenta en números separados por un guión cuando se refiere a la distribución de los mismos en lado izquierdo- lado derecho. En negritas se resalta el arreglo típico de los escudos de acuerdo a la literatura.

	Número de escudos	N (%)
Nucal	1	627 (97.67)
	2	14 (2.33)
Centrales	4	1 (0.16)
	5	435 (67.44)
	6	181 (28.06)
	7	23 (3.56)
	8	4 (0.62)
	9	1 (0.16)
Costales	4-3	1 (0.16)
	4-4	499 (77.36)
	4-5	33 (5.11)
	4-6	6 (0.93)
	5-4	42 (6.51)
	5-5	37 (5.73)
	5-6	3 (0.46)
	6-4	6 (0.93)
	6-5	10 (1.55)
	6-6	5 (0.78)
	7-8	1 (0.16)
	8-8	1 (0.16)
	9-7	1 (0.16)
Marginales	10-11	1 (0.16)
	11-11	620 (96.12)
	11-12	4 (0.62)
	12-11	5 (0.78)
	12-12	14 (2.16)
	13-12	1 (0.16)
Supracaudales	1-1	645 (100)

Tabla 3. Distribución de los escudos del caparazón de hembras adultas y crías de *Chelonia mydas* de la costa michoacana y su frecuencia (%). El número de escudos se presenta en números separados por un guión cuando se refiere a la distribución de los mismos en lado izquierdo- lado derecho. En negritas se resalta el arreglo típico de los escudos de acuerdo a la literatura.

	No. de Escudos	Hembras adultas %	Crías %
Nucal	1	97.03	97.67
	2	2.97	2.33
Centrales	4	NP	0.16
	5	73.26	67.44
	6	25.75	28.06
	7	0.99	3.56
	8	NP	0.62
	9	NP	0.16
Costales	4-3	NP	0.16
	4-4	87.12	77.36
	4-5	0.99	5.11
	4-6	NP	0.93
	5-4	3.96	6.51
	5-5	2.98	5.73
	5-6	NP	0.46
	6-4	0.99	0.93
	6-5	0.99	1.55
	6-6	1.98	0.78
	6-7	0.99	NP
	7-8	NP	0.16
	8-8	NP	0.16
9-7	NP	0.16	
Marginales	9-11	0.99	NP
	10-11	NP	0.16
	11-11	86.12	96.12
	11-12	4.96	0.62
	12-11	4.96	0.78
	12-12	1.98	2.16
	13-12	0.99	0.16
Supracaudales	1-1	100	100

De las 645 crías analizadas, 254 (40%) presentan escudos supernumerarios (escudos extras). Lo más común es que se presenten irregularidades en el patrón de distribución de los escudos centrales. En la Tabla 2 se puede observar como es la distribución de escudos que presentan las crías. En la Tabla 3 se pueden observar las distribuciones de escudos en hembras adultas y crías.

6. DISCUSIÓN

6.1 Morfometría geométrica y asimetría fluctuante

La forma corporal puede influir en la supervivencia individual y la adecuación de los individuos. En el caso particular de las tortugas la morfometría del caparazón ha sido utilizada para examinar los patrones de variación entre y dentro de poblaciones, realizar investigaciones sobre taxonomía y ecología adaptativa, para describir la distinción entre especies muy cercanas o subespecies (Myers *et al.*, 2006; Paquette y Lapointe, 2007).

Existen pocos trabajos publicados sobre morfometría geométrica y simetría en tortugas, y éstos, se han realizado con tortugas dulceacuícolas. A la fecha se desconoce la publicación de trabajos sobre morfometría geométrica y asimetría en tortugas marinas.

Las diferencias encontradas en forma del caparazón y asimetría entre los diferentes nidos analizados en este estudio puede deberse a que los nidos son de diferentes hembras (efecto materno). Las diferencias encontradas podrían ser estadísticamente significativas pero biológicamente no ser relevantes, es decir, que toda esta variación encontrada no afecte la supervivencia de los individuos.

Por otro lado, este trabajo mostró que las crías con escudos supernumerarios no son significativamente diferentes, ni en forma ni en asimetría del caparazón, de las crías que poseen el patrón normal de escudos. Lo mencionado anteriormente corrobora lo propuesto por Ewert (1979) y Wyneken (2004) de que los márgenes de los escudos del caparazón y las suturas de los

huesos no están alineados unos con otros y que por lo tanto, la presencia de escudos supernumerarios en el caparazón no afecta la conformación del mismo.

6.2 Escudos supernumerarios

Ewert (1979) menciona que las placas supernumerarias son relativamente frecuentes para el orden Testudines. De acuerdo con el autor, este fenómeno no afecta la supervivencia de los individuos debido a que son anomalías de origen genético o de embriogénesis. El fenómeno se denomina “Síndrome Dovetail” de anomalías del caparazón. La presencia del mismo no afecta ni la conformación ni el número de las placas óseas.

En el presente trabajo se estudiaron 101 hembras adultas y 645 crías de 14 nidos y se observó que el porcentaje de individuos adultos con escudos supernumerarios es muy similar al porcentaje de crías con escudos supernumerarios (42.5% y 40%, respectivamente), a diferencia de otros trabajos mencionados anteriormente (Gadow, 1899 -en Özdemir y Türkozan, 2006-; Saganuma *et al.*, 1994) en donde se observa claramente que los individuos adultos presentan una menor variación en el patrón de escudos. Se observó que al igual que en trabajos realizados con anterioridad (Özdemir y Türkozan, 2006; Türkozan y Yilmaz, 2007) los escudos más variables en número fueron los vertebrales, costales y marginales.

Se considera que debería incrementarse el número de muestra tanto de crías como de individuos adultos, así como realizar muestreos en diferentes temporadas, para observar si se sigue conservando esta relación.

Por lo mencionado anteriormente, se puede observar que el hecho de que se presenten crías con escudos supernumerarios aún no es claro, así como tampoco lo que pasa con éstas durante su crecimiento. Se considera que el escenario ideal sería realizar un seguimiento de las crías hasta su estado adulto, para estudiar qué sucede con aquellas que presentan escudos extras, para corroborar si efectivamente, como menciona Ewert (1979), la presencia de escudos supernumerarios no afecta, por ejemplo la capacidad de nado y la supervivencia de estos individuos.

De acuerdo con Ewert (1979) el patrón de escudos del caparazón debe también tener un período crítico de diferenciación así como lo tiene la diferenciación gonadal en las tortugas en el segundo tercio del período de incubación. Mast y Carr (1989) mencionan que el manejo de los huevos después de la oviposición tiene un efecto marcado en la variación del patrón de escudos; por lo tanto, los autores opinan que la translocación e incubación artificial de los huevos de tortuga marina debería de ser evaluado en lo que se refiere a sus posibles efectos en la viabilidad de las crías. Cuando el mecanismo de las anomalías de escudos del caparazón sea mejor entendido podría ayudar a la biología de la conservación ya que sería un elemento adicional en el marco de riesgo por depredación de saqueo. En el caso particular de este trabajo no se cuenta con datos de nidos naturales. Se considera que sería un aspecto muy importante a explorar en un futuro para investigar si en nidos que sufren de algún tipo de manejo después de la oviposición, se incrementa el porcentaje de anomalías en el patrón de escudos de las crías.

7. REFERENCIAS

- Ayres-Fernández, C. y A. Cordero-Rivera. 2004. Asymmetries and accessory scutes in *Emys orbicularis* from Northwest Spain. *Biologia*, Bratislava 59/Suppl. 14: 85-88.
- Bertolero, A. 2000. Tortuga verde *Chelonia mydas*, con placas supernumerarias en el caparazón. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 11: 73-74.
- Bookstein, F.L. 1982. Foundation of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 451-470.
- Bustnes, J.O., I. Folstad, K.E. Erikstad, M. Fjeld, Ø. O. Miland y J.U. Skaare. 2002. Blood concentration of organochlorine pollutants and wing feather asymmetry in glaucous gulls. *Functional Ecology* 16: 617-622.
- Claude, J., E. Paradis, H. Tong y J.C. Auffray. 2003. A geometric morphometric assessment of the effects of environment and cladogenesis on the evolution of the turtle shell. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 485-501.
- Cuervo, J.J. 2000. El estudio de la asimetría fluctuante. *Etologuía* 18: 27-60.
- Davis, A.K. y A.M. Grosse. 2008. Measuring fluctuating asymmetry in plastron scutes of yellow-bellied sliders: the importance of gender, size and body location. *The American Midland Naturalist* 159: 340-348.
- Depecker, M., C. Berge, X. Penin y S. Renous. 2006. Geometric morphometrics of the shoulder girdle in extant turtles (Chelonii). *Journal of Anatomy* 208: 35-45.
- Domokos, G. y P.L. Várkonyi. 2008. Geometry and self-righting of turtles. *Proceedings of the Royal Society Biological Science* 275: 11-17.

- Dufour, K.W. y P.J. Weatherhead. 1998. Bilateral symmetry and social dominance in captive male red-winged blackbirds. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42: 71-76.
- Estrades, A. 2002. Primeras observaciones de placas dérmicas supernumerarias para *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) en Uruguay. *Boletín de la Sociedad de Zoología de Uruguay* 13: 25-28.
- Ewert, M.A. 1979. The embryo and its egg: development and natural history. In: Harless, M. y H. Morlock (Eds). *Turtles: perspectives and research*. New York. 333-413 pp.
- Gallant, N. y K. Teather. 2001. Differences in size, pigmentation, and fluctuating asymmetry in stressed and nonstressed northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Ecoscience* 8: 430-436.
- Hirth, F.H. 1997. Synopsis of the biological data on the green turtle *Chelonia mydas* (Linneaus 1758). Biological Report 97 (1). Fish and Wildlife Service U.S. 120 pp.
- Klingenberg, C.P. y G.S. McIntyre. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with procrustes methods. *Evolution* 52: 1363-1375.
- Klingenberg, C.P.; M. Barluenga y A. Meyer. 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56: 1909-1920.
- Lele, S. y J.T. Richtsmeier. 1991. Euclidean distance matrix analysis: a coordinate free approach to comparing biological forms using landmark data. *American Journal of Physical Anthropology* 98: 73-86.

- Limpus, C.J., J.D. Miller, C.J. Parmenter, D.Reimer, N. McLachlan y R. Webb. 1992. Migration of green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) turtles to and from eastern Australian rookeries. *Wildlife Research* 19: 347-358.
- Lutz, P.L. y J.A. Musick. 1997. *The biology of sea turtles*. CRC Press, Inc. U.S.A. 432 pp.
- Márquez, E. 2006. Sage: symmetry and asymmetry in geometric data. Ver. 1.0. <http://www-personal.umich.edu/~emarquez/morph/>.
- Mast, B.R. y J.L. Carr. 1989. Carapacial scute variation in Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempi*) hatchlings and juveniles. In: *Proceeding of the First International Symposium on Kemp's Ridley Sea Turtle Biology. Conservation and Management*. Texas A & M University Sea Grant College Program Galveston. 202-219 pp.
- Meylan, A.B. y P.A. Meylan. 2000. Introducción a la evolución, historias de vida y biología de las Tortugas marinas. En: Eckert, K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donely (Eds). 2000. *Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas*. Grupo especialista para la conservación en tortugas marinas UICN / CSE. Publicación No. 4 (Español). 265 pp.
- Moller, A.P. y A. Pomiankowski. 1993. Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Genetica* 89: 267-279.
- Mortimer, J.A. 1990. The influence of beach sand characteristics on the nesting behavior and clutch survival of green turtles (*C. mydas*). *Copeia* 3: 802-817.

- Myers, E.M; F.J. Janzen; D.C. Adams y J.K. Tucker. 2006. Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). *Evolution* 60: 563-572.
- Nishizawa, H., M. Asahara, N. Kamezaki y N. Arai. 2010. Differences in the skull morphology between juvenile and adult green turtles: implications for the ontogenetic diet shift. *Current Herpetology* 29: 97-101.
- Øxnevad, S.A.; E. Heibo y L.A. Vollestad. 2002. Is there a relationship between fluctuating asymmetry and reproductive investment in perch (*Perca fluviatilis*)? *Canadian Journal of Zoology* 80: 120-125.
- Özdemir, B. y O. Türkozan. 2006. Carapacial scute variation in green turtle, *Chelonia mydas* hatchlings in northern Cyprus. *Turkish Journal of Zoology* 30: 141-146
- Palmer, R. y C. Strobeck. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 17: 391-421.
- Palmer, R. y C. Strobeck. 1992. Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: implications of non-normal distribution and power of statistical test. *Acta Zoologica Fennica* 191: 57-72.
- Paquette, S.R. y F.J. Lapointe. 2007. The use of shell morphometrics for the management of the endangered Malagasy radiated tortoise (*Geochelone radiata*). *Biological Conservation* 134: 31-39.
- Pritchard, P.C.H. y J.A. Mortimer. 2000. Taxonomía, morfología externa e identificación de las especies. En: Eckert, K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donely (Eds). 2000. Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas. Grupo especialista para la

- conservación en tortugas marinas UICN / CSE. Publicación No. 4 (Español). 265 pp.
- Reid, K.A., D. Margaritoulis y J.R. Speakman. 2009. Incubation temperature and energy expenditure during development in loggerhead sea turtle embryos. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 378: 62-68.
- Rivera, G. y J. Claude. 2008. Environmental media and shape asymmetry: a case study on turtle shells. *Biological Journal of the Linnean Society* 94: 483-489.
- Rohlf, F.J. 1990. Rotational fit (Procrustes) methods. In: Rohlf, F.J. and F. Bookstein (Eds). *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*. University of Michigan Museums of Zoology. Ann Arbor, Michigan. 227-236 pp.
- Rohlf, F.J. 2005. tpsDig: digitize landmarks and outlines. Ver. 2.04. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook, NY.
- Suganuma, H., K. Horikoshi y H. Tachikawa. 1994. Scute deviation of green turtle hatchlings from a hatchery in Ogasawara Islands, Japan. In: *Proceedings of the Fourteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-351. 148 pp.
- Türkozan, O., C. Ilgaz y S. Sak. 2001. Carapacial scute variation in Loggerhead turtles, *Caretta caretta*. *Zoology in the Middle East* 24: 137-142.
- Türkozan, O. y C. Yilmaz. 2007. Nest relocation as a conservation strategy: looking from a different perspective. *Marine Turtle Newsletter* 118: 6-8.

- Utayopas, P. 2001. Fluctuating asymmetry in the flying barb (*Esomus metallicus*), the striped croaking gourami (*Trichopsis vittatus*) and the three-spot gourami (*Trichogaster trichopterus*) when exposed to insecticide residues in the Lime Orchard. *Thammasat International Journal of Science and Technology* 6: 21-26.
- Valenzuela, N., D.C. Adams, R.M. Bowden y A.C. Gauger. 2004. Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: a powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. *Copeia* 4: 735-742.
- Van Buskirk, J. y L.B. Crowder. 1994. Life-history variation in marine turtles. *Copeia* 1: 66-81.
- Vam Dam, R.P. y C. Diez. 1998. Caribbean hawksbill turtle morphometrics. *Bulletin of Marine Science* 62: 145-155.
- Van Valen, L. 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16: 125-142.
- Wyneken, J. 2004. La anatomía de las tortugas marinas. U. S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 172 pp. (Versión en español de Wyneken, J. 2001. The Anatomy of Sea Turtles. U. S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, 172 pp.
- Zelditch, M.L., D.L. Swiderski, H.D. Sheets y W.L. Fink. 2004. Geometric morphometrics for biologist: a primer. Elsevier, New York. 437 pp.

CAPÍTULO II

PATERNIDAD MÚLTIPLE Y ADECUACIÓN DE *Chelonia mydas*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema de apareamiento

Las tortugas marinas presentan un sistema de apareamiento poliándrico. Este es un sistema en el cual una hembra se aparea con más de un macho durante el período de reproducción (lo que puede o no traducirse en paternidad múltiple) manteniendo de esta manera una mayor variabilidad genética en comparación con especies que presentan un sistema de apareamiento monógamo (Hoekert *et al.*, 2002).

El comportamiento poliándrico que presentan las tortugas marinas puede ser explicado de acuerdo con ciertas características biológicas de las mismas, como son: i) los machos no protegen un territorio, ii) no exhiben cuidado parental, iii) no hay monopolización de recursos que sean atractivos para las hembras (alimento, sitios de anidación, refugios), iv) no hay evidencia de un regalo nupcial, v) los machos únicamente ofrecen la cópula, la cual se presenta en función de la disponibilidad de machos para las hembras, la receptividad y el proceso de elección de los machos por parte de las hembras (Chassin, 2004; Zbinden *et al.*, 2007). Existe una hipótesis alterna que explica que el comportamiento poliándrico de las tortugas marinas es el resultado de la presión que ejercen los machos durante la cópula. En este escenario, la hembra cede a copular cuando su costo energético es menor que el de la resistencia (Lee y Hays, 2004).

En Michoacán durante la temporada de anidación (septiembre a enero de cada año) puede estudiarse la conducta reproductiva de *C.mydas* frente a las playas de anidación. Las hembras adultas se observan flotando en la superficie por largos períodos en los que se van agregando varios machos adultos, hasta que uno tiene acceso a la cópula. A los machos que acompañan a una mancuerna (pareja copulando) se les denomina satélite y se encuentran cerca de la pareja compitiendo por el acceso a la cópula e interfiriendo con los que se encuentran en la mancuerna para intentar desplazarlos (Martínez, 2003). Se han registrado hasta diez machos cortejando una hembra hasta que uno de ellos logra la cópula (Martínez, 2003), aunque puede haber hasta cuarenta (Figuroa com. pers.).

Los machos satélite realizan conductas de interrupción de la mancuerna, como morder las aletas tanto a los machos como a las hembras que están copulando, nadar alrededor y por debajo de la mancuerna, intentan desmontar al macho de la mancuerna y tiene enfrentamientos con el macho que se encuentra montado en la hembra (Martínez, 2003). Este proceso puede prolongarse por más de 50 minutos, con una relación inversa entre el número de machos involucrados en el cortejo y la duración de la cópula (Martínez, 2003).

Para el género *Chelonia* se han observado diferentes pautas de cortejo y apareamiento (Alvarado y Figuroa, 1991; Martínez, 2003), que se pueden sintetizar en cuatro grandes actividades:

- I. Búsqueda y detección de hembras: el macho nada superficialmente buscando una hembra para cortejar, la aproximación inicial del macho se realiza por lo general bajo el agua.

- II. Contacto visual hembra-macho: al inicio del cortejo se da una aproximación entre macho y hembra encarándose, el macho se sumerge y tras unos segundos reaparece de frente a la hembra. Posteriormente el macho nada superficialmente en torno a la hembra tratando de colocarse en la parte posterior para realizar la monta. En algunos casos la hembra se sumerge antes de que el macho reaparezca como forma de rechazo de la cópula.
- III. Contacto físico con la hembra: en ocasiones el macho nada por debajo de la hembra tocando el plastrón con el caparazón tratando quizá de establecer la condición de reproducción de la hembra; si la hembra continua encarándolo tras varias vueltas el macho acepta el rechazo y se retira. En ocasiones el macho intenta montar a la hembra de frente, la cual adopta una posición vertical de rechazo, a la cual el macho por lo general desiste tras el primer intento. En ocasiones si la hembra no cede el macho le muerde las aletas y el cuello para estimularla sexualmente.
- IV. Monta y penetración: la hembra y el macho salen a la superficie colocándose el macho sobre la región dorsal del caparazón de la hembra en la misma dirección sujetándose a la hembra con la uña que presentan en cada una de las aletas anteriores. Cuando se presenta únicamente un macho al momento del cortejo la mancuerna se mantiene hasta 54 minutos y conforme aumenta el número de machos el tiempo de mancuerna se reduce (Martinez, 2003).

En la población de *C. mydas* que anida en Michoacán, una vez llevada a cabo la cópula, las hembras salen a las playas de anidación a ovipositar un promedio de 65 huevos por nido (intervalo de 1 a 130), con un promedio de tres nidos por temporada (intervalo de uno a nueve), con un período inter-anidatorio de 12 a 14 días, durante el cual puede observarse a las hembras copulando. Tienen un período de remigración entre áreas de alimentación y áreas de reproducción de tres años en promedio (intervalo de uno a cinco años) (Alvarado y Figueroa, 1990; 1992). La incubación óptima de los huevos ocurre entre los 30 y 32°C y con cada grado de diferencia, se acelera o se retarda dos o tres días el momento en el que ocurre la eclosión. La eclosión de las crías ocurre entre 48 y 55 días después de la oviposición, a continuación adoptan un hábitat epipelágico hasta alcanzar el estadio juvenil. Una vez alcanzado este estadio, migran hacia las áreas de alimentación donde permanecerán hasta alcanzar la madurez sexual. Al intervalo de tiempo, entre el estadio juvenil y el adulto se le conoce como el “año perdido”, debido a la falta de información que se tiene al respecto (Figura 1). Se tiene documentado que los ejemplares de *C. mydas* que anidan en las costas de Michoacán realizan migraciones hacia áreas de alimentación localizadas en el Golfo de California y Costa Rica (Alvarado y Figueroa, 1991; Márquez, 1996; Seminoff *et al.*, 2002).

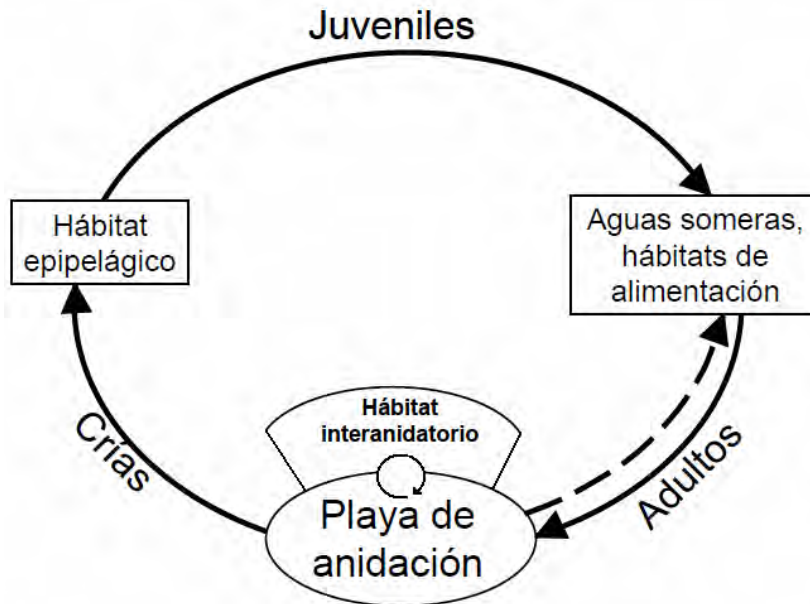


Figura 1. Ciclo de vida generalizado de la tortuga marina *Chelonia mydas* (Tomado de Chassin, 2004).

En tortugas marinas, la frecuencia de apareamientos múltiples puede variar entre las especies e incluso dentro de las poblaciones de la misma especie dependiendo de las condiciones ecológicas de cada localidad (anidación en arribada en contraste con anidación en solitario) donde la densidad poblacional juega un papel importante en la frecuencia de paternidad múltiple (Jensen *et al.*, 2006). La paternidad múltiple también puede verse influenciada por factores tales como el comportamiento de apareamiento, el ciclo reproductivo, el tiempo en el cuál la hembra está receptiva, la habilidad de los machos de inseminar a las hembras no receptivas, el tamaño poblacional así como la proporción de sexos en el área de reproducción (Fitzsimmons, 1996). La anidación en arribada es una conducta de anidación masiva (cientos o incluso miles de hembras) y sincrónica que se observa en algunas poblaciones de tortuga golfina (*L. olivacea*) y de tortuga lora (*L.kempii*); mientras que la anidación en solitario se presenta en el

resto de las especies de tortugas marinas, es asincrónica y con menor densidad de hembras anidadoras (Jensen *et al.*, 2006).

En años recientes se ha investigado la incidencia de paternidad múltiple en tortugas marinas de las familias Cheloniidae y Dermochelyidae mediante el uso de microsatélites (Hoekert *et al.*, 2002) (Tabla 1). Los análisis de paternidad en nidos de tortuga marina pueden revelar aspectos fundamentales de la biología poblacional de las mismas. Algunos estudios sugieren que la paternidad múltiple puede ser afectada por procesos de selección postcopulatoria tales como: la elección femenina crítica y la competencia espermática (Pearse y Avise, 2001).

1.2 Análisis moleculares en estudios de paternidad

Actualmente muchos estudios sobre conservación biológica se basan en análisis genéticos, particularmente los marcadores moleculares de ADN. Entre estos marcadores destacan los microsatélites o “short-sequence tandem repeat” (SSRT, por sus siglas en inglés) (Aranguren-Méndez *et al.*, 2001). Debido a su alto polimorfismo, los microsatélites son considerados como los marcadores genéticos más adecuados para realizar análisis de variabilidad genética a nivel poblacional. Así como también análisis de paternidad y de relaciones de parentesco (Morera *et al.*, 1999).

Los microsatélites son segmentos cortos de ADN de 2 a 6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem y están flanqueados por secuencias conservadas. Los microsatélites se distribuyen aparentemente de forma aleatoria en el genoma de casi todos los seres vivos, tienen un número variable de copias que oscilan

entre 20 y 300 pb y que pocas veces incluyen más de 70 repeticiones (Tautz, 1989; Morera *et al.*, 1999).

Tabla 1. Algunos trabajos realizados sobre paternidad múltiple (PM) en tortugas marinas de las familias Cheloniidae y Dermochelyidae (modificada de Moore y Ball, 2002).

Especie	%PM (Nidos)	Localidad	Referencia
<i>Chelonia mydas</i>	3% (22)	Queensland, Australia	FitzSimmons, 1998
	100% (3)	Isla Ascención, Reino Unido	Ireland, 2003
	75% (16)	Michoacán, México	Chassin, 2004
	60% (18)	Isla Ascención, Reino Unido	Lee y Hays, 2004
	100% (2)	Michoacán, México	Lara-De La Cruz <i>et al.</i> 2010
	100% (5)	Michoacán, México	Nieto-Ortiz, 2010
	83% (6)	Michoacán, México	Este trabajo
<i>Caretta caretta</i>	33% (45)	Queensland, Australia	Harry y Briscoe, 1988
	33% (3)	Melbourne Beach, FL, USA	Bollmer <i>et al.</i> , 1999
	31% (70)	Melbourne Beach, FL, USA	Moore y Ball, 2002
	93% (15)	Zakynthos, Grecia	Zbinden <i>et al.</i> , 2007
<i>Dermochelys coriacea</i>	0% (4)	St. Croix, USVI	Dutton y Davis, 1998
	0% (4)	St. Croix, USVI	Dutton y Davis, 1998
	0% (2)	Guanacaste, Costa Rica	Rieder <i>et al.</i> , 1998
	10% (50)	Playa Grande, Costa Rica	Crim <i>et al.</i> , 2002
<i>Lepidochelys kempii</i>	56% (35)	Tamaulipas, México	Kichler <i>et al.</i> , 1999
<i>Lepidochelys olivacea</i>	25% (8)	Galibi, Suriname	Hoekert <i>et al.</i> , 2000
	20% (10)	Galibi, Suriname	Hoekert <i>et al.</i> , 2002
	100% (4)	Oaxaca, México	Cortés, 2006
	92% (13) y 30% (13)	Ostional y Playa Hermosa, Costa Rica	Jensen <i>et al.</i> , 2006
<i>Natator depressus</i>	67% (9)	Queensland, Australia	Theissingner <i>et al.</i> 2009

La mayoría de los microsatélites que han sido encontrados en eucariontes están representados por repeticiones de mononucleótidos (e. g. A) y dinucleótidos (e. g. AC) y se localizan frecuentemente en zonas intergénicas e intrones (Gabor *et al.*, 2000).

Por lo mencionado anteriormente, no tienen alta incidencia en la codificación de la síntesis proteica pero sí participan en otras funciones como la organización de los cromosomas; la regulación de procesos como la recombinación, replicación y ciclo celular, así como en la regulación de la actividad génica en la transcripción y traducción. Algunos estudios sugieren que el cáncer y otras enfermedades genéticas son producto de la inestabilidad que presentan los microsatélites (Goldstein y Schlotterer, 1999).

Una ventaja que tienen los microsatélites sobre otros como los RFLP y los RAPD, radica en que son abundantes y están distribuidos regularmente en el genoma, se heredan de forma codominante, poseen alto polimorfismo, presentan herencia mendeliana simple y son fáciles de detectar mediante amplificación por PCR (Cheng y Crittenden, 1994).

FitzSimmons y colaboradores (1995) realizaron un trabajo para determinar los loci de microsatélites que pudieran encontrarse en especies de tortugas marinas teniendo como base que el uso de las secuencias de microsatélites en varias especies depende de la conservación de sitios cebadores dentro de las secuencias que las flanquean, las cuales facilitan la amplificación y se mantienen en arreglos repetidos suficientemente largos para promover polimorfismo. Estos

autores llegaron a la conclusión de que estos loci se han conservado en las tortugas marinas durante más de 300 millones de años de evolución. Actualmente ya se cuenta con varios pares de oligonucleótidos para el estudio de loci de microsatélites de especies de ambas familias de tortugas marinas (FitzSimmons *et al.*, 1995; Kichler *et al.*, 1999; Crim *et al.*, 2002; Aggarwal *et al.*, 2004) que se han empleado principalmente para la determinación de la frecuencia de paternidad múltiple (Tabla 1).

1.3 Anatomía genitourinaria

El sistema genitourinario de las tortugas marinas se conforma por los riñones, los uréteres, las gónadas y sus conductos, la vejiga urinaria y los derivados de la papila genital (pene o clítoris) en el piso de la cloaca. Las gónadas (ovarios o testículos) son las estructuras reproductoras que producen gametos, y sus conductos transmiten los huevos o los espermatozoides a la cloaca (Figura 2) (Wyneken, 2004).

Las gónadas en ambos sexos se sitúan de manera dorsal en la cavidad corporal, posterior a los pulmones y ventral a los riñones y a la pared peritoneal. El tracto reproductor de las hembras se compone de un par de ovarios y oviductos (también llamados conductos de Müller). El ovario y el oviducto cambian en tamaño y composición tanto con la edad como entre las temporadas reproductivas y no-reproductivas (Wyneken, 2004).

El oviducto en tortugas inmaduras es un tubo de paredes delgadas. A medida que las hembras van madurando, las paredes se vuelven más gruesas y el lumen crece en diámetro. Cuando el oviducto está inactivo, tiene apariencia de

estar doblado por toda su longitud. El oviducto puede describirse funcionalmente (pero no estructuralmente) en cinco regiones: ostium (abertura con forma de embudo que recibe los folículos liberados por el ovario, es aplanado cuando está inactivo y se encuentra en la parte proximal del oviducto), segmento no-glandular, mágnium, glándula de calcificación y vagina. El ostium tiene paredes delgadas por toda la vida de la tortuga pero crece en tamaño (Figura 3) (Wyneken, 2004).

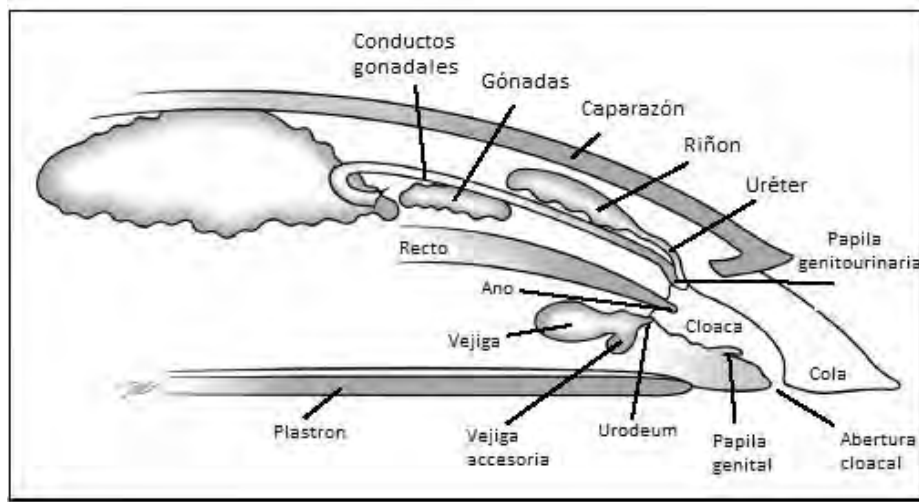


Figura 2. Diagrama del sistema genitourinario de tortuga marina (tomado de Wyneken, 2004).

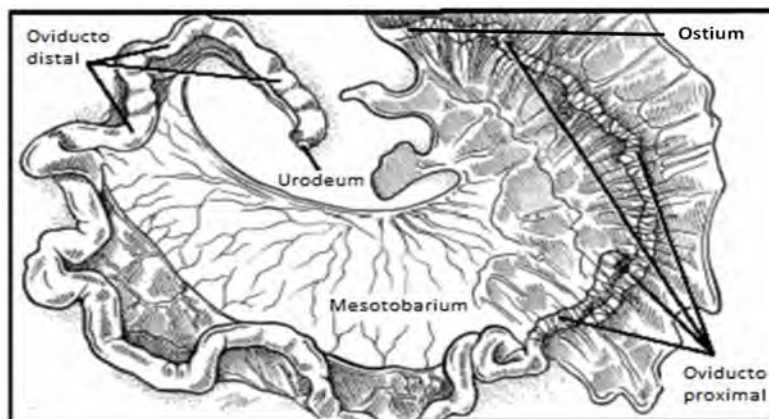


Figura 3. Oviducto maduro de una tortuga marina (tomado de Wyneken, 2004).

El oviducto de las hembras maduras es musculoso y móvil. Se asume que el ostium migra a lo largo de la superficie del ovario, colectando los folículos ovulados. Durante la preparación para anidar, una postura entera de folículos maduran y son ovulados en conjunto. Una vez que llegan al ostium, cada folículo pasa por el segmento no-glandular y entra al mágnium (región glandular anterior) donde se une con los gametos masculinos y recibe las capas de albúmina. Al cabo de aproximadamente tres días, los folículos pasan a la glándula de calcificación donde se secreta la capa de proteína y carbohidratos (corión) y la matriz de aragonita de la cáscara. El proceso de calcificación dura entre seis y siete días. De este modo, los huevos pasan a la vagina, donde permanecerán hasta su deposición varios días más tarde. Durante el desove, el oviducto posterior deja pasar los huevos a la cloaca, de donde caen al nido. En tortugas que están anidando la cloaca forma un orificio tubular (Wyneken, 2004).

1.4 Almacenamiento de semen y paternidad múltiple

El almacenamiento de semen se define como la retención de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo por largos períodos de tiempo. Las aves y los reptiles son los dos grupos de vertebrados que particularmente muestran altas frecuencias de almacenamiento de semen. La duración del almacenamiento de semen en los reptiles es muy variable, pero en comparación con las aves, puede ser un poco más prolongada. En aves fluctúa entre 6 y 42 días; mientras que para algunos reptiles como la lagartija *Uta stansburiana* (Cuellar, 1966 en Gist y Congdon, 1998) y la serpiente *Acrochordas javanicus* se ha estimado que es de tres meses y siete años, respectivamente (Cuellar, 1966 y

Mangusson, 1979 en Gist y Congdon, 1998). Existe poca evidencia documentada sobre la importancia que tiene el almacenamiento de semen en la reproducción de los reptiles. (Gist y Congdon, 1998).

Birkhead y Mollar (1993) sugieren que el almacenamiento de semen es obligatorio para aquellas especies que presentan ciclos reproductivos asincrónicos en machos y hembras, lo que les permite que la cópula sea asincrónica con la fertilización. El almacenamiento de semen también puede ser una ventaja debido a que extiende el período reproductivo en las hembras, así como también contribuye a la competencia espermática (el encuentro del semen de 2 ó más machos dentro del tracto reproductor de la hembra) y/o a la paternidad múltiple dentro de una misma progenie (fertilización de los huevos de un mismo nido en una temporada reproductiva por gametos de dos o más machos). Se sugiere que también disminuye el riesgo de depredación reduciendo la frecuencia de cópula y que además garantiza la fertilización en caso de no encontrar pareja para aparearse debido a una baja densidad poblacional.

Se sabe que las tortugas marinas tienen la capacidad potencial de almacenar semen en sus oviductos en la región conocida como mágnium, así como en las zonas aglandulares de la porción inicial del oviducto, donde tiene lugar la fecundación. A la fecha no se ha documentado que hembras de tortugas marinas almacenen semen entre distintas temporadas reproductivas pero se sugiere que almacenan sólo el de una temporada de anidación (Lutz y Musick, 1997; Chassin, 2004).

A pesar de que en el tracto reproductivo no se han observado túbulos para el almacenamiento de semen, como ocurre en el caso de tortugas dulceacuícolas, hay evidencias que sugieren que sí ocurre en la tortuga verde (*C. mydas*), la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) y la tortuga golfinia (*L. olivacea*) (Gist y Congdon, 1998, Pearse y Avise, 2001; Chaves *et al.*, 2000; Chassin, 2004).

A partir de un análisis de paternidad múltiple de dos nidos de *C. mydas*, de la localidad de Colola, Michoacán, se plantea que no se presenta evidencia de estructuras anatómicas o funcionales en el oviducto, que permitan el almacenamiento de semen en distintos segmentos e impidan la mezcla del semen de los machos involucrados en la cópula (Lara-De La Cruz *et al.*, 2010).

La paternidad múltiple está ampliamente distribuida en reptiles, sin embargo las causas y factores que determinan su presencia y variación aún no están bien entendidas. Además la paternidad es un componente importante del sistema de apareamiento genético y puede brindar una visión del sistema de apareamiento social de las especies (Refsnider, 2009).

De acuerdo con Soulé (1980) la diversidad genética puede afectar la capacidad de adaptación de las poblaciones; por lo tanto, la presencia o la ausencia de paternidad múltiple tiene implicaciones importantes para la conservación de las tortugas marinas, ya que podría afectar los niveles de variación genética de cada nidada. Es decir, se esperaría que a mayor frecuencia de paternidad múltiple mayor sería la diversidad genética de la progenie.

Debido a la variación en la frecuencia de paternidad múltiple se ha intentado establecer su importancia en términos de adecuación. Lee y Hays, (2004) plantean que no existe relación positiva entre la frecuencia de paternidad múltiple de un nido y la capacidad reproductiva de las hembras evaluada con el tamaño de nidada, porcentaje de eclosión y porcentaje de supervivencia de la progenie.

Por su parte, Zbinden y colaboradores (2007) realizaron un estudio con tortuga caguama (*C. caretta*) y concluyeron que existe una correlación positiva entre el número de machos involucrados en la fertilización de un nido y el tamaño de la hembra.

Actualmente se desconoce el por qué de la variación en la frecuencia de paternidad múltiple y su relación con la adecuación principalmente en las crías. Sin embargo, se puede proponer que por la inversión energética que se destina a la reproducción es poco probable que la frecuencia de paternidad múltiple sea un proceso determinado por azar. Una manera de demostrar esta idea es evaluando ventajas y desventajas en las progenes de nidos con distintos niveles de paternidad múltiple, por medio de un análisis minucioso de medidas indirectas de adecuación entre crías (e.g. peso, longitud, simetría, velocidad de incorporación).

1.5 Estimadores indirectos de adecuación

Estimar la adecuación de las tortugas marinas, en alguno de sus dos componentes (éxito reproductivo y supervivencia), es complicado debido al tiempo

generacional tan largo. Sin embargo, es posible hacer aproximaciones indirectas en crías y adultos a partir de parámetros como: tamaño, peso, vigor y simetría.

Dufour y Weatherhead (1998) realizaron un trabajo con aves y sugieren que la simetría podría ser un indicador confiable de la calidad fenotípica y tal vez genotípica, y que la simetría podría ser un aspecto importante a considerar en la selección sexual. Varios estudios han descrito una correlación positiva entre simetría individual y componentes de adecuación como la sobrevivencia, fecundidad, crecimiento y apareamiento. Un tipo particular de asimetría, la asimetría fluctuante, ha sido reconocida como herramienta importante en la investigación con animales y en la conservación, tanto a nivel individual o de población (Oxnevad *et al.*, 2002; Davis y Grosse, 2008).

La habilidad de incorporación sobre su propio caparazón, es un comportamiento de las crías de tortugas acuáticas que puede estar relacionado con su supervivencia, debido a que puede incrementar considerablemente su exposición a los depredadores o a la deshidratación. Por lo tanto es un componente importante de adecuación de las mismas (Delmas *et al.* 2007).

Delmas y colaboradores (2007) proponen que la humedad y temperatura en el período de incubación, tamaño e identidad materna afectan esta capacidad de incorporación. En general se asume que el funcionamiento locomotor refleja en cierta manera la adecuación o el desempeño individual de los organismos.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Evaluar el efecto de la paternidad múltiple sobre la adecuación de las hembras y la progenie de la tortuga verde (*C. mydas*) de la costa michoacana.

2.2 Particulares

1. Evaluar la frecuencia de paternidad múltiple de *C. mydas* y su impacto sobre la capacidad reproductiva de las hembras.
2. Establecer la relación entre la frecuencia de paternidad múltiple y los siguientes estimadores indirectos de adecuación de la progenie: tamaño, velocidad de incorporación, peso y simetría.
3. Inferir la presencia de estructuras morfológicas o funcionales que permitan la elección crítica a partir del patrón de fertilización en nidos con paternidad múltiple de *C. mydas*.

3. HIPÓTESIS

El presente trabajo considera tres hipótesis:

1. La variación en la frecuencia de paternidad múltiple no tiene efecto sobre la capacidad reproductiva de las hembras de *C. mydas*, por lo que no se encontrará relación entre la frecuencia de paternidad múltiple y el tamaño de nido y/o porcentaje de eclosión.

2. Con la presencia de paternidad múltiple se espera que exista una relación directa entre el número de progenitores involucrados en fertilizar una progenie y la variación de la misma en valores de estimadores indirectos de adecuación.
3. Un patrón de fertilización ordenado en la progenie evidencia que las hembras tienen estructuras morfológicas o funcionales que les permiten el almacenamiento de semen, sin mezclarse, de los distintos machos involucrados en la cópula.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Trabajo de Campo

Para el desarrollo de este trabajo se contó con un permiso de colecta científica expedido por la Dirección General De Vida Silvestre INE SEMARNAT el día 06 de agosto de 2008 (Oficio Núm. SGPA / DGVS / 05134/08).

El trabajo de campo tuvo lugar durante los meses de septiembre a noviembre de 2008, en la playa de Maruata, Michoacán. Se realizaron recorridos nocturnos a lo largo de la playa, colectándose nidos completos de seis hembras anidadoras. Los huevos colectados fueron transportados y sembrados en vivero conservando el orden en que fueron depositados por la hembra y siguiendo las recomendaciones de Mortimer (2000).

De seis hembras se tomó muestra de sangre para análisis genéticos. Se registró el largo curvo del caparazón (LCC), así como el tamaño de nidada y porcentaje de eclosión de cada nido, para analizar si existe relación entre el número de machos que fertilizan un nido y la capacidad reproductiva de las hembras.

Se incrementó el muestreo con muestras de sangre de otras 39 hembras anidadoras distintas para realizar un análisis de distribución de frecuencias alélicas de la población. Las muestras de sangre se colectaron siguiendo el protocolo descrito por Owens y Ruiz (1980), el cual no compromete la integridad de los individuos. De estos ejemplares se colectaron entre 500 y 1000 μ l de sangre empleando una jeringa estéril de 5ml con aguja de 18-2 x 38mm. La sangre fue colocada en viales de plástico de 1.5ml y suspendida en una solución

amortiguadora lítica (100mM Tris-HCl (pH 8), 100mM EDTA (pH8), 10mM NaCl, 2% SDS; Dutton, 1997), la cual permite el almacén de las muestras por un período de seis meses a temperatura ambiente sin degradación del ADN. En el laboratorio las muestras se almacenaron a -70°C para su posterior análisis.

Para la colecta de las muestras en las crías se siguió el protocolo arriba mencionado. De cada cría se tomaron de 5 a 20 µl de sangre de las crías. Además de los ejemplares que se encontraron muertos, se colectaron fragmentos de tejido (piel o músculo) de aproximadamente 0.5 g y se preservaron en una solución saturada sal-DMSO en un volumen que cubriera toda la muestra (Dutton, 1997).

De las crías vivas se obtuvieron los siguientes datos como estimadores de vigor: peso (balanza granataria, precisión 0.0001g), tiempo de incorporación (las crías se colocaron dorsalmente y se midió con cronómetro el tiempo que tardaron en voltearse boca abajo), cada ejemplar fue fotografiado (cámara digital Sony, 7.2 megapíxeles, zoom óptico 3x) para el posterior análisis de morfometría geométrica, simetría y conteo de escudos.

4.2 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo de extracción de ADN modificado de Leford y Douglas (1999). De acuerdo a este protocolo se colocaron 50 µl de sangre de cada muestra en un vial de 1.5 ml de capacidad. Se añadieron 160 µl de solución CTAB (1ml Tris-HCl 1M, 4.5 ml agua destilada, 200 mg CTAB, 2.8 ml NaCl 5 M, 400 mg PVP-40, 50 mg ácido ascórbico, 50 mg DIECA, 100 µl 2-Mercaptoetanol) se mezcló en vortex durante diez segundos. Se añadieron 400 µl

de solución Della Porta (1 ml Tris 1M, 1 ml EDTA 0.5 M, 1 ml NaCl 5 M, 6.9 ml agua destilada, 100 µl 2-Mercaptoetanol) se agitó en un vortex por diez segundos. Se añadieron 100 µl de SDS al 20%, se agitó en vortex durante diez segundos hasta obtener una consistencia homogénea y líquida. Se incubó en baño maría a 65 °C durante treinta minutos en agitación. Se centrifugó durante cinco minutos a 12,000 rpm, se transfirió el sobrenadante a viales nuevos. Se añadieron 500 µl de fenol equilibrado a pH 8, se agitó en vortex durante diez segundos, se centrifugó diez minutos a 12,000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a viales nuevos, se añadieron 500 µl de cloroformo, se agitó en vortex diez segundos y se centrifugó diez minutos a 12,000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a viales nuevos, se añadieron 600 µl de isopropanol a -2°C, se agitó suavemente por inversión y se incubó a -20°C durante dos horas o toda la noche. Se centrifugó durante diez minutos a 12,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se secó la pastilla de ADN durante treinta minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla de ADN en 10 µl de agua desionizada estéril. Se tomaron 2 µl de ADN y se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, finalmente se visualizó la presencia del ADN en un transiluminador de luz ultravioleta.

4.3 Amplificación de regiones microsatélite

Se realizó la amplificación de tres loci de microsatélite con la técnica de PCR Multiplex. Los oligonucleótidos utilizados fueron: CM84 y CM3 diseñados para la tortuga verde (*C. mydas*); CC117 diseñado para la tortuga caguama (*Caretta caretta*); (FitzSimmons *et al.*, 1995; Fitzsimmons, 1997) (Tabla 2).

Las reacciones de amplificación tuvieron un volumen final de 5 μ l y se realizaron en un termociclador “GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)”. Las concentraciones de los reactivos utilizados fueron las siguientes: QIAGEN PCR Master Mix 1X, primer mix 0.2 μ M y ADN 20 – 200 ng.

El ciclo de PCR usado para la amplificación de los loci de microsatélite consistió en: (1) 95 °C por 15 minutos, (2) 94°C por 30 segundos, (3) 57°C por 90 segundos, (4) 60 °C por 60 segundos y (5) 72 °C por 30 minutos (del paso 2 al 4 se repite 40 veces).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de microsatélites.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Tamaño (bp)	Fluoróforo
CM84	TgTTTTgACATTAgTCCAggATTg ATTgTTATAgCCTATTgTTCaggA	319- 355	VIC (Verde)
CM3	AATACTACCATgAgATgggATgTg ATTCTTTTCTCCATAAAACAaggCC	138-202	VIC (Verde)
CC117	TCTTTAACgTATCTCCTgTAgCTC CAgTAgTgTCAgTTCATTgTTTCA	228-266	PET (Rojo)

Para evaluar la eficiencia de la amplificación se corrieron 2 μ l del producto de PCR en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron bajo un transiluminador de luz ultravioleta. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder para referenciar el tamaño de los fragmentos amplificados.

4.4 Obtención de Genotipos

La electroforesis para separar los fragmentos amplificados se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer utilizando el software 310 Data Collection versión 3.1.0 (Applied Biosystems).

Los electroferogramas obtenidos se analizaron con el software Peak Scanner (Applied Biosystems). Con este programa se puede identificar el tamaño de cada loci por medio de picos de cada uno de los alelos (materno y paterno) de la progenie.

Para la inferencia de los genotipos paternos, así como para establecer el valor de la probabilidad de detección de paternidad múltiple, se empleó el programa GERUD 2.0 (Jones, 2005) que permite determinar el número mínimo de machos que contribuyen en la progenie, así como reconstruir los genotipos paternos basándose en la distribución de frecuencias alélicas por locus de marcadores codominantes polimórficos.

4.5 Morfometría geométrica, Asimetría Fluctuante y Escudos supernumerarios

Los análisis de morfometría geométrica, asimetría fluctuante y escudos supernumerarios se realizaron con los métodos descritos en el capítulo I de este documento.

4.6 Análisis estadísticos

Los análisis de varianza, de variables canónicas así como de correlaciones lineales se realizaron con el software JMP 6.0 (SAS Institute).

5. RESULTADOS

5.1 Extracción de ADN y PCR de loci de microsatélite

Se realizó la extracción satisfactoria de ADN total de 45 muestras de hembras anidadoras y 348 muestras de crías de seis nidos (sangre y tejido). De estas últimas, se obtuvo el genotipo con 3 loci para 22 crías en promedio de seis nidos (rango = 12-34) (Figura 4).

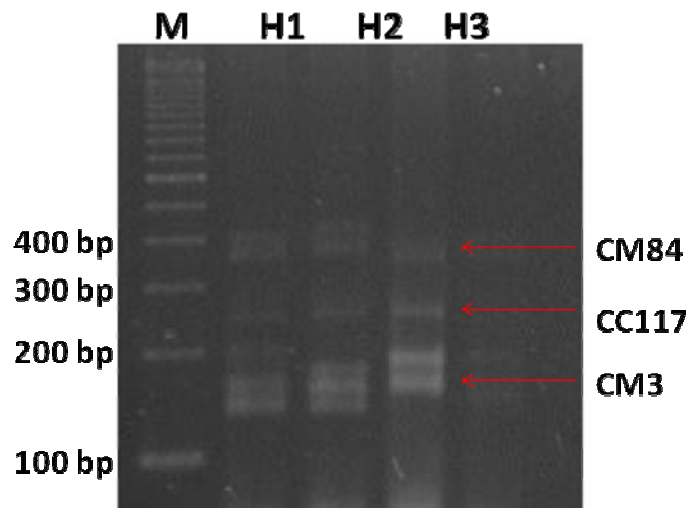


Figura 4. Amplificación de microsatélites de muestras de hembras anidadoras con la técnica de PCR Multiplex.

5.2 Frecuencias alélicas y paternidad múltiple

Se encontró que los tres loci de microsatélite utilizados en este trabajo son altamente polimórficos (Tablas 3 y 4, Figura 5) para las muestras aquí analizadas.

Tabla 3. Alelos encontrados por loci de microsatélite y valores de heterocigidad observada (Ho) y esperada (He), n = tamaño de muestra hembras adultas.

Locus	N	Alelos	Ho	He
CM3	45	12	0.95	0.85
CM84	29	14	0.86	0.87
CC117	21	10	0.66	0.80
Promedio			0.82	0.84

Tabla 4. Alelos encontrados por loci de microsatélite y valores de heterocigidad observada (Ho) y esperada (He), n = tamaño de muestra genotipos paternos.

Locus	N	Alelos	Ho	He
CM3	22	17	0.81	0.91
CM84	22	17	0.72	0.87
CC117	22	10	0.66	0.80
Promedio			0.73	0.86

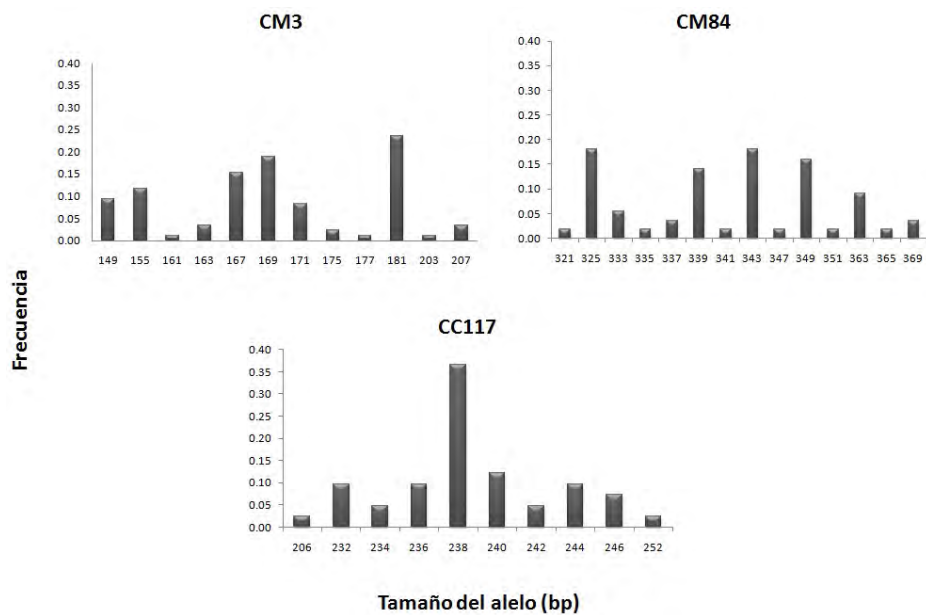


Figura 5. Frecuencias alélicas de hembras adultas para 3 microsatélites en la tortuga verde (*Chelonia mydas*) de la playa de Maruata, Michoacán. El número de individuos muestreados por locus fue: $n = 29$ (CM84), $n = 45$ (CM3), y $n = 21$ (CC117).

Los valores de detección de paternidad múltiple para cada locus y para genotipos multiloci analizados se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores de probabilidad de detección de paternidad múltiple (PM) para cada locus y para todos.

Locus	Detección de PM
CM3	0.7077
CM84	0.7401
CC117	0.6536
Todos	0.9754

De los seis nidos analizados, cinco de ellos presentan paternidad múltiple (83%). Los resultados muestran que los nidos fueron fertilizados por uno, tres, cuatro y cinco machos, sin que se detectara un orden de fertilización específico en el tracto reproductivo. En algunos de los nidos con paternidad múltiple se encontró que un macho fertiliza la mayor parte de la progenie (Figura 6).

Se encontraron en total 22 genotipos paternos (promedio = 3 genotipos paternos por nido, intervalo = 1-5). No se encontró evidencia de genotipos paternos compartidos en nidos de las seis hembras (Figura 6, Tablas 6 y 7).

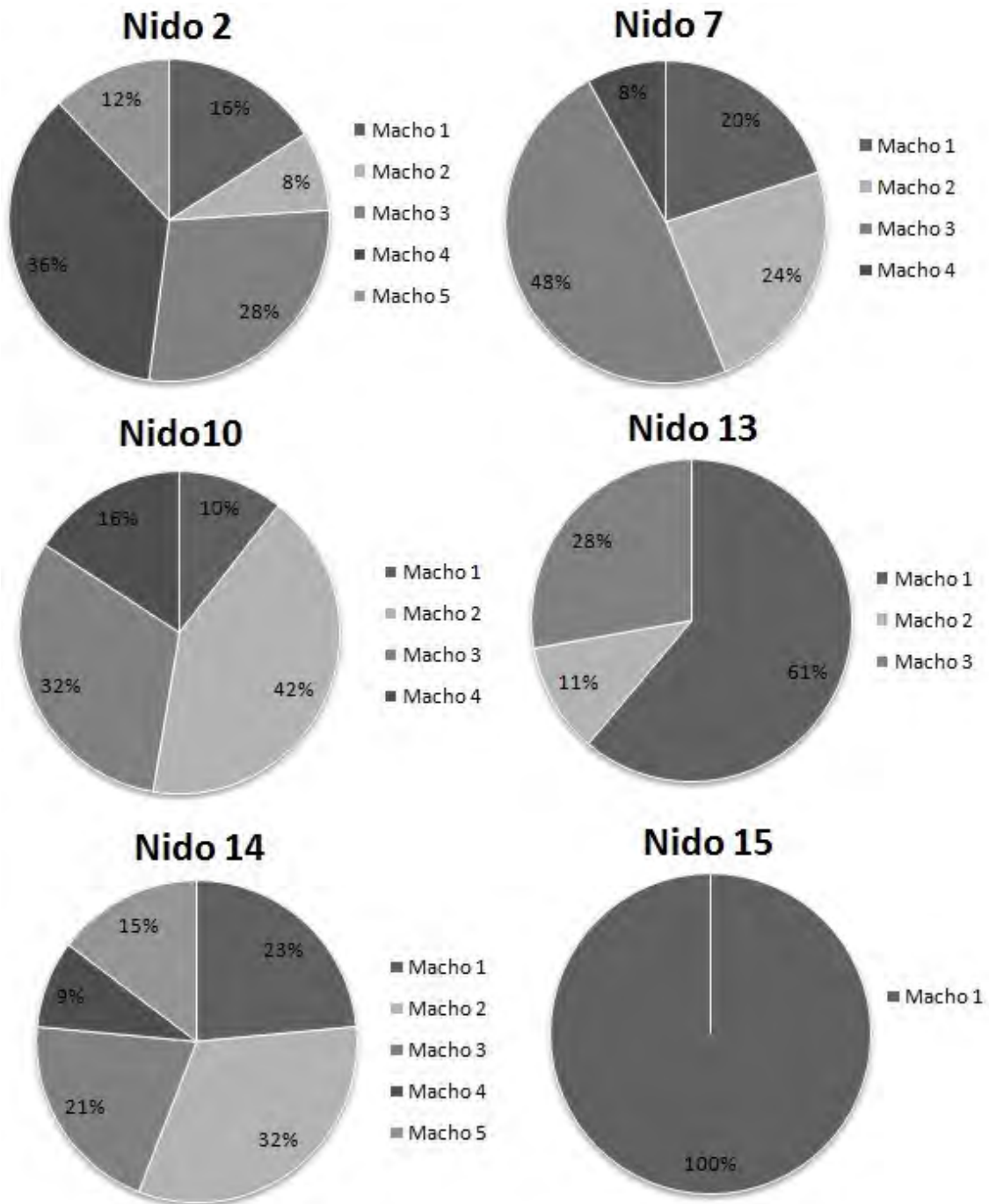


Figura 6. Nidos analizados de la localidad de Maruata, Michoacán, se puede observar el porcentaje de la progenie que correspondiente a cada macho. Los distintos tonos de gris de cada gráfica son excluyentes y no corresponden a los mismos machos.

Tabla 6. Genotipos parentales inferidos a partir de loci de microsatélite. Se presenta el número de machos involucrados en la fertilización de los nidos (el número asignado a cada macho es independiente en cada nido) así como su respectivo número de crías.

Nido		Genotipo			No. Crías
		CM84	CM3	CC117	
2	♀	349/369	169/181	240/240	
	♂1	325/325	177/183	240/240	4
	♂2	325/325	173/205	232/244	2
	♂3	325/349	169/201	232/240	7
	♂4	323/325	179/201	232/236	9
	♂5	323/353	181/201	240/240	3
7	♀	335/343	169/177	240/240	
	♂1	357/361	155/177	240/256	5
	♂2	335/355	153/155	236/240	6
	♂3	327/335	155/177	234/236	12
	♂4	325/355	155/175	236/242	2
10	♀	343/365	167/187	238/242	
	♂1	343/343	167/183	238/242	2
	♂2	343/365	175/175	238/238	8
	♂3	343/349	171/177	238/242	6
	♂4	343/349	167/167	238/252	3
13	♀	325/363	143/167	238/238	
	♂1	335/345	177/177	238/244	11
	♂2	335/345	143/167	238/244	2
	♂3	345/345	143/167	244/246	5
14	♀	335/351	169/181	236/254	
	♂1	331/335	159/179	236/240	8
	♂2	351/351	147/187	236/240	11
	♂3	345/351	167/177	236/236	7
	♂4	333/343	181/181	234/256	3
	♂5	339/339	159/171	236/236	5
15	♀	337/339	179/179	232/238	
	♂1	337/347	167/181	232/238	12

Tabla 7. Datos de los nidos a los que se les realizó análisis de paternidad múltiple (PM), donde el índice de dominancia = no de crías del padre más común + no de crías del segundo padre más común / total de crías del nido. (Índice de dominancia tomado de Sivinski, 1984).

Nido	Total crías	No. Machos	Crías análisis PM (% analizado del nido)	% Crías Macho dominante (No. Crías)	Índice de dominancia (%)
2	63	5	25 (39.6)	36 (9)	64
7	46	4	25 (54.3)	48 (12)	72
10	67	4	19 (28.4)	42 (8)	78
13	90	3	18 (20)	61 (11)	88
14	73	5	34 (46.6)	32 (11)	55
15	60	1	12(20)	100 (12)	NP

Las Tablas 8 a la 13 muestran Los genotipos de las crías de los seis nidos analizados fueron asignados a partir de los tres loci de microsatelite mencionados anteriormente (tablas 8 a la 13). Los números de identificación de las crías son consecutivos, aquellos números que no se presentan en la tabla se debe a que no se logró la amplificación de los microsatélites. Los distintos tonos de gris representan distintos genotipos paternos en cada nido y no se observa que un mismo genotipo paterno participe en la fertilización de más de un nido. El número de cría menor de cada nido corresponde al primer huevo ovipositado por la hembra, y el número mayor, al último huevo.

La numeración de los nidos es la siguiente: nido 2, del 90 al 152; nido 7, del 427 al 472; nido 10, del 585 al 651; nido 13, del 702 al 791; nido 14, del 792 al 864; nido 15, del 865 al 924.

Tablas 8 y 9. Genotipos de las crías del nido 2 (cría 90 – 152) y del nido 7 (cría 427 – 472) respectivamente. Los distintos tonos de gris representan distintos genotipos paternos en los nidos.

Nido	Cría	Genotipo		
		CM84	CM3	CC117
Nido 2	92	325 /349	177 /181	240 /240
	95	325 /349	169 / 205	236 /240
	96	349 /349	169 / 201	240 / 240
	104	325 /349	169 / 179	232 /240
	105	325 /349	177 / 181	240 /240
	106	325 /349	169 /183	240 /240
	110	325 / 349	169 /205	236 /240
	111	349 /349	181 /201	240 /240
	113	323 /349	169 / 201	240 /240
	114	325 /349	169 /181	240 /240
	115	323 /349	169 / 181	240 /240
	119	325 /349	169 /181	232 /240
	120	325 /349	181 /205	236 /240
	121	325 /349	169 / 181	240 /240
	122	325 / 349	169 / 179	232 / 240
	126	325 /349	169 / 183	240 /240
	127	325 /349	173 /181	232 /240
	130	349 /349	169 / 201	240 /240
	132	325 /349	181 / 205	240 /240
	136	323 /349	181 / 205	236 /240
	138	349 /353	169 / 201	240 /240
143	325 /349	169 /181	232 /240	
148	325 /348	169 / 205	240 /240	
150	325 /348	181 / 205	236 / 240	
151	325 /348	171 / 181	236 / 240	

Nido	Cría	Genotipo		
		CM84	CM3	CC117
Nido 7	434	343 /357	155 /177	240 /240
	435	335 /335	169 /177	236 /240
	436	335 /335	155 /177	236 /240
	438	335 /335	155 /169	236 /140
	439	335 /335	155 /169	236 /240
	440	335 /335	169 /175	236 /240
	441	335 /335	155 /177	236 /240
	442	335 /335	155 /177	236 /240
	443	327 /335	155 /177	236 /240
	449	335 /357	155 /177	240 /240
	457	335 /357	155 /169	240 /256
	458	325 /335	155 /177	240 /242
	459	335 /335	155 /177	240 /240
	460	335 /335	155 /177	236 /240
	461	327 /335	155 /177	236 /240
	462	335 /335	155 /177	240 /240
	463	343 /357	169 /177	240 /256
	464	335 /361	155 /177	240 /240
	465	335 /343	153 /177	240 /240
	466	327 /335	155 /177	234 /240
	467	335 /335	155 /177	240 /240
468	335 /343	155 /169	240 /240	
470	327 /343	155 /177	236 /240	
471	335 /335	169 /177	236 /240	
472	335 /335	155 /169	240 /240	

Tablas 10 y 11. Genotipos de las crías del nido 10 (cría 585 – 651) y del nido 13 (cría 702 – 791) respectivamente. Los distintos tonos de gris representan distintos genotipos paternos en los nidos.

Nido	Cría	Genotipo		
		CM84	CM3	CC117
Nido 10	585	343 /343	171 /187	238 /238
	588	343 /343	171 /187	242 /242
	591	365 /365	175 /187	238 /238
	597	343 /343	175 /187	238 /238
	608	343 /349	171 /187	242 /242
	617	343 /343	171 /187	238 /242
	618	343 /365	175 /187	238 /238
	624	343 /343	167 /183	238 /243
	625	343 /365	167 /167	242 /252
	629	343 /343	167 /183	242 /242
	631	343 /343	175 /187	238 /242
	637	343 /343	175 /187	238 /242
	638	343 /349	167 / 167	238 /252
	640	349 /365	167 /167	238 /238
	641	343 /365	167 /175	238 /242
	644	343 /365	175 /187	238 /238
	647	343 /343	175 /187	238 /238
	648	343 /343	177 /187	242 /242
	650	343 /365	171 /187	238 /242

Nido	Cría	Genotipo		
		CM84	CM3	CC117
Nido 13	708	335 /363	167 /177	238 /238
	718	335 /363	167 /167	238 /244
	720	325 /345	143 /167	238 /238
	723	325 /345	167 /177	238 /244
	724	345 /363	167 /177	238 /244
	726	325 /345	167 /167	238 /244
	729	335 /363	167 /177	238 /244
	733	345 /363	167 /177	238 /244
	744	325 /345	143 /167	238 /246
	745	325 /345	167 /177	238 /238
	747	325 /345	143 /167	238 /238
	749	335 /363	167 /177	238 /244
	754	325 /345	143 /167	238 /244
	759	345 /363	167 /177	238 /244
	771	345 /363	167 /177	238 /244
	775	325 /345	167 /167	238 /246
	780	335 /363	167 /177	238 /244
	791	325 /335	167 /177	238 /244

Tablas 12 y 13. Genotipos de las crías del nido 14 (cría 792 – 864) y del nido 15 (cría 865 – 924) respectivamente. Los distintos tonos de gris representan distintos genotipos paternos en los nidos.

Nido	Cría	Genotipo		
		CM84	CM3	CC117
Nido 14	795	335 /351	147 /169	236 /240
	797	335 /335	147 /169	236 /240
	798	339 /351	157 /181	236 /256
	799	331 /335	169 /177	236 /236
	804	335 /339	147 /169	236 /236
	809	335 /343	171 /181	236 /262
	812	335 /351	147 / 169	236 /236
	814	333 /351	169 /181	236 /256
	816	351 / 351	147 /169	236 /236
	817	335 /342	169 /181	236 /254
	818	331 /351	159 /181	236 /236
	820	335 /351	169 /187	236 /240
	821	335 /351	177 /181	236 /236
	822	335 /345	167 /181	236 /236
	823	335 /351	159 /181	236 /236
	826	351 /351	147 /169	236 /240
	828	339 /251	171 / 181	236 /236
	831	351 /351	177 /181	232 /236
	832	335 /351	159 /181	236 /254
	833	335 /351	167 /181	236 /236
	834	335 /351	177 /181	236 /236
	835	335 /351	169 /179	236 /240
	837	335 /339	159 /181	236 /236
	838	335 /335	169 /179	236 /236
	839	331 /335	159 /181	236 /236
	840	331 /351	159 /181	236 /236
	843	339 /351	147 /169	236 /236
	844	331 /335	177 /181	236 /266
	845	331 /335	147 /169	236 /236
	848	335 /351	171 /181	236 /236
849	335 /339	169 /181	236 /236	
850	351 /351	169 /177	236 /236	
851	339 /351	171 /181	236 /254	
862	351 /351	147 /169	236 /236	

Nido	Cría	Genotipo		
		CM84	CM3	CC117
Nido 15	866	337 /347	167 / 179	232 /232
	868	337 / 337	167 / 179	232 /232
	870	337 / 347	167 /179	232 /232
	871	337 /337	179 /181	238 /238
	872	337 /337	167 / 179	232 /232
	881	337 / 339	167 /179	232 /238
	884	337 /347	167 / 179	232 /232
	885	337 /337	179 /181	232 /238
	886	337 /337	179 / 181	232 /238
	888	337 /337	179 /181	232 /238
	901	337 /337	167 /179	232 /232
	909	337 /337	167 / 179	232 /238

5.3 Medidas de adecuación en hembras adultas

Los valores de longitud corporal (LCC) y de adecuación de las hembras de los seis nidos analizados se presentan en la Tabla 14. No se encontró relación entre el número de machos que fertilizan un nido y la capacidad reproductiva de las hembras: tamaño nidada ($R^2= 0.00825$, $p = 0.9864$); porcentaje de eclosión ($R^2= 0.148912$, $p = 0.4499$) y tamaño de la hembra (LCC) ($R^2= 0.149321$, $p = 0.4492$) (Figura 7).

Tabla 14. Longitud curva del caparazón y valores de adecuación de hembras de *Chelonia mydas*

Hembra	LCC (cm)	Tamaño nidada	% Eclosión (crías)	No. de Machos
2	82	63	95.2 (60)	5
7	81	46	91.3 (42)	4
10	81.5	67	76.11 (51)	4
13	85	90	81.11 (73)	3
14	84	73	83.5 (61)	5
15	80	60	88.3 (53)	1

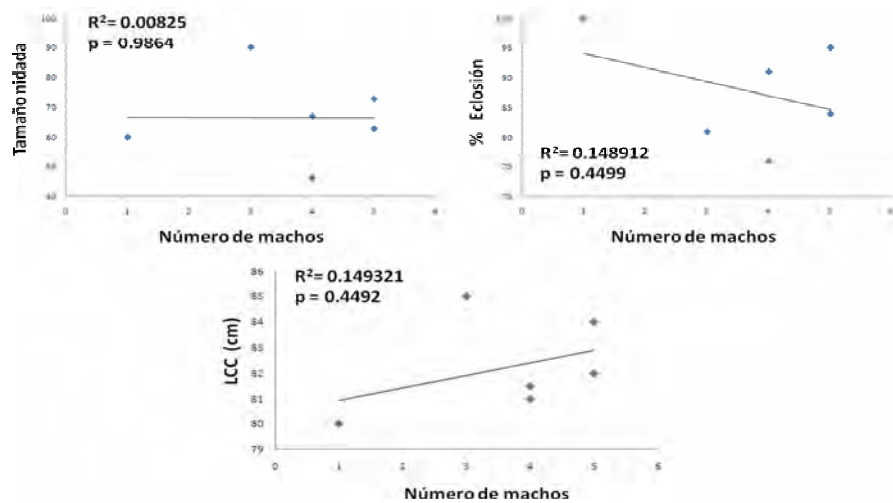


Figura 7. Relación de la paternidad múltiple y capacidad reproductiva de las hembras (tamaño nidada y porcentaje de eclosión y tamaño de la hembra).

5.4 Medidas indirectas de adecuación en crías

5.4.1 Peso

Las crías pesaron en promedio 21.75 g. (rango de 10.09 a 25.98 g). El ANOVA mostró que existen diferencias significativas entre el peso de las crías de los diferentes nidos ($F = 50.4352$, $p = < 0.001$). En el nido 14 se encontraron diferencias significativas al interior de los nidos, es decir, entre el peso de las crías de los diferentes machos, mientras que en el resto de los nidos no (Nido 2: $F = 0.9949$, $p = 0.4447$; Nido 7: $F = 0.7201$, $p = 0.5536$; Nido 10: $F = 0.3502$, $p = 0.7897$; Nido 13: $F = 0.5852$, $p = 0.5701$; Nido 14: $F = 0.289341$, $p = 0.05$).

Respecto al peso, el nido 14 (fertilizado por cinco machos) es el que tiene las crías más pesadas, seguido por las crías del nido 15 (fertilizado por un macho). Las crías menos pesadas son del nido 13 que presenta tres genotipos paternos. Analizando al interior de los nidos se observa que en el nido siete (con cuatro genotipos paternos), las crías más pesadas son del macho que fertiliza la mayor parte de la progenie, mientras que en el resto de los nidos con paternidad múltiple no es así.

5.4.2 Velocidad de incorporación

La velocidad de incorporación promedio fue de 5.8 s (rango de 1 a 49 s); aunque es importante mencionar que hubo 77 crías (10.4%) que después de un minuto no se incorporaron.

En la velocidad de incorporación de las crías de los diferentes nidos hubo diferencias significativas ($F = 2.3655$, $p = 0.05$). Sin embargo en los nidos con paternidad múltiple, no se encontraron diferencias significativas al interior de los

nidos, es decir, entre la velocidad de incorporación de las crías de los diferentes machos (Nido 2: $F = 0.5422$, $p = 0.7078$; Nido: 7 $F = 0.9217$, $p = 0.4515$; Nido 10: $F = 1.8714$, $p = 0.1903$; Nido 13: $F = 2.9776$, $p = 0.0837$; Nido 14: $F = 0.4990$, $p = 0.7366$).

En relación a la velocidad de incorporación, el nido 13 (fertilizado por tres machos), es el que tiene las crías más rápidas, seguido por el nido 14 (fertilizado por cinco machos); las crías más lentas son del nido 10 que presenta cuatro genotipos paternos. Analizando al interior de los nidos se observa que en los nidos 10 y 13, las crías más rápidas son del macho que fertiliza la mayor parte de la progenie, mientras que en el resto de los nidos con paternidad múltiple no es así. Respecto a las crías que después de un minuto no se incorporaron, sólo en el nido 10, se asocian a un genotipo paterno en específico; en el resto de los nidos estas crías se asocian a varios genotipos paternos. Sin embargo, en el nido 13 la mayoría de las crías que no se incorporaron, son del segundo macho que fertiliza la mayor parte de la progenie.

5.4.3 Tamaño (LRC)

El tamaño (LRC) de las crías promedio fue de 50.74mm (rango de 44.7 a 62.2 mm). Se encontró que existen diferencias significativas entre el tamaño de las crías de los diferentes nidos ($F = 25.4079$, $p = < 0.001$), siendo las más grandes, progenie de la hembra de mayor tamaño. Sin embargo en los nidos con paternidad múltiple, no se encontraron diferencias significativas al interior de los nidos, es decir, entre el tamaño de las crías de los diferentes machos (Nido 2: $F = 3.0569$,

$p = 0.0558$; Nido 7: $F = 0.9711$, $p = 0.4293$; Nido 10: $F = 0.5874$, $p = 0.6332$; Nido 13: $F = 0.1930$, $p = 0.8266$; Nido 14: $F = 1.6617$, $p = 0.1879$).

Acercas del tamaño, el nido 13 (fertilizado por tres machos), es el que tiene las más grandes, seguido por el nido 7 (fertilizado por cuatro machos); las crías más pequeñas corresponden al nido 2 (fertilizado por cinco machos). Analizando al interior de los nidos se observa que en esta medida indirecta de adecuación, en ninguno de los cinco nidos con paternidad múltiple las crías más grandes de cada nido corresponden al macho que fertiliza la mayor parte de la progenie del mismo.

5.4.4 Morfometría geométrica, simetría y escudos del caparazón

Los análisis de variables canónicas realizados con los valores de morfometría geométrica muestran que existen diferencias significativas entre la forma de las crías de los diferentes nidos (Wilks' Lambda = 3.9782, $p < 0.0001$). Sin embargo en los nidos con paternidad múltiple, no se encontraron diferencias significativas al interior de los nidos, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos (Nido 2: Wilks' Lambda = 0.0136839, $p = 1.0000$; Nido 7: Wilks' Lambda = 0.1662179, $p = 0.9983$; Nido 10: Wilks' Lambda = 0.178788, $p = 1.0000$; Nido 13: Wilks' Lambda = 0.1936188, $p = 0.9997$; Nido 14: Wilks' Lambda = 0.0521741, $p = 0.9995$). (Figuras 8 a la 13).

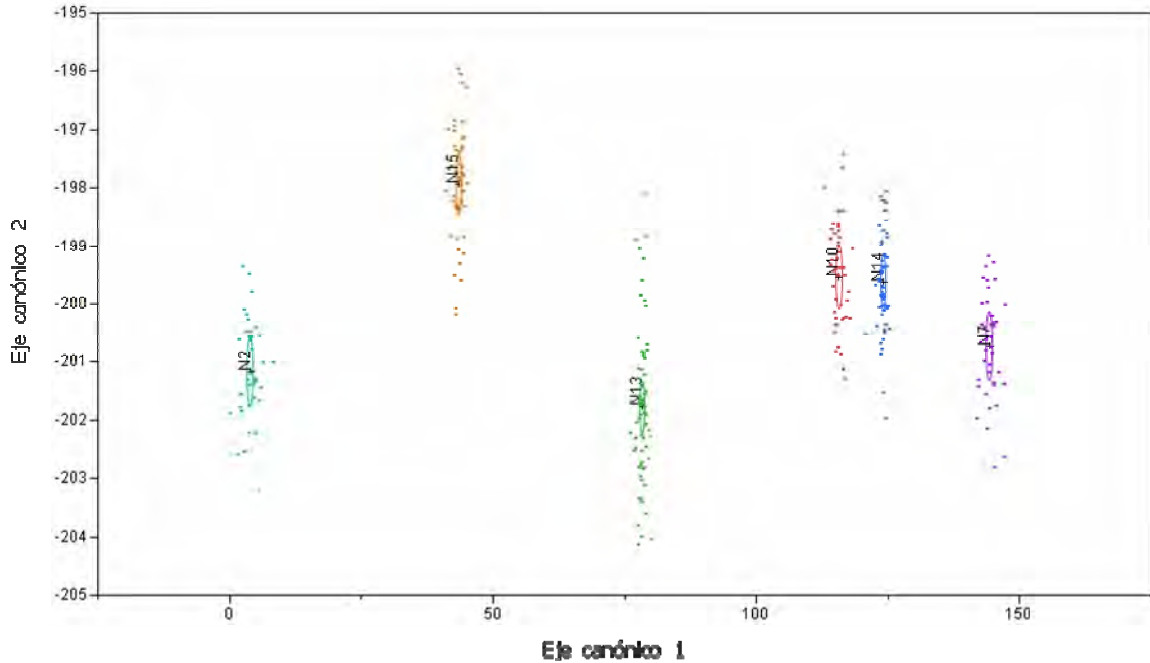


Figura 8. Resultado del análisis de variables canónicas realizado para los seis nidos de los que se analizó paternidad múltiple. Código de colores: nido dos – turquesa, nido siete – morado, nido 10 - rosa, nido 13 – verde, nido 14- azul, nido 15 – rojo.

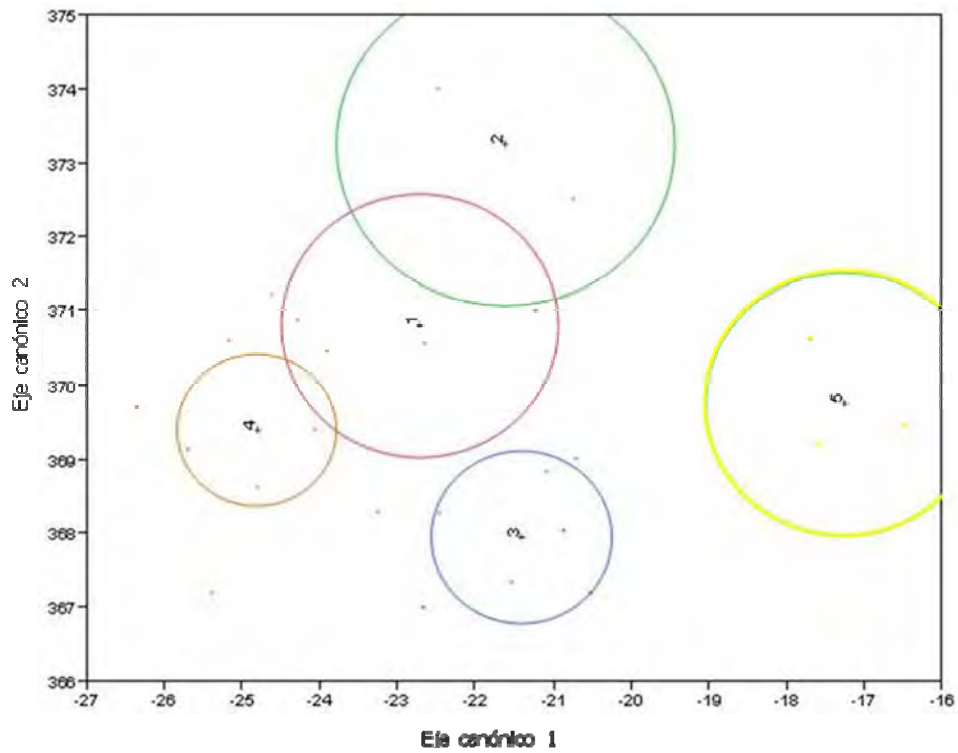


Figura 9. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado para el nido 2, fertilizado por 5 machos. No se encontraron diferencias significativas al interior del nido, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos.

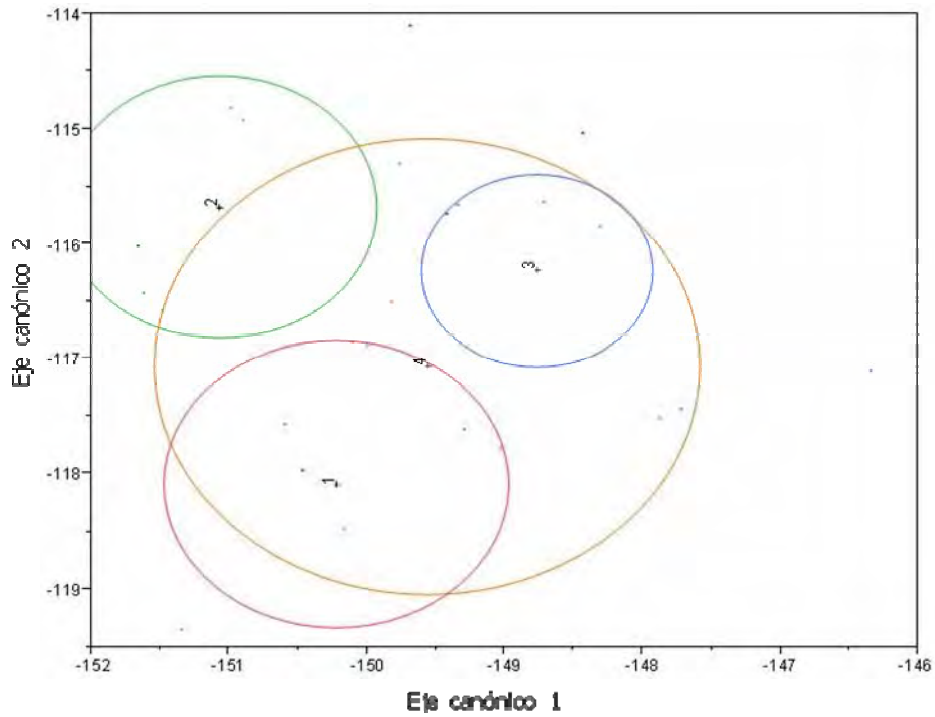


Figura 10. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado para el nido 7, fertilizado por 4 machos. No se encontraron diferencias significativas al interior del nido, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos.

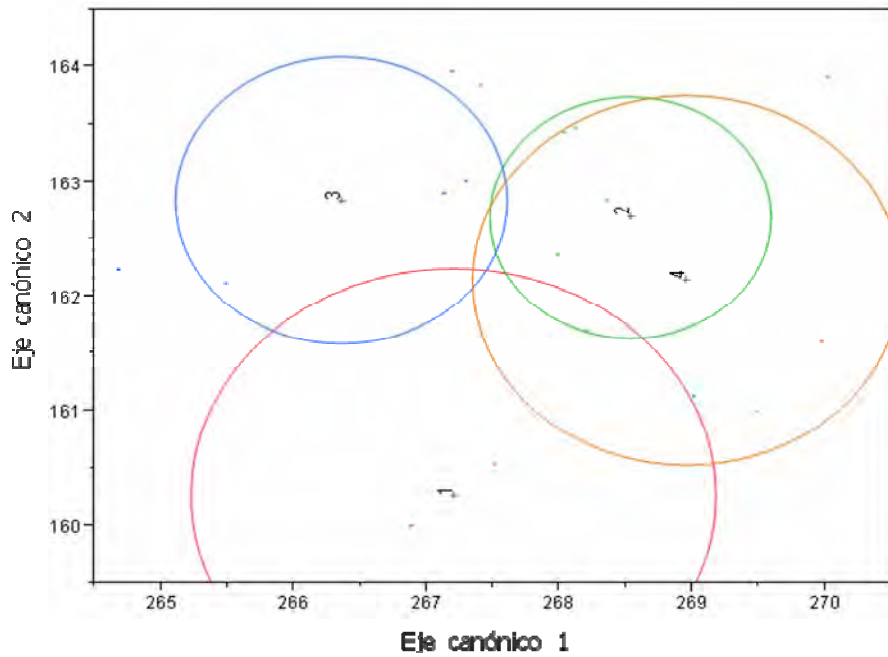


Figura 11. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado para el nido 10, fertilizado por 4 machos. No se encontraron diferencias significativas al interior del nido, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos.

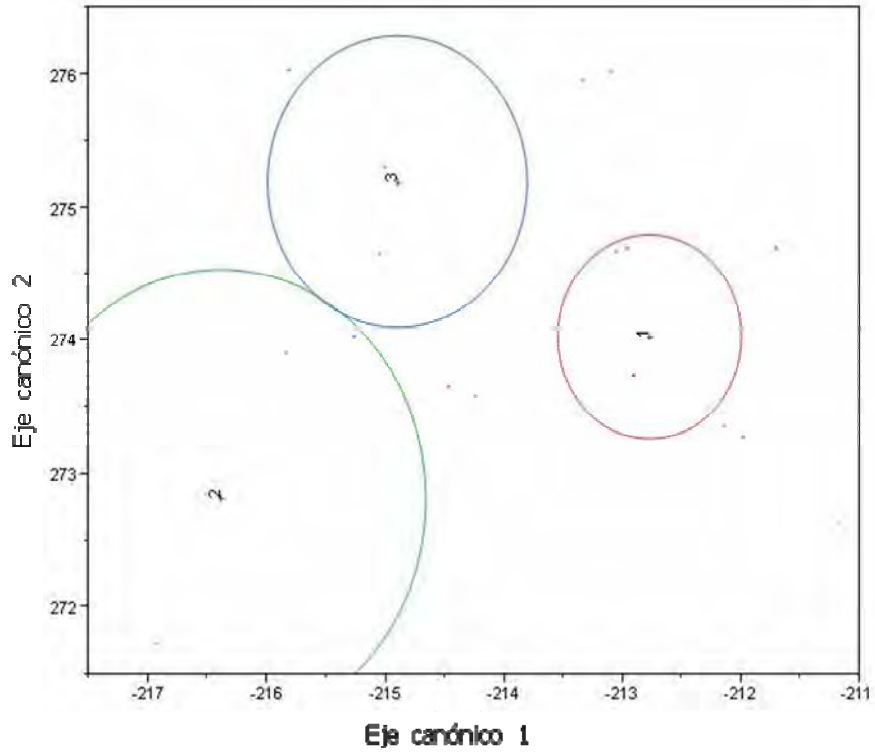


Figura 12. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado para el nido 13, fertilizado por 3 machos. No se encontraron diferencias significativas al interior del nido, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos.

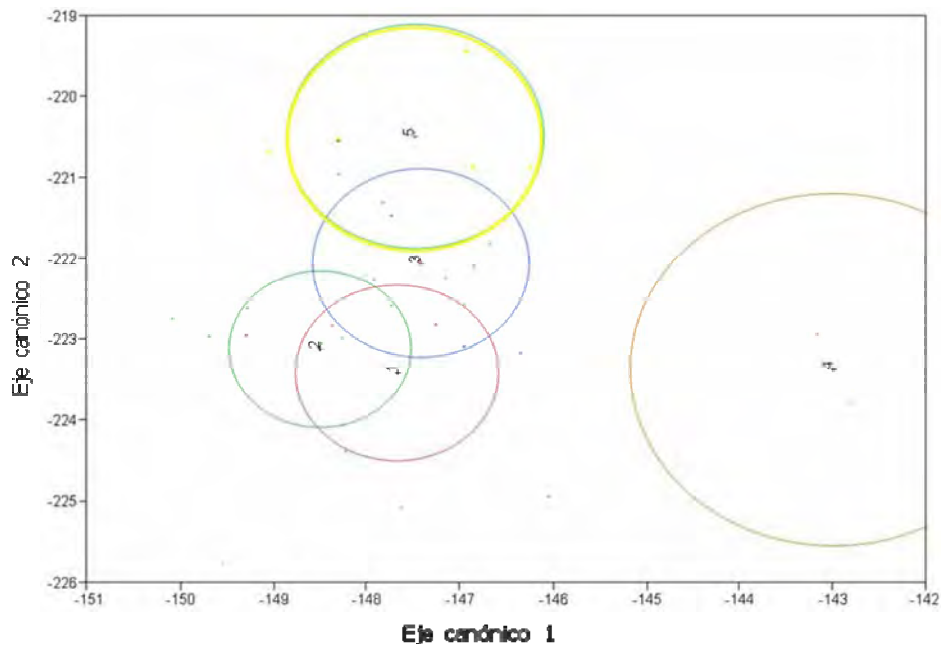


Figura 13. Resultado del análisis de variables canónicas (CVA) realizado para el nido 14, fertilizado por 5 machos. No se encontraron diferencias significativas al interior del nido, es decir, entre la forma de las crías de los diferentes machos.

El índice de asimetría fluctuante promedio fue de -0.00227851 (rango de -0.20399506 a 0.13217891). En la asimetría del caparazón de las crías de los diferentes nidos existen diferencias significativas ($F = 8.2966$, $p = 0.001$). Se encontraron diferencias significativas al interior del nido 14, es decir, entre los valores de asimetría de las crías de los diferentes machos (Nido 2: $F = 4.2328$, $p = 0.007$; Nido 7 $F = 18.7213$, $p = 0.033$; Nido 10: $F = 3.5037$, $p = 0.009$; Nido 13: $F = 7.637$, $p = 0.0589$; Nido 14: $F = 2.8691$, $p = 0.005$).

Con respecto a la simetría, los nidos 14 y 15, fertilizados por cinco y un macho, respectivamente, son los nidos con las crías más simétricas, ambos con un valor de asimetría de 0.001. Las crías más asimétricas son del nido 2, que presenta cinco genotipos paternos. Analizando al interior de los nidos se observa que en el nido 2, las crías más simétricas son del macho que fertiliza la mayor parte de la progenie, mientras que en el resto de los nidos con paternidad múltiple no es así. Sólo se encontraron diferencias significativas al interior del nido 14 es decir, entre los valores de asimetría de las crías de los diferentes machos, posiblemente esto se deba a que este es el nido que presenta el mayor tamaño de muestra (34 crías).

De las 348 crías analizadas se encontró que 118 (34%) presentan escudos supernumerarios. Lo más común que se encontró es que se presentan irregularidades en el patrón de distribución de los escudos centrales.

En relación a los escudos supernumerarios, el nido 2 (fertilizado por cinco machos), es el nido que presenta un menor número de crías con escudos supernumerarios. El nido que presenta un mayor número de crías con escudos

supernumerarios es el nido 13, que presenta tres genotipos paternos. Analizando al interior de los nidos se observa que en los nidos 2 y 10, las crías que no presentan escudos supernumerarios son del macho que fertiliza la mayor parte de la progenie, mientras que en el resto de los nidos con paternidad múltiple no es así.

Las crías más grandes corresponden a progenie de la hembra de mayor tamaño, también son las crías más ligeras y más rápidas.

6. DISCUSIÓN

6.1 Paternidad múltiple y patrón de fertilización

Una de las características de los microsatélites es su alto polimorfismo, lo que los hace ideales para realizar análisis de paternidad. En base al grado de polimorfismo se determina el número de microsatélites necesarios para llevar a cabo los estudios de paternidad, es decir, entre mayor polimorfismo menor es el número de microsatélites a utilizar (Morera *et al.*, 1999; Chistiakov *et al.*, 2006).

Para la determinación de paternidad múltiple, en este estudio se utilizó un número pequeño de microsatélites (3), altamente polimórficos, en relación con otros trabajos donde utilizan cuatro o cinco loci (Fitzsimmons, 1998; Moore y Ball, 2002; Chassin, 2004; Jensen *et al.*, 2006).

En este trabajo se utilizaron los microsatélites CM3, CM84 y CC117, encontrándose 12, 14 y 10 alelos respectivamente; con valores de probabilidad de detección de paternidad múltiple por locus de 0.7077 (CM3), 0.7401 (CM84), 0.6536 (CC117) y genotipos multiloci de 0.9754. Este número de alelos contrasta con los que Fitzsimmons (1995, 1998) encontró para CM3 (19), para CM84 (22) y para CC117 (20), con un valor de probabilidad de detección de paternidad múltiple por genotipos multiloci de 0.999 (5 loci de microsatélite: CM3, CM58, CM72, CC117 y CC7) para la población de tortuga verde australiana.

Por otro lado, Chassin (2004) registró 38 alelos para CM3 y 20 para CM84, con valores de probabilidad de detección de paternidad múltiple por locus de 0.8869 y 0.8438 respectivamente; y de genotipos multiloci de 0.9999 (cuatro

loci de microsatélite: CM3, CM72, CM84 y CC7) para la población de *C.mydas* que anida en Colola, Michoacán.

En este trabajo se registró paternidad múltiple en cinco de los seis nidos analizados. El tamaño de nidos analizados resulta menor a los documentados por Chassin (2004), Fitzsimmons (1998), Kichler *et al.* (1999), Crim *et al.* (2002), Hoekert *et al.* (2002), Moore y Ball (2002), Lee y Hays (2004), Jensen *et al.* (2006) y Zbinden (2007).

Con respecto al orden de fertilización, se concluyó que los cinco nidos con paternidad múltiple presentan un patrón de fertilización desordenado (Figura 14). Este resultado es consistente con lo reportado por Lara-De La Cruz *et al.* (2010) y se interpretó como la evidencia para sugerir que en *C. mydas* el semen utilizado para la fertilización de los huevos es una mezcla de fluido seminal presente en el tracto genital de la hembra.

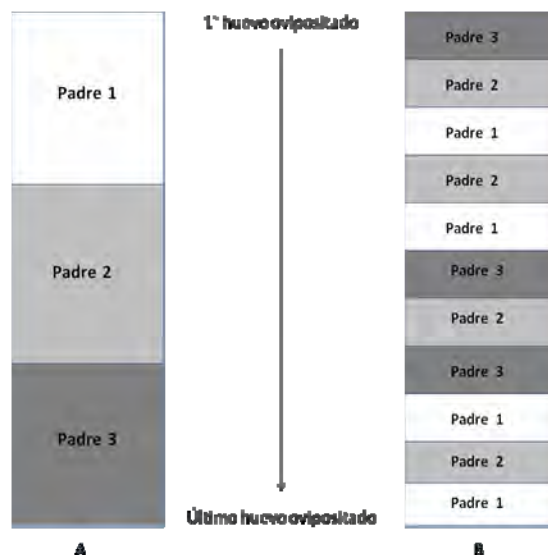


Figura 14. Los 2 escenarios del orden de fertilización: A) corresponde a una fertilización ordenada, mientras que B) corresponde a una fertilización desordenada (reportado por Lara-De La Cruz *et al.*, 2010).

También se documentó que en todos los nidos un macho fertilizó la mayor parte de los huevos y que no existen genotipos paternos compartidos entre los nidos. Este resultado puede ser un efecto del número pequeño de nidos muestreados. Se sugiere que si existiera un grupo pequeño de machos que accedan a la cópula y las hembras fuesen selectivas se presentaría al menos un genotipo paterno compartido entre nidos de diferentes hembras.

En las descripciones anatómicas del tracto genital femenino de tortugas marinas, no se menciona la presencia de estructuras que faciliten el mantenimiento de los espermatozoides (Wyneken, 2004), como ocurre en el caso del tracto reproductivo de tortugas dulceacuícolas, donde se han identificado túbulos para el almacén de semen (Gist y Congdon, 1998). Sin embargo, en este trabajo se hipotetizaba la capacidad potencial de que por movimientos musculares del oviducto, el semen de los distintos machos involucrados en la cópula se mantuviera separado uno del otro.

En *C. mydas* se ha encontrado evidencia de la capacidad que tienen las hembras para almacenar el semen obtenido en los eventos copulatorios con distintos machos, aunque este almacenamiento solo se presenta en una temporada reproductiva (Chassin, 2004; Lutz y Musick, 1997). Al presentarse paternidad múltiple en los nidos aquí analizados, se infiere que ocurre el almacenamiento de semen. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no hubo orden en la fertilización de los nidos, por lo que se sugiere que desde el punto de vista anatómico y/o funcional no existen estructuras especializadas para almacenar el semen. Así que no se infiere la posibilidad de un mecanismo de

elección críptica de la hembra. Por lo tanto, las hembras pueden estar ejerciendo fuertes mecanismos de selección pre-cópula, o bien, que este patrón de fertilización sea resultado de procesos de selección post-cópula, como podría ser la competencia espermática (Pearse y Avise, 2001).

Se conoce que *C. mydas* presenta una conducta polígama y que tiene la capacidad de almacenar el semen en una temporada de anidación, por lo que se cubren los supuestos para que se presente competencia espermática. Este proceso se ha estudiado principalmente en insectos, reportándose incluso la presencia de espermatozoides anucleados (“espermatozoides kamikaze”) cuya función es destruir o bloquear a los espermatozoides de otros machos (Kura y Nakashima, 2000); pero podría estar ocurriendo dentro del tracto genital de las tortugas marinas.

Uno de los resultados de la competencia espermática es el cambio en la frecuencia de espermatozoides disponibles de los machos involucrados en la fertilización de los óvulos (Sivinski, 1984). Sin embargo, para demostrar la presencia de competencia espermática en *C. mydas* sería pertinente realizar investigación en sistemas *in vitro*, similares a lo realizado por Moore *et al.* (1999).

De acuerdo con Alvarado y Figueroa (1990,1992) las hembras de *C. mydas* de la población que anida en Michoacán oviposita en promedio 2.6 nidos por temporada (intervalo de uno a nueve), con un período interanidatorio de 12 a 14 días, durante el cual puede observarse a las hembras copulando. Es importante hacer hincapié en que este trabajo se realizó únicamente con seis

nidos, los cuales corresponden a un solo evento de anidación de las hembras, desconociéndose si se trató del primer evento, el último o si fue un evento de anidación intermedio. Debido a lo mencionado anteriormente se desconoce si nuestros resultados cambiarían en lo obtenido en paternidad múltiple en nidadas consecutivas de la misma hembra.

Se desconoce el por qué de la variación en la frecuencia de paternidad múltiple y su valor en términos de adecuación tanto en la capacidad reproductiva de las hembras, así como en el desempeño o adecuación de las crías.

Se plantea que aunque *C. mydas* presenta un sistema de apareamiento poliándrico, la paternidad múltiple no es estrictamente obligada ya que en el presente trabajo se observa presencia y ausencia de paternidad múltiple, la cual, de acuerdo con las variables propuestas en este trabajo, aparentemente no confiere ninguna ventaja a la progenie. Se sugiere que los procesos que podrían estar asociados a la variación de paternidad múltiple en tortugas marinas son los siguientes:

a) La abundancia de machos en sitios de cópula puede mostrar una variación espacial y temporal considerable. En la playa de Colola se ha observado una variación importante en el número de machos satélites durante la cópula, que puede ser usado como indicador de la abundancia de machos. Durante la temporada de 1999 se observaron hasta nueve machos satélites por mancuerna (Martínez, 2003), mientras que en la temporada 2000 el grupo más grande de machos satélites que se observó fue de tres (Chassin, 2004). La disponibilidad de machos para la cópula, ya sea al inicio de la temporada de anidación o en eventos

interanidatorios, puede estar fuertemente sesgada si por ejemplo la población de machos visitantes un año sea baja y la de hembras sea alta. La proporción hembras-machos en los sitios de reproducción es una propiedad poblacional importante; sin embargo, no existe evidencia que soporte esta idea, debido a la dificultad para obtener información biológica, de la dinámica poblacional y conducta reproductiva de los machos.

b) Procesos dependientes de la elección de la hembra: en este caso la hembra mediante mecanismos pre-cópula modifica la frecuencia de paternidad múltiple. Las explicaciones más sencillas son que las hembras optan por eliminar la paternidad múltiple cuando se aparean con algún macho que posee características deseables evaluadas desde el nivel fenotípico externo hasta niveles de reconocimiento celular o subcelular (Birkhead y Pizzari, 2002) o cuando la abundancia de machos sea baja.

6.2 Paternidad múltiple y adecuación en hembras adultas

Lee y Hays (2004) plantean que no existe relación entre la frecuencia de paternidad múltiple de un nido y la capacidad reproductiva de las hembras. Este planteamiento lo derivaron de la evaluación de: tamaño de nidada, porcentaje de eclosión y porcentaje de sobrevivencia de 18 nidos de tortuga verde. De igual manera Zbinden y colaboradores (2007) realizaron un estudio de paternidad múltiple con 16 nidos de tortuga caguama (*Caretta caretta*) y con sus resultados plantearon que existe una correlación positiva entre el número de machos implicados en la fertilización de un nido y el tamaño de la hembra, es decir, el

número de machos que fertilizan huevos aumenta con el tamaño de la hembra. En contraste, en el presente estudio se encontró que no existe correlación alguna entre el número de genotipos paternos de un nido y el tamaño de la hembra.

En este trabajo se analizó el impacto que tiene la paternidad múltiple en la capacidad reproductiva de seis hembras (tamaño nidada y porcentaje de eclosión) y se encontró que no existe relación alguna, lo que coincide con los resultados de Lee y Hays (2004). Estos autores sugieren que los apareamientos múltiples no son necesariamente benéficos para las hembras, sino que son el resultado del daño causado por las estrategias reproductivas agresivas que tienen los machos. Es decir, para las hembras de tortuga marina el costo de rechazar a los machos es mayor que las ventajas de aceptarlo, y por esta razón permiten apareamientos múltiples.

Otro punto que se ha discutido es si la paternidad múltiple ofrece ventajas a las hembras de tortugas marinas, considerando que así se garantice la fertilización de los huevos o paternidad asegurada (*sensu* Birkhead, 1987). Las posibles ventajas serían mediante la adquisición de suficiente semen para la fertilización de un gran número de huevos, el incremento de la variabilidad genética de la progenie; y el promover la competencia espermática (Fitzsimmons, 1998; Pearse y Avise, 2001; Martínez, 2003; Lee y Hays, 2004).

6.3 Paternidad múltiple y medidas indirectas de adecuación en crías

Esta tesis es el primer trabajo en abordar si la paternidad múltiple tiene algún impacto en la adecuación de la progenie. Se esperaba que todas las

variables seleccionadas como indicadores de vigor en las crías (peso, el tamaño, velocidad de incorporación, presencia de escudos supernumerarios, morfometría geométrica y simetría), estuvieran relacionadas con genotipos paternos particulares, es decir, que dentro de cada nido, las crías más grandes, las de mayor peso, las más rápidas en cuanto a valores de velocidad de incorporación, las más simétricas, las que no presentaran escudos supernumerarios, fueran crías de un mismo macho; sin embargo esto no fue así.

Los resultados mencionados anteriormente, podrían explicarse por el número tan bajo de crías que alcanzan el estado adulto, una de cada cien. De manera que sería normal el que no exista una diferencia tan marcada entre los valores de las variables indicadoras de vigor, de las crías de diferentes machos dentro de un nido. Es decir, que las hembras seleccionaron y se aparearon únicamente con los machos con altos niveles de adecuación.

Durante el desarrollo de los embriones influyen algunos factores ambientales como humedad, temperatura, salinidad y tamaño de grano de la arena; los cuáles, entre otros, determinan el éxito en la incubación. El efecto combinado, en particular de la humedad y la temperatura, se inicia desde que los huevos son ovipositados hasta la emergencia de las crías (Arzola-González, 2007). En este trabajo se observó que no existe efecto paterno sobre la adecuación de las crías, sin embargo si hay diferencias significativas de las variables aquí propuestas entre nidos. Se sugiere que estas diferencias puedan deberse a variaciones en la temperatura y condiciones hídricas de incubación de los nidos.

Desde una perspectiva evolutiva los efectos de la temperatura en la embriogénesis de las tortugas marinas es de interés particular, debido a que características fenotípicas relacionadas con su adecuación (determinación sexual y tamaño corporal por mencionar algunas) podrían estar influenciadas por la misma (Glen *et al.*, 2003; Reid *et al.*, 2009). Muchos estudios han reportado que la temperatura de incubación influye en las características (determinación del sexo, forma del cuerpo, color, tamaño, cantidad de yema convertida a tejido durante el desarrollo embrionario, desempeño locomotor y el comportamiento) de las crías de los reptiles incluyendo las tortugas (Glen *et al.*, 2003; Booth *et al.*, 2004; Burgess *et al.* 2006; Mickelson y Downie, 2010). Lo mencionado anteriormente sugiere que los elementos ambientales podrían estar actuando en mayor grado que los elementos genéticos para explicar las variaciones encontradas en los parámetros de adecuación analizados en este estudio.

La variación en las condiciones de incubación podría tener consecuencias en la adecuación de las crías, y aunque los estudios que documentan este tipo de variación fenotípica son numerosos, sólo pocos relacionan dicha variación al desempeño de las crías de manera cuantitativa. La medición de la adecuación en las crías de tortugas es compleja debido a su ciclo de vida tan largo (más de 20 años para la mayoría de las especies) (Booth *et al.*, 2004)

Booth y colaboradores (2004) encontraron que las crías de *C. mydas* incubadas a 26 °C son más grandes, pero más lentas en su velocidad natatoria que las incubadas a 28 °C y 30 °C. Estos autores sugieren que la temperatura de incubación influye en el desempeño natatorio durante las primeras 24 horas

posteriores a la emergencia y que corresponde al frenesí del período de natación (comprendido entre las primeras 48 horas posteriores a la emergencia) de modo que estaría influyendo en la mortalidad posterior a la eclosión.

Burgess y colaboradores (2006) realizan un trabajo con crías de *C. mydas* y al igual que Booth y colaboradores (2004) mencionan que las crías incubadas a 26 °C son más grandes, pero con una habilidad natatoria menor que aquellas incubadas a 28 °C y 30 °C.

Se considera que para trabajos posteriores sobre la variación en la frecuencia de paternidad múltiple y su valor en términos de adecuación en las crías de tortugas marinas, sería importante realizar mediciones de la temperatura y condiciones hídricas de incubación de los nidos.

De acuerdo con Chassin (2004) una muestra de 25 crías por nido permite detectar la presencia de hasta cinco genotipos paternos dentro de un nido. Se debe hacer énfasis en que en el presente trabajo, el análisis realizado de paternidad múltiple en términos de adecuación de las crías se desarrolló únicamente con 133 crías de seis nidos, y que en algunos nidos las muestras por macho son muy pequeñas. Se considera que sería importante incrementar el número de nidos estudiados y analizar todas las crías de los mismos, con el propósito de aumentar el número de muestra para las variables indirectas de adecuación y corroborar si aún así sigue sin encontrarse relación de ellas con un genotipo paterno particular. De igual manera, además de los parámetros indirectos de adecuación (peso, tamaño, simetría, vigor) deberían incluirse variables

ambientales (temperatura de incubación, humedad, salinidad, tamaño de grano de la arena) para inferir si existe relación de las mismas con las variables de adecuación.

7. REFERENCIAS

- Aggarwal, R.K., T.P. Velavan, D. Udaykumar, P.S. Hendre, K. Shanker y L. Singh. 2004. Development and characterization of novel microsatellite markers from the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Molecular Ecology Notes* 4: 77-79.
- Alvarado, J. y A. Figueroa. 1990. The ecological recovery of sea turtles of Michoacán, México. Special attention the black turtle (*Chelonia agassizii*). Final report U.S. Fish and Wildlife Service, New México. 51pp.
- Alvarado, J., y A. Figueroa. 1991. Comportamiento reproductivo de la tortuga negra *Chelonia agassizii*. *Ciencia y Desarrollo* 17: 43-49.
- Alvarado, J., y A. Figueroa. 1992. Recapturas post-anidatorias de hembras de tortuga marina negra (*Chelonia agassizii*) marcadas en Michoacán, México. *Biotropica* 24: 560-566.
- Aranguen-Méndez, J., J. Jordana y M. Gómez. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics Selection Evolution* 33: 243-252.
- Arzola-González, J.F. 2007. Humedad y temperatura en nidos naturales y artificiales de Tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschsholtz 1829). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 42: 377-383.
- Birkhead, T. R. 1987. Prolonged Sperm storage in domestical canaries. *The Auk* 104: 770-771.

- Birkhead, T.R. y A.P. Mollar. 1993. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biological Journal of the Linnean Society* 50: 293-311.
- Birkhead, T.R. y T. Pizzari. 2002. Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews* 3: 262-273.
- Bollmer J.L., M.E. Irwin, J.P. Rieder y P.P. Parker. 1999. Multiple paternity in loggerhead turtle clutches. *Copeia* 2: 475-478.
- Booth, D.T., E. Burgess, J. McCosker y J.M. Lanyon. 2004. The influence of incubation temperature on post-hatchling fitness characteristics of turtles. *International Congress Series-ELSEVIER*. 1275: 226-233.
- Burgess, E.A., D.T. Booth y J.M. Lanyon. 2006. Swimming performance of hatchling green turtles is affected by incubation temperature. *Coral Reefs* 25: 341-349.
- Chaves, A., M. Arana y L. Du Toit. 2000. Primary evidence of sperm storage in the ovaries of the olive ridley marine turtle (*Lepidochelys olivacea*). In: *Proceedings of the Eighteenth International Sea Turtle Symposium*. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-436. 293 pp.
- Chassin N., O. 2004. Variabilidad genética y paternidad múltiple de la tortuga verde del pacífico oriental (*Chelonia mydas* Linnaeus 1758). Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias Biomédicas. UNAM. México.
- Cheng, H.H. y L.B. Crittenden. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science* 73: 539-546.

- Chistiakov, D.A., B. Hellemans y F.A.M. Volckaert. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 255: 1-9.
- Cortés R., X. 2006. Análisis de paternidad múltiple de *Lepidochelys olivacea* en la costa de Oaxaca. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. 43 pp.
- Crim, J.L., L.D. Spotila, J.R. Spotila, M. O'Connor, R. Reina, C.J. Williams y F.V. Paladino. 2002. The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea* exhibits both polyandry and polygyny. *Molecular Ecology* 11: 2097-2106.
- Davis, A.K. y A.M. Grosse. 2008. Measuring fluctuating asymmetry in plastron scutes of yellow-bellied sliders: the importance of gender, size and body location. *The American Midland Naturalist* 159: 340-348.
- Delmas, V., E. Baudry, M. Girondot y A.C. Prevot-Julliard. 2007. The righting response as a fitness index in freshwater turtles. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 99-109.
- Dufour, K.W. y P.J. Weatherhead. 1998. Bilateral symmetry and social dominance in captive male red-winged blackbirds. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42: 71-76.
- Dutton, P.H. 1997. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies. In: *Proceedings of The International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. 173 pp.
- Dutton, P.H. y S.K. Davis. 1998. Use of molecular genetics to identify individuals and infer mating behavior in leatherbacks. In: *Proceedings of the Sixteenth*

- Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-412. 158pp.
- FitzSimmons, N., C. Moritz y S.S. Moore. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 12: 432-440 pp.
- FitzSimmons, N. 1996. Use of microsatellite loci to investigate multiple paternity in marine turtles. In: *Proceedings of The International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. 173 pp.
- FitzSimmons, N. 1997. Male marine turtles: gene flow, philopatry and mating systems of the green turtle *Chelonia mydas*. Tesis Doctoral. Universidad de Queensland, Australia. 241pp.
- FitzSimmons, N. 1998. Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology* 7: 575-84.
- Gabor, T., Z. Gaspari y J. Jurka. 2000. Microsatellites in different eukariotic genomes survey and analysis. *Genome* 10: 967-981.
- Gist, D.H. y J.D. Congdon. 1998. Oviductal sperm storage as a reproductive tactic of turtles. *The Journal of Experimental Zoology* 282: 526-534.
- Glen, F., A.C. Broderick, B.J. Godley y G.C. Hays. 2003. Incubation environment affects phenotype of naturally incubated green turtle hatchlings. *Journal of the Marine Biological Association of United Kingdom* 83: 1183-1186.
- Goldstein, D.B. y C. Schlotterer. 1999. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press. Oxford. 352 pp.

- Harry, J.L. y D.A. Briscoe. 1988. Multiple paternity in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Journal of Heredity* 79: 96-99.
- Hoekert, W.E.J., H. Neuféglise, A.D. Schouten y S.B.J. Menken. 2000. Multiple paternity in the Olive Ridley Sea Turtle. In: Proceedings of the Nineteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-443. 309 pp.
- Hoekert, W.E.J., H. Neuféglise, A.D. Schouten y S.B.J. Menken. 2002. Multiple paternity and female biased mutation at a microsatellite locus in the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Heredity* 89: 107-113.
- Ireland, J.S., A.C. Broderick, F. Glen, B.J. Godley, G.C. Hays, P.L.M. Lee y D.O.F. Skibinski. 2003. Multiple paternity assessed using microsatellite markers, in green turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 291: 149-160.
- Jensen, M.P.; A. Abreu-Grobois; J. Frydenberg y V. Loeschcke. 2006. Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley rookeries. *Molecular Ecology* 15: 2567-2575.
- Jones, A.G. 2005. GERUD 2.0 A computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes* 5: 708-711.
- Kichler, L., M.T. Holder, S.K. Davis, M.R. Márquez y D.W. Owens. 1999. Detection of multiple paternity in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling. *Molecular Ecology* 8: 819-830.

- Kura, T. y Y. Nakashima. 2000. Conditions for the evolution of soldier sperm classes. *Evolution* 54: 72-80.
- Lara-De La Cruz, L.I., K. Oyama, H. Cano-Camacho, M.G. Zavala-Paramo, G. Vázquez-Marrufo y O. Chassin-Noria. 2010. Detecting patterns of fertilization and frequency of multiple paternity in *Chelonia mydas* of Colola (Michoacán, México). *Hidrobiológica* 20: 85-89.
- Lee, P.L.M. y G.C. Hays. 2004. Polyandry in a marine turtle: females make the best of a bad job. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 6530-6535.
- Leford, F. y G.C. Douglas. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus*, and *Quercus*. *Annals of Forest Science* 56: 259-263.
- Lutz, P.L. y J.A. Musick. 1997. *The biology of sea turtles*. CRC Press, Inc. U.S.A. 432 pp.
- Márquez, R. 1996. *Las tortugas marinas y nuestro tiempo*. Fondo de Cultura Económica. México. 197 pp.
- Márquez, E. 2006. *Sage: symmetry and asymmetry in geometric data*. Ver. 1.0. <http://www-personal.umich.edu/~emarquez/morph/>.
- Martínez M., M. 2003. *Repertorio del comportamiento y patrones sociales durante el cortejo y apareamiento de Chelonia agassizii*. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. 49 pp.
- Mickelson, L.E. y J.R. Downie. 2010. Influence of incubation temperature on morphology and locomotion performance of Leatherback (*Dermochelys coriacea*) hatchlings. *Canadian Journal of Zoology* 88: 359-368.

- Morera, L., D.F. De Andrés, M. Barbancho, J. J. Garrido y C. J. Barba. 1999. Detección de variabilidad genética por microsatélites en el alano español. Archivos de Zootecnia 48: 63-70.
- Moore, H.D., M. Martin y T.R. Birkhead. 1999. No evidence for killer sperm or other selective interactions between human spermatozoa in ejaculates of different males in vitro. Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences 266: 2343-2350.
- Moore, M.K. y R.M. Ball Jr. 2002. Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nest on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. Molecular Ecology 11: 281-8.
- Mortimer, J.A. 2000. Reducción de las amenazas a los huevos y a las crías: Los viveros. En: Eckert, K.L, K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois, M. Donnelly (Eds.). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas. Publicación No. 4, 2000 (Traducción al español). 265 pp.
- Nieto-Ortiz., O.R. 2010. Paternidad múltiple de tortuga negra (*Chelonia mydas*) en una playa con baja densidad de anidación. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. 51 pp.
- Owens, D. W. y G. J. Ruiz. 1980. New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. Herpetologica 36: 17-20.
- Oxnevad, S.A.; E. Heibo y L.A. Vollestad. 2002. Is there a relationship between fluctuating asymmetry and reproductive investment in perch (*Perca fluviatilis*)? Canadian Journal of Zoology 80: 120-125.

- Pearse, D.E. y J.C. Avise. 2001. Turtle mating systems: behavior, sperm storage, and genetics paternity. *Journal of Heredity* 92: 206-211.
- Refsnider, J.M. 2009. High Frequency of multiple paternity in Blanding's Turtle (*Emys blandingii*). *Journal of Herpetology* 43: 74-81.
- Reid, K.A., D. Margaritoulis y J.R. Speakman. 2009. Incubation temperature and energy expenditure during development in loggerhead sea turtle embryos. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 378: 62-68.
- Rieder, J.P., P.G. Parker, J.R. Spotila y M.E. Irwin. 1998. The mating system of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*): a molecular approach. In: *Proceedings of the Sixteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-412. 158 pp.
- Seminoff, J., J. Alvarado, C. Delgado, J.L. López y G. Hoeffler. 2002. First direct evidence of migration by an east pacific green sea turtle from Michoacán, México to feeding ground on the Sonora coast of the Gulf of California. *The Southwestern Naturalist* 47: 314-316.
- Sivinski, J. 1984. Sperm in competition. In: Smith, R.L. (Ed.). *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic press New York. 85-115 pp.
- Soulé, M.E. 1980. Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In: Soulé, M.E. and B.A. Wilcox (Eds). *Conservation Biology. An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. 115-169 pp.

- Tautz, D. 1989. Hipervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6470.
- Theissinger, K., N.N. FitzSimmons, C.J. Limpus, C.J. Parmenter y A.D. Phillott. 2009. Mating system, multiple paternity and effective population size in the endemic flatback turtle (*Natator depressus*) in Australia. *Conservation Genetics* 10: 329-346.
- Wyneken, J. 2004. La anatomía de las tortugas marinas. U. S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 172 pp. (Versión en español de Wyneken, J. 2001. *The Anatomy of Sea Turtles*. U. S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, 172 pp.).
- Zbinden, J.A., C.R. Largiader, F. Leippert, D. Margaritoulis y R. Arlettaz. 2007. High frequency of multiple paternity in the largest rookery of mediterranean loggerhead sea turtles. *Molecular Ecology* 16: 3703-3711.

DISCUSIÓN GENERAL

Se conoce poco sobre la frecuencia natural o de las posibles causas naturales o antropogénicas de las malformaciones en tortugas marinas. Se sugiere que factores intrínsecos (genéticos y fisiológicos) y extrínsecos (físicos, químicos, edafológicos, etc.) afectan de manera considerable el proceso de eclosión de crías de tortugas marinas. Las modificaciones en estos factores tienen efecto directo en el desarrollo embrionario y pueden ser responsables de la presencia de ciertos tipos de malformaciones (Bishop *et al.*, 1994; Alam y Brim, 2000; Özdemir y Türkozan, 2006; Bujes y Verrastro, 2007; Bárcenas-Ibarra y Maldonado-Gasca, 2009; Reid *et al.*, 2009; Torezani *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo embrionario, los factores ambientales juegan un papel importante en la formación de las crías, no únicamente en la determinación del sexo, sino también en el crecimiento y fisiología. En el año de 1857 se describió por primera vez la presencia de malformaciones en tortugas marinas (en la tortuga caguama *Caretta caretta*) (Drenen, 1990; en Bárcenas-Ibarra y Maldonado-Gasca 2009), y desde entonces este fenómeno ha sido poco estudiado (Bárcenas-Ibarra y Maldonado-Gasca 2009). Por lo mencionado anteriormente, éste es un campo muy fértil de investigación, ya que a la fecha los trabajos que describen la frecuencia de anomalías en los embriones y neonatos de tortugas marinas son escasos.

Referente a malformaciones como son: el albinismo, ausencia de ojos y/o narinas, e incluso ausencia de aletas, por mencionar algunas. Bárcenas-Ibarra y

Maldonado-Gasca (2009) reportan que se han publicado 9 trabajos desde el año de 1857, de los cuales sólo uno de ellos es de tortuga verde (*C. mydas*).

Un ejemplo muy común de anomalía en tortugas marinas es la presencia de escudos supernumerarios en el caparazón; este fenómeno fue descrito por primera vez en 1989 (Mast y Carr, 1989) y a la fecha sólo se han publicado seis trabajos del tema y para tres especies de tortugas marinas: tortuga verde (*C. mydas*), tortuga lora (*L. kempfi*) y tortuga caguama (*C. caretta*).

El presente trabajo es el primero en reportar escudos supernumerarios en tortugas marinas en playas mexicanas; es importante mencionar que durante el trabajo de campo se observó la presencia de individuos albinos y con malformaciones del caparazón y mandíbula de *C. mydas* (Figura 1).

Como consecuencia de lo anterior se recomienda que se incluyan reportes de malformaciones como parte del proceso de evaluación de los nidos, con el objetivo de hacer un seguimiento a largo plazo de las mismas y generar datos adecuados que en un futuro podrían ser importantes dentro de los programas de conservación de las tortugas marinas.



Figura 1. Ejemplares de *Chelonia mydas* de la localidad de Maruata, Michoacán, que presentan malformaciones: a) cría que presenta malformación en la mandíbula; b) y c) crías albinas, ambas además del albinismo presentan anomalías en el patrón de arreglo de los escudos del caparazón, la segunda adicionalmente presenta malformación del cráneo y ojos; d) cría con malformación del caparazón, e) gemelos desiguales que muestran tamaño y desarrollo distintos; f) hembra anidadora con malformación del caparazón.

El desempeño locomotor (velocidad de incorporación, locomoción en playa y natación) de crías de tortuga marina es el principal factor en determinar su posibilidad de sobrevivir al período comprendido entre la emergencia del nido y alcanzar las aguas más profundas de la costa, entre mejor sea su desempeño durante su permanencia en la playa será menor el tiempo en que las crías estarán expuestas a la depredación y tendrán mayores oportunidades de sobrevivencia (Ischer *et al.*, 2009).

En el presente trabajo sólo se registró la velocidad de incorporación, pero sería importante también explorar como es el desempeño de las crías de tortugas marinas en cuanto a la velocidad de locomoción en playa y la natación, e investigar si existe una correlación significativa entre las tres variables.

La forma en particular es importante de estudiar porque es el mayor rasgo fenotípico sobre el cual puede actuar la selección sexual (Myers *et al.*, 2006). Existen pocos trabajos publicados sobre morfometría geométrica y simetría en tortugas y todos ellos han sido realizados utilizando como modelo de estudio tortugas dulceacuícolas (Claude *et al.*, 2003; Valenzuela *et al.*, 2004; Depecker *et al.*, 2006; Myers *et al.*, 2006; Davis y Grosse, 2008; Domokos y Várkony, 2008; Rivera y Claude, 2008).

Por lo mencionado anteriormente, el presente trabajo resulta ser pionero debido a que es el primer estudio sobre morfometría geométrica y simetría en tortugas marinas, evidenciando que la presencia de escudos supernumerarios no afecta la forma ni la simetría del caparazón *C. mydas*. Se sugiere que la presencia de escudos supernumerarios no es una característica que esté sometida a

selección, al menos con respecto a su impacto en la natación (hidrodinámica), de manera que la variación encontrada no tiene valor adaptativo, situación que es reforzada cuando no se detectan diferencias en los porcentajes de escudos supernumerarios en crías e individuos adultos.

Un área importante de aplicación de la morfometría geométrica y la simetría es en la determinación sexual de las crías de tortugas. Valenzuela y colaboradores (2004) realizaron un análisis de morfometría geométrica para identificar el sexo de crías de dos especies de tortugas dulceacuícolas (*Chrysemys picta* y *Podocnemis expansa*). Encontraron que ambas especies presentan diferencias en la región anal del caparazón, la cual resultó ser más estrecha en las hembras en relación con los machos. Adicionalmente también encontraron que machos y hembras de ambas especies presentan diferencias en la región central del caparazón, en *P. expansa* los machos presentan un mayor índice de expansión en la región central que las hembras, mientras que en el caso de *C. picta* sucede lo contrario. Los autores concluyen que éste tipo de análisis, es una herramienta muy poderosa en la determinación sexual, ya que es capaz de detectar diferencias muy sutiles en la forma del caparazón, permitiendo diferenciar las hembras de los machos.

Por otro lado Davis y Grosse (2008) realizaron un análisis de asimetría fluctuante utilizando el plastrón (en lugar del caparazón) de tortugas dulceacuícolas encontrando que los machos son más asimétricos que las hembras. Ellos explican que en tortugas, tanto machos y hembras de ciertas especies, tienden a diferir en sus tasas de crecimiento absolutas, creciendo más

rápido las hembras que los machos. Estas diferencias se deben a diferencias fisiológicas en metabolismo. Las diferencias en la tasa de crecimiento podrían tener implicaciones en la simetría bilateral del caparazón de cada sexo. De acuerdo con los autores, una tasa de crecimiento rápido sería indicador de un crecimiento más eficiente (simétrico) con menos errores bilaterales.

Söderman *et al.* (2007) encontraron un mayor nivel de asimetría fluctuante en machos que en hembras de ranas. Estas diferencias las atribuyen a la posibilidad de interferencia en el crecimiento de las hormonas esteroideas, considerándose que los machos están bajo un estrés de desarrollo mucho mayor que las hembras y por ello presentan altos niveles de asimetría fluctuante.

Es importante hacer énfasis en que algunos autores consideran que para realizar análisis de morfometría geométrica y asimetría, es mejor utilizar el plastrón de las tortugas porque es relativamente más plano que el caparazón (Myers *et al.*, 2006). Un aspecto a considerar en la realización de futuros proyectos.

Por lo mencionado anteriormente, en trabajos posteriores, sería deseable hacer un análisis de morfometría geométrica y simetría en crías hembras y machos (sexo conocido y determinado previamente por temperatura de incubación) de tortugas marinas y tratar de identificar un patrón para sexar.

¿Por qué existen apareamientos múltiples? ¿Por qué se presenta variación en la frecuencia de paternidad múltiple? ¿La paternidad múltiple confiere ventajas adaptativas a las tortugas marinas? Estas son algunas preguntas que

siguen sin respuesta. En un esfuerzo por tratar de responder estas y otras interrogantes asociadas al tema se considera relevante continuar realizando trabajos de investigación sobre paternidad múltiple en *C. mydas*, en playas de baja y alta densidad de anidación e integrar la información que proporcionan los análisis genéticos con información sobre condiciones de incubación natural de los nidos, medidas de adecuación indirecta en crías (como las analizadas en este trabajo e incluso proponer otras) así como toda aquella información que se pueda obtener de los individuos adultos (hembras y machos).

CONCLUSIONES GENERALES

- I. Se encontró que un alto porcentaje de crías e individuos adultos (hembras anidadoras) presentan escudos supernumerarios, 40 y 43 % respectivamente.
- II. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de morfometría geométrica y asimetría fluctuante de los individuos con escudos supernumerarios e individuos sin escudos supernumerarios.
- III. Los loci de microsatélite CM3, CM84 y CC117 resultaron ser polimórficos para la población de *C. mydas* que anida en Michoacán, encontrándose 12, 14 y 10 alelos respectivamente; con valores de probabilidad de detección de paternidad múltiple por locus de 0.7077 (CM3), 0.7401 (CM84), 0.6536 (CC117) y genotipos multiloci de 0.9754.
- IV. De los seis nidos analizados, se encontró que cinco de ellos presentan paternidad múltiple (83%). El análisis de paternidad múltiple reveló que en la fertilización de los huevos estuvieron implicados uno, tres, cuatro y cinco machos.
- V. De los genotipos paternos obtenidos para cada nido, no se encontró evidencia de genotipos compartidos en nidos de las distintas hembras, encontrándose en total 22 genotipos paternos.
- VI. Los cinco nidos con paternidad múltiple analizados presentan un patrón de fertilización desordenado.
- VII. En los nidos con paternidad múltiple, existe un macho que fertiliza la mayoría de los huevos; en este caso no fue posible discernir si se trató del

primero, un macho intermedio o el último en copular con la hembra, debido a que no fue un experimento controlado.

- VIII. Los resultados obtenidos sugieren que no existe evidencia de la existencia de alguna estructura anatómica o funcional, que permita el mantenimiento aislado de los espermatozoides de cada macho dentro del tracto genital de la hembra, por lo que el semen utilizado para la fertilización de los huevos es una mezcla de fluido seminal dentro del tracto genital de la hembra.
- IX. No se encontró relación entre la frecuencia de paternidad múltiple y la capacidad reproductiva de las hembras (tamaño de nidada y porcentaje de eclosión, tamaño de la hembra (LCC)).
- X. En las variables analizadas, no se encontró evidencia de efecto paterno en la adecuación de las crías.

REFERENCIAS GENERALES

- Alam, S. K. y M.S. Brim. 2000. Organochlorine, PCB, PAH and metal concentrations in eggs of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from Northwest Florida, USA. *Journal of environmental Science and Health* 35: 705-724.
- Alvarado, J., A. Figueroa y H. Gallardo. 1985. Ecología y conservación de las tortugas marinas de Michoacán, México. UMSNH. Cuaderno de Investigación 4. 44 pp.
- Bárcenas-Ibarra, A. y A. Maldonado-Gasca. 2009. Malformaciones en embriones y neonatos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivácea*) en Nuevo Vallarta, Nayarit, México. *Veterinaria México* 40: 371-380.
- Bishop, C.A., G.P. Brown, R.J. Brooks, D.R.S. Lean y J.H. Carey. 1994. Organochlorine contaminant concentrations in eggs and their relationship to body size and clutch characteristics of the female common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) in Lake Ontario, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27: 82-87.
- Bowen, W.B., A.B. Meylan, J.P. Ross, C.J. Limpus, G.H. Balazs y C.J. Avise. 1992. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46: 865-881.
- Bujes, C.S. y L. Verrastro. 2007. Supernumerary epidermal shields and carapace variation in Orbigny's slider turtles, *Trachemys dorbigni* (Testudines, Emydidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 24: 666-672.

- Chassin N., O. 2004. Variabilidad genética y paternidad múltiple de la tortuga verde del pacífico oriental (*Chelonia mydas* Linnaeus 1758). Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias Biomédicas. UNAM. México.
- Claude, J., E. Paradis, H. Tong y J.C. Auffray. 2003. A geometric morphometric assessment of the effects of environment and cladogenesis on the evolution of the turtle shell. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 485-501.
- Davis, A.K. y A.M. Grosse. 2008. Measuring fluctuating asymmetry in plastron scutes of yellow-bellied sliders: the importance of gender, size and body location. *The American Midland Naturalist* 159: 340-348.
- Delgado, C.T. 2003. Historia de vida y conservación de la población de tortuga negra (*Chelonia agassizii*) que anida en Michoacán. M. C. Tesis. Facultad de Biología. UMSNH. 109 pp.
- Depecker, M., C. Berge, X. Penin y S. Renous. 2006. Geometric morphometrics of the shoulder girdle in extant turtles (Chelonii). *Journal of Anatomy* 208: 35-45.
- Domokos, G. y P.L. Várkonyi. 2008. Geometry and self-righting of turtles. *Proceedings of the Royal Society Biological Science* 275: 11-17.
- Dutton, P.H., T.G. Davis y D. Owens. 1996. Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-Leucine tRNA and control region of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 511-521.
- Figueroa , A. y J. Alvarado.1990. Morphometric comparison of the *Chelonia* populations of Michoacan, Mexico and Tortuguero, Costa Rica. In: *Proceedings of the Tenth Annual Workshop on Sea Turtle Biology and*

- Conservation. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Tec. Mem. NMFS-SEFC. 286 pp.
- Ischer, T., K. Ireland y D.T. Booth. 2009. Locomotion performance of green turtle hatchlings from the Heron Island Rookery, Great Barrier Reef. *Marine Biology* 156: 1399-1409.
- Kamezaki, N. y M. Matsui. 1995. Geographic variation in the skull morphology of the green turtle (*Chelonia mydas*) with a taxonomic discussion. *Journal of Herpetology* 29: 1-60.
- Karl, S.A., B.W. Bowen y J.C. Avise. 1992. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. *Genetics* 131: 163-173.
- Karl, S.A. y B.W. Bowen. 1999. Evolutionary Significant Units versus Geopolitical Taxonomy: molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*) *Conservation Biology* 13: 990-999.
- Koch, V., W.J. Nichols, H. Peckham y V. de la Tobo. 2006. Estimates of sea turtle mortality from poaching and by catch in Bahia Magdalena, Baja California Sur, Mexico. *Biological Conservation* 128: 327-334.
- Mast, B.R. y J.L. Carr. 1989. Carapacial scute variation in Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempii*) hatchlings and juveniles. In: *Proceeding of the First International Symposium on Kemp's Ridley Sea Turtle Biology. Conservation and Management*. Texas A. and M. University Sea Grant College Program Galveston. 202-219 pp.

- Myers, E.M., F.J. Janzen, D.C. Adams y J.K. Tucker. 2006. Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). *Evolution* 60: 563-572.
- Norma Oficial Mexicana NOM NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres, Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. SEMARNAT. México.
- Özdemir, B. y O. Türkozan. 2006. Carapacial scute variation in green turtle, *Chelonia mydas* hatchlings in northern Cyprus. *Turkish Journal of Zoology* 30: 141-146.
- Pritchard, P.C. 1997. Evolution, Phylogeny and Current Status. In: Lutz, L. y A.J. Musick. (Eds). *The biology of sea turtles*. CRC Press. Inc. U.S.A. 432 pp.
- Reid, K.A., D. Margaritoulis y J.R. Speakman. 2009. Incubation temperature and energy expenditure during development in loggerhead sea turtle embryos. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 378: 62-68.
- Rivera, G. y J. Claude. 2008. Environmental media and shape asymmetry: a case study on turtle shells. *Biological Journal of The Linnean Society* 94:483-489.
- Söderman, F., S. Van Dongen, S. Pakkasmaa y J. Merilä. 2007. Environmental stress increases skeletal fluctuating asymmetry in the moor frog *Rana arvalis*. *Oecologia* 151: 593-604.
- Torezani, E., C. Baptistotte, S.L. Mendes y P.C.R. Barata. 2010. Juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) in the effluent discharge channel of a steel plant,

Espirito Santo, Brazil, 2000-2006. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90: 233-246.

Valenzuela, N., D.C. Adams, R.M. Bowden y A.C. Gauger. 2004. Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: a powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. *Copeia* 4: 735-742.