

**Informe final\* del Proyecto L166**  
**Estructura genética y conservación de la tortuga negra *Chelonia agassizi* en el Pacífico mexicano**

**Responsable:** Biól. Omar Chassin Noria

**Institución:** Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Ecología  
Departamento de Ecología Evolutiva  
Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución

**Dirección:** Circuito Exterior Ciudad Universitaria, Copilco Universidad, Coyoacán, México, DF, 04510, México

**Correo electrónico:** [ochassin@miranda.ecologia.unam.mx](mailto:ochassin@miranda.ecologia.unam.mx)

**Teléfono/Fax:** 622 9001 Fax: 622 8995

**Fecha de inicio:** Septiembre 15, 1997

**Fecha de término:** Diciembre 3, 1999

**Principales resultados:** Base de datos, Informe final, Hoja de cálculo

**Forma de citar\*\* el informe final y otros resultados:** Chassin Noria O., 2000. Estructura genética y conservación de la tortuga negra *Chelonia agassizi* en el Pacífico mexicano. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L166.** México D. F.

**Forma de citar hoja de cálculo** Chassin Noria O., 2000. Estructura genética y conservación de la tortuga negra *Chelonia agassizi* en el Pacífico mexicano. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. **Hoja de cálculo SNIB-CONABIO proyecto No. L166.** México D. F.

**Resumen:** En el presente trabajo se determinará la distribución tiempo-espacial de la variabilidad genética en la tortuga negra *Chelonia agassizi* del Pacífico mexicano empleando la variación presente en la región control del mtDNA para identificar: las unidades de manejo MUs, tamaño efectivo, estructura y dinámica genética de la población. Esto permitirá generar una propuesta de conservación dirigida a las regiones prioritarias identificadas para esta especie. Con base en los haplotipos obtenidos se realizará la estimación de la distancia genética y relaciones cladistas de las poblaciones de *Chelonia agassizi* del Pacífico mexicano. Las muestras para el estudio se obtendrán a partir de sangre de hembras anidadoras, teniendo precaución de no coleccionar muestras provenientes de una misma tortuga, y músculo de una cría por nido, muerta antes o después de la eclosión. De la sangre y músculo se obtendrá el DNA necesario para la elaboración de este trabajo. Actualmente se cuenta con 84 muestras de DNA obtenidas en la costa Michoacana en la temporada de anidación 1996-1997.

---

• \* El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)

• \*\* El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

**INFORME FINAL** (Convenio No. FB437/L166/97).

**TITULO.** Estructura genética, y conservación de la tortuga negra *Chelonia agassizi* en el Pacífico Mexicano.

**INSTITUCIÓN:** Instituto de Ecología, UNAM. Laboratorio de Genética y Evolución.

**PARTICIPANTES DEL PROYECTO.**

---

**Biol. Omar Chassin Noria.**  
(Responsable)  
Estudiante de Posgrado Fac. Ciencias  
UNAM.

---

**Dr. F Alberto Abreu Grobois.** (Asesor).  
Investigador Asociado T.C.  
Instituto de Ciencias del Mar y  
Limnología, UNAM.

---

**Dr. Daniel Piñero Dalmau.** (Asesor).  
Investigador Titular. T.C.  
Instituto de Ecología, UNAM.

**AREA.** Ecología y genética de la conservación. **GRUPO.** Zoológico. **AMBIENTE.** Marino.

**REGIONES PRIORITARIAS.**

El área de estudio comprende la región costera de 3 áreas prioritarias: Chamela-Cabo Corriente, Jalisco; Sierra de Coalcomán, Michoacán; Manglares de Chacahua-Maniltepec, Oaxaca.

**ESPECIE.** Tortuga negra o prieta *Chelonia agassizi* (Bocourt, 1868) considerada en peligro de extinción en la norma oficial vigente (NOM-059-ECOL/1994).

**PALABRAS CLAVE.** *Chelonia agassizi*; tortuga negra; mtDNA; genética y conservación.

# INDICE

---

<b>RESUMEN DEL ANÁLISIS REALIZADO EN ESTE TRABAJO</b>	<b>2</b>
<b>RESUMEN DE CONCLUSIONES OBTENIDAS EN ESTE TRABAJO</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>3</b>
OBJETIVOS PARTICULARES.	3
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>3</b>
OBTENCIÓN DE MUESTRAS	3
EXTRACCIÓN DE DNA, AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL DEL MTDNA Y SECUENCIACIÓN	4
<b>RESULTADOS</b>	<b>4</b>
<b>DELIMITACIÓN DE LAS UNIDADES DE MANEJO (MU) Y ÁREAS PRIORITARIAS DE CONSERVACIÓN DE <i>CHELONIA AGASSIZI</i> EN EL PACÍFICO MEXICANO.</b>	<b>4</b>
ANÁLISIS DE ESTRUCTURA GENÉTICA	7
<b>VARIABILIDAD GENÉTICA</b>	<b>13</b>
DIVERSIDAD GENÉTICA (H)	13
DIVERSIDAD DE NUCLEÓTIDO $\pi_N$	13
FRECUENCIA DE HAPLOTIPO	13
<b>RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO CHELONIA</b>	<b>16</b>
<b>RELACIONES DE SIMILITUD DEL GÉNERO CHELONIA</b>	<b>20</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>21</b>
<b>HOJA DE CALCULO</b>	<b>21</b>
<i>Haplotipo E</i>	21
<i>Haplotipo F</i>	22
<i>Haplotipo H</i>	22
<i>Haplotipo I</i>	22
<i>Haplotipo M</i>	22
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>22</b>

## RESUMEN DEL ANÁLISIS REALIZADO EN ESTE TRABAJO

En el presente trabajo se realizó un análisis de la variabilidad y estructura genética de la tortuga negra *Chelonia agassizi*, con la finalidad de definir unidades de manejo (MU, Moritz 1994) en las poblaciones anidadoras de la costa Pacífico sur de México. También se realizó un análisis filogenético del género *Chelonia*, para definir si este género es mono-específico (*Ch. mydas*) o bi-específico (*Ch. mydas* y *Ch. agassizi*).

Se trabajó con DNA obtenido de muestras de sangre y/o tejido. El marcador molecular empleado fue la secuencia de 400 pares de bases de la region control del mtDNA. Se obtuvieron 135 secuencias con 5 haplotipos diferentes.

Para el análisis de variabilidad genética se obtuvieron los valores de diversidad haplotípica (H) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), y para determinar la distribución de la variabilidad genética (estructura genética) se realizaron análisis de varianza molecular (AMOVA).

La reconstrucción filogenética se realizó con 6 haplotipos de *Ch. agassizi*, 7 de *Ch. mydas* y uno de *Caretta caretta* como grupo externo, realizando una búsqueda de "branch and bound" y realizando un consenso de mayoría para los cladogramas obtenidos.

## RESUMEN DE CONCLUSIONES OBTENIDAS EN ESTE TRABAJO

- La variabilidad genética de la tortuga negra *Chelonia agassizi* en el Pacífico Mexicano se encuentra distribuida homogéneamente y no se detecta más de una Unidad de Manejo. La población anidadora se comporta como una sola población panmítica.
- Aún con la carencia de estructura genética entre las poblaciones anidadoras las playas de Colola, Maruata y Paso de Noria en Michoacán y Barra de la Cruz en Oaxaca son peculiares por los haplotipos presentes en esas localidades. Se recomienda mantener las actividades de conservación en esas playas para asegurar el mantenimiento de estos haplotipos.
- La variabilidad genética de la población anidadora de la tortuga negra *Chelonia agassizi* en el Pacífico Mexicano no está notablemente mermada debido a que no ha transcurrido suficiente tiempo desde el cuello de botella sufrido por esta población (hace un par de décadas) para que la endogamia y deriva génica se evidencien.
- No se soporta la asignación de especie para la tortuga negra *Chelonia agassizi* del Pacífico Mexicano con base a la evidencia molecular empleando un tamaño de muestra de 135 individuos. Sin embargo, se recomienda el uso de este nombre hasta que exista una modificación formal del estatus de esta especie descrita por Bocourt en 1868.

## **PRODUCTOS QUE SE ENTREGARÁN AL CONCLUIR ESTE TRABAJO.**

- I. -Delimitación del número de unidades de manejo (MU) y áreas prioritarias de conservación de *Chelonia agassizi* en el Pacífico Mexicano.
- II. -Estimación de la variabilidad y estructura genética de *Ch. agassizi*.
- III. -Establecimiento de las relaciones filogenéticas dentro de las subpoblaciones de *Ch. agassizi* del pacífico.
- IV. -Hoja de cálculo en medio magnético con los datos crudos de este trabajo.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Describir la estructura genética de la tortuga negra *Chelonia agassizi* del Pacífico Mexicano permitiendo evaluar el estado genético de la población e identificar las unidades de manejo (MU).

## **Objetivos PARTICULARES.**

1. Determinar la distribución tiempo-espacial de la variabilidad genética identificada con marcadores moleculares en las colonias de tortuga negra *Ch. agassizi* que anidan en el litoral del Pacífico Mexicano.
2. Describir la estructura genética de la tortuga negra *Chelonia agassizi* de la costa Pacífico de México, para generar propuestas que permitan optimizar la conservación de las poblaciones.
3. Obtener estimaciones del flujo génico entre colonias reproductoras.
4. Determinar si existen cambios en la estructura genética de las tortugas anidadoras *Ch. agassizi* entre dos temporadas de anidación.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de Muestras**

Los métodos de colecta del material Biológico para este trabajo (sangre y tejido sólido) no afectan a la población. De las tortugas adultas se colecta 1 ml de sangre sin causar daño a los organismos empleando el método reportado por Owens y Ruiz (1980). En el caso de colecta de tejido sólido se emplean crías muertas en el nido de manera que no se requiere el sacrificio ni la manipulación de crías vivas. Las muestras son preservadas empleando solución amortiguadora lítica para muestras de sangre y solución amortiguadora SED para tejido (Dutton 1996a)

Se obtuvieron los permisos de colecta e investigación científica para individuos de tortuga negra *Chelonia agassizi* DOO 550.-4628/96 y DOO 750.-7562/97 otorgados el 26 de septiembre de 1996 y 3 de septiembre de 1997

respectivamente, por la Dirección General de Vida Silvestre, INE-SEMARNAP.

### **Extracción de DNA, amplificación de la región control del mtDNA y secuenciación**

El presente trabajo se realizó con DNA pues esto permite situarnos en el último nivel de interés genético así como observar la variación existente entre los organismos de manera discreta (se detectan cambios en una, dos...n bases ). Se emplea mtDNA de la región control pues se sabe esta evoluciona de 5 a 10 veces más rápido que los marcadores nucleares (Cann et al. 1987), lo cual permitió identificar variación en las tortugas que se ha observado tienen una tasa de evolución de 5 a 10 veces menor con respecto a otros vertebrados (Avise et al. 1992).

El DNA se obtuvo empleando el High Pure PCR Template Preparation Kit (Boehringer-Mannheim) y la amplificación de la región control del mtDNA empleando la PCR con los oligonucleótidos LTCM1 y HDCM1 (Allard *et. al.* 1994). El producto de PCR fue purificado empleando QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) y posteriormente se obtuvo la secuencia de DNA con un secuenciador automático (Applied Biosystems modelo 373A).

## **RESULTADOS**

### **DELIMITACIÓN DE LAS UNIDADES DE MANEJO (MU) Y ÁREAS PRIORITARIAS DE CONSERVACIÓN DE *CHELONIA AGASSIZI* EN EL PACÍFICO MEXICANO.**

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

- Las poblaciones o grupos de poblaciones que están aisladas y han evolucionado de manera independiente por largos periodos de tiempo definidas como Unidades Evolutivas Significativas ESU (Evolutionary Significant Units).
- Poblaciones demográficamente independientes dentro de las ESU definidas como Unidades de Manejo MU (Management Units).

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

En tortugas marinas resulta relevante determinar las unidades de manejo para dirigir las actividades de conservación, en este contexto es importante definir que es una unidad de manejo, ¿Una Playa? ¿Varias playas de un mismo estado de la república? o ¿Una región costera que comprende varios estados?.

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

En el presente trabajo se obtuvieron 135 secuencias de nucleótidos a partir de las 210 muestras colectadas en la costa del Pacífico Sur de México. En estas 135 secuencias se identificaron 5 haplotipos diferentes, el número de individuos para cada haplotipo y la frecuencia relativa de los mismos se muestra en la tabla 1. Los haplotipos tienen 8 posiciones polimórficas, con 6 transiciones 2 transversiones y 0 indels en los 400 pares de bases analizados de la región control del mtDNA (tabla 2). En la Figura 1 se muestra el alineamiento de los 5 haplotipos realizado con ClustalV para PC versión 1.7 (Higgins, 1991) y revisado a ojo empleando GeneDoc para PC versión 2.2.0 (Nicholas et al. 1997). En la tabla 3 se muestran los sitios de colecta, el número de secuencias y haplotipos por playa.

Haplotipo	Número de individuos	Frecuencia relativa
E	88	0.6519
F	40	0.2963
H	1	0.0074
I	2	0.0148
M	4	0.0296
Total	135	1.0000

**Tabla 1.** Haplotipos identificados en el presente trabajo designados con una letra para diferenciarlos, número de individuos de cada haplotipo y frecuencia relativa de los haplotipos.

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

**Tabla 2.** Posiciones polimórficas de los haplotipos encontrados y tipo de sustitución. En claro se muestran las transiciones y sombreado transversiones

TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTGGCCCTAAACATGAAAAATTATTG ATCCACATAAAATATTTTGATAAC  
TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTGGCCCTAAACATGAAAAATTATTG ATCCACATAAAATATTTTGATAAC  
TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTGGCCCTAAACATGAAAAATTATTG ATCCACATAAAATATTTTGATAAC  
TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTGGCCCTAAACATGAAAAATTATTG ATCCACATAAAATATTTTGATAAC  
TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTGGCCCTAAACATGAAAAATTATTG ATCCACATAAAATATTTTGATAAC

ATGAATATTAAGCAGAG ATTAAAAAGTGAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTC  
ATGAATATTAAGCAGAG ATTAAAAAGTGAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTC  
ATGAATATTAAGCAGAG ATTAAAAAGTGAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTC  
ATGAATATTAAGCAGAG ATTAAAAAGTGAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTC  
ATGAATATTAAGCAGAG ATTAAAAAGTGAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTC

ACAGTAATTGGTTATTTCTTAA AGCTATTCACGAGAAAAAAGCAACCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTC  
ACAGTAATTGGTTATTTCTTAA AGCTATTCACGAGAAAAAAGCAACCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTC  
ACAGTAATTGGTTATTTCTTAA AGCTATTCACGAGAAAAAAGCAACCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTC  
ACAGTAATTGGTTATTTCTTAA AGCTATTCACGAGAAAAAAGCAACCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTC  
ACAGTAATTGGTTATTTCTTAA AGCTATTCACGAGAAAAAAGCAACCCTTGTTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTC

AGGCCCATTTAGTTTA AGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTCTTTTCAGGCACATACAAAATAACAAC  
AGGCCCATTTAGTTTA AGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTCTTTTCAGGCACATACAAAATAACAAC  
AGGCCCATTTAGTTTA AGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTCTTTTCAGGCACATACAAAATAACAAC  
AGGCCCATTTAGTTTA AGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTCTTTTCAGGCACATACAAAATAACAAC  
AGGCCCATTTAGTTTA AGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTCTTTTCAGGCACATACAAAATAACAAC

GTTTCATTTCCTCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTT  
GTTTCATTTCCTCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTT  
GTTTCATTTCCTCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTT  
GTTTCATTTCCTCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTT  
GTTTCATTTCCTCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGAATGAGTTCTATACATTAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTT

**Figura 1.** Alineamiento de los 5 haplotipos obtenidos de las muestras del presente trabajo (Pacífico oriental, México)

El principal argumento para el cambio de metodología propuesto en el proyecto (usar secuencias en lugar de RFLP's) es que con RFLP's no siempre se pueden discernir entre todos los haplotipos presentes en una población, y esto se evidenció con la simulación del análisis de enzimas de restricción que permiten la restricción diferencial entre los 5 haplotipos encontrados. Este análisis se realizó con el programa Webcutter 2.0, (Heiman, 1997) que, busca los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción sobre los distintos haplotipos en una base de datos que contiene las enzimas de restricción comerciales descritas a la fecha (más de 400). Evaluando los resultados se comprueba que de los 5 haplotipos encontrados solo se pueden diferenciar 3 usando enzimas de restricción (E, F e I) y los dos restantes (H y M) se considerarían iguales. En este análisis (ver tabla 4) queda claro que de haber continuado con la estrategia original estos haplotipos (H y M) no habrían sido detectados. Se obtuvieron 4 patrones de restricción en los 5 haplotipos, estos patrones son denominados con números del 1 al 4 como se muestra en la fila inferior de la tabla 4.

Estado	Playa	Secuencias	HAPLOTIPOS				
			E	F	H	I	M
Colima	Cuyutlán	3	1	2			
	Chupadero	2		2			
Michoacán temporada 96-97	Colola	33	21	10		2	
	Maruata	11	6	4	1		
	Paso de Noria	2	1	1			
	Arenas Blancas	8	4	1			3
Michoacán temporada 97-98	Colola	37	27	10			
	Maruata	8	4	4			
	Paso de Noria	13	12	1			
	Arenas Blancas	11	7	4			
Guerrero	Tierra Colorada	4	3	1			
Oaxaca	Chacagua	1	1				
	Mazunte						
	Barra de la cruz	2	1				1
	Sumas	135	82	40	1	4	4

**Tabla 3.** Se muestran los sitios de colecta, el número de muestras, secuencias y haplotipos por playa.

### Analisis de estructura genetica

Para estimar la estructura genética de la población se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), empleando el algoritmo de Arlequín para PC versión 1.1. (Schneider et al. 1997) Este análisis es similar otros que emplean la varianza de las frecuencias génicas, pero considera también el número de mutaciones que ocurren entre haplotipos empleando un análisis jerárquico para evaluar las diferencias dentro y entre individuos de una subpoblación y entre subpoblaciones, para definir los índices de fijación definidos por Wright en función de coeficientes de endogamia, y posteriormente en cuanto a tiempos de coalescencia por Slatkin (1991).

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

Donde  $f_0$  es la probabilidad de que dos genes tomados de la misma población sean idénticos por descendencia,  $f_1$  es la probabilidad de que dos genes tomados de diferentes poblaciones sean idénticos por descendencia;  $\bar{t}_1$  es el tiempo promedio a la coalescencia de dos genes tomados de diferentes poblaciones y  $\bar{t}_0$  es el tiempo promedio a la coalescencia de dos genes tomados al azar de una misma población.

Para el análisis de estructura genética se obtuvieron los valores de Fst de dos agrupaciones distintas (tabla 5 A y B):

- A. Para evaluar la presencia de estructura genética temporal de las tortugas en las diferentes temporadas de anidación tenemos las muestras de 2 temporadas distintas para Michoacán (temporada 96-97 designadas Colola 1, Maruata 1, Paso de Noria 1 y Arenas Blancas 1; para la temporada 97-98 Colola 2 y así respectivamente para el resto de las localidades de Michoacán).
- B. Para evaluar la presencia de estructura genética espacial se realizó un análisis considerando a cada playa como una subpoblación incluyendo a las playas del estado de Michoacán<sup>1</sup>

Enzima(s)	Posición <sup>2</sup>	Haplotipos				
		E	F	H	I	M
Hinfl	56- g/antc	+	+	+	-	+
Tfil	56- g/awtc	+	+	+	-	+
DpnII, NdeII, Sau3AI, Bsp143I, Kzo9I, MboI	56- /gatc	-	-	-	+	-
BstYI, BstX2I, Mfil, XhoII	56- r/gatcy	-	-	-	+	-
BamHI, BstI	56- g/gatcc	-	-	-	+	-
NlaIV, PspN4I	58- ggn/ncc	-	-	-	+	-
DpnI	58- ga/tc	-	-	-	+	-
MnII	98- cctc	-	+	-	-	-
Sse9I, TspEI, Tsp509I	97- /aatt	+	-	+	+	+
BsoFI, Fsp4HI, Ital	184- gc/ngc	-	+	-	-	-
Mapa de restricción		1	2	3	4	3

**Tabla 4.** Enzimas de restricción que permiten diferenciar los haplotipos E, F e I, los haplotipos H y M (en negritas) no son distinguibles. Signo + indica presencia de sitio de corte en el haplotipo y signo - ausencia de sitio de corte. El mapa de restricción se refiere a como se define a cada patrón de restricción esta nomenclatura es usada en la base de datos.

Como puede observarse los valores de  $F_{st}$  son bajos en general:

- En A se observa que no existe estructura entre las tortugas anidadoras de dos temporadas de Michoacán
- En B se obtienen valores igualmente bajos de manera que estadísticamente no hay estructura entre las distintas playas de anidación.

Se estimó flujo génico ( $Nm$ ) entre las subpoblaciones. El flujo génico se define como el número de migrantes en pares de poblaciones por generación. Es posible estimar este valor de manera indirecta sí: (A) se considera que la tasa de mutación  $\mu$  es muy baja, tal y como ha sido reportado para tortugas marinas (Awise et al. 1992)

<sup>1</sup> Los valores de  $F_{st}$  para las dos temporadas de anidación de Michoacán (agrupación A) son bajos por ello se agrupó a las secuencias de dos temporadas de anidación en una misma playa (Ej. Colola1 + Cola2 = Colola)

<sup>2</sup> La posición de reconocimiento es el sitio del corte con la enzima en los haplotipos, seguido después de un guión la secuencia de reconocimiento de la enzima, representado con una diagonal el sitio exacto de corte

(B) si existe una relación de equilibrio entre migración y deriva génica. Esto se realiza a partir de los valores de  $F_{st}$ .

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

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

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

A		B	
	$F_{st} = 0.0168 (P < 0.01)$	Cuyutlán	$F_{st} = 0.06587 (P < 0.01)$
		Chupadero	
Colola 1		Colola	
Colola 2			
Maruata 1		Maruata	
Maruata 2			
P. de Noria 1		Paso de Noria	
P. de Noria 2			
Arenas Blancas 1		Arenas Blancas	
Arenas Blancas 2		Tierra Colorada	
		Barra de la cruz	

**Tabla 5 A y B.** Valores de  $F_{st}$  obtenidos para distintas formas de agrupar las secuencias obtenidas (ver texto).

Esta estimación indirecta del flujo génico, contiene información relevante desde el punto de vista histórico y no de la dinámica de la población actual esto porque es muy fácil que las poblaciones de organismos violen alguna de los supuestos. Las estimaciones de flujo génico obtenidas a partir de  $F_{st}$  no deben considerarse como precisas ( Withlock y Mccauley 1999, Bohonak 1999). Sin embargo, como obtener estimaciones directas del flujo génico de tortugas marinas es logísticamente muy complicado en el presente trabajo calculamos el flujo génico de manera indirecta.

Para determinar el aislamiento reproductivo de las playas empleamos las frecuencias haplotípicas partiendo del siguiente hecho: si dos poblaciones se encuentran aisladas por periodos de tiempo significativos en marcadores neutrales se puede dar un cambio cualitativo y cuantitativo de las frecuencias alélicas por mutación, deriva génica y/o endogamia (la región control del DNAm, no esta sujeta a selección ni sufre recombinación, Anderson et al. 1981, Giles et al. 1980, Cann et al. 1987). Se ha determinado que si un par de poblaciones no se encuentran aisladas reproductivamente, intercambiando al menos un organismo

migrante que se reproduzca por generación, no es posible que ocurran procesos de diferenciación genética. Es posible, por tanto, estimar la cantidad flujo génico ( $Nm$ ) a partir de diferenciación genética entre dos poblaciones. Los valores de flujo génico en las diversas agrupaciones se muestran en la tabla 6 a y b.

Una medida de estructura (diferenciación genética) es la  $F_{st}$  que es obtenida por un análisis molecular de varianza (en sentido estricto la nomenclatura determina que de un AMOVA se obtiene  $\Phi_{st}$  que es análogo a  $F_{st}$ ). Los valores de  $F_{st}$  representan como se encuentra distribuida la variación genética entre poblaciones y toma valores de entre 0 y 1. Si  $F_{st}$  tiene valores cercanos a cero esto implica que la variación genética se encuentra distribuida homogéneamente de manera que si conservamos una subpoblación, estamos conservando la variación genética de la especie. Si  $F_{st}$  tiene valores de 1 esto implica que la variación genética esta distribuida heterogéneamente de manera que la mayor parte de la variación genética se encuentra entre las subpoblaciones.

Con fines de conservación es mejor que existan valores bajos de  $F_{st}$  pues esto indica que al menos desde el punto de vista genético no es necesario conservar todas las subpoblaciones, (esto no ha de ser un criterio que se use indiscriminadamente, pero puede ser útil cuando existen recursos limitados para conservación y es necesario jerarquizar a las distintas subpoblaciones de una especie para optimizar los recursos destinados a conservación).

	Colola 1	Maruata 1	Paso de Noria 1	Arenas Blancas 1	Colola 2	Maruata 2	Paso de Noria 2	Arenas Blancas 2	Cuyutlán	Chupader	Tierra Colorada
Maruata 1	Inf										
Paso de Noria 1	Inf	inf									
	1.93026	2.53732	14.2544								
Colola 2	Inf	inf	Inf	1.84826							
Maruata 2	Inf	inf	Inf	1.71738	10.8623						
Paso de Noria 2	4.79949	3.05947	0.94499	1.86968	8.74617	1.04					
Arenas Blancas 2	Inf	inf	inf	2.37952	Inf	inf	2.8283				
Cuyutlán	8.51665	inf	inf	1.44974	2.56815	inf	0.37699	inf			
Chupadero	0.70803	1.01578	inf	0.49482	0.4602	2.66667	0.08754	0.86275	inf		
Tierra Colorada	Inf	inf	inf	13.9092	inf	inf	inf	inf	33.9999	0.44444	
Barra de la Cruz	1.12493	1.47478	196.218	inf	0.99041	1.0184	0.56792	1.25839	1.04012	0.24811	3.95156

**Tabla 6a.** valores de flujo génico (Nm) de acuerdo a la agrupación A de estructura genética, ver tabla 5A.

	Colola	Maruata	Paso de Noria	Arenas Blancas	Cuyutlán	Chupadero	Tierra Colorada
Maruata	137.80287						
Paso de noria	20.10799	3.5559					
Arenas blancas	24.74015	16.91687	20.87926				
Cuyutlán	3.67762	inf	0.66832	6.18758			
Chupadero	0.56316	1.35395	0.16854	0.84202	inf		
Tierra Colorada	inf	inf	inf	inf	33.99997	0.44444	
Barra de la Cruz	1.00462	1.05675	0.81091	inf	1.04012	0.24811	3.95156

**Tabla 6b.** valores de flujo génico (Nm) de acuerdo a la agrupación B de estructura genética, ver tabla 5B.

## **IMPLICACIONES DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA PARA CONSERVACIÓN**

Cuando la variabilidad genética se encuentra distribuida de manera homogénea, esto implica que si se conserva al menos una población se tendrá representada toda la variabilidad genética de la especie. Si la variabilidad genética no está distribuida de manera homogénea, entonces es importante determinar entre cuales subpoblaciones se encuentra contenida toda la variabilidad genética para priorizar los esfuerzos de conservación en estas.

Esta aseveración es tomando en cuenta únicamente los elementos genéticos, es importante considerar los elementos demográficos de la especie de manera que sea posible hacer una propuesta integral.

A pesar de que los indicadores de estructura genética muestran que la variabilidad genética de las poblaciones anidadoras del Pacífico Mexicano está distribuida de manera homogénea, esto puede deberse a la abundancia de hembras anidadoras en las distintas playas reflejándose en el muestreo. Es evidente que el estado de Michoacán del que setienen mas muestras, esto se explica por la abundancia de tortugas anidadoras más que por el esfuerzo de muestreo. Es posible que en décadas anteriores la población de otros estados fuera más abundante y que por la explotación estas poblaciones estén disminuidas. Como ejemplo de la reducción que ha sufrido la tortuga negra podemos citar la tesis de Ruiz, 1978 en la que se obtuvieron 11 muestras de sangre de tortuga negra en una semana de trabajo cerca de Mazunte, Oaxaca, mientras que en la temporada de 1997 (octubre de 1997 a febrero de 1998) solo se obtuvieron 9 muestras de tres localidades del estado de Oaxaca (Chacagua, Mazunte, Barra de la Cruz)

Aún con los indicadores de distribución homogénea de la variabilidad genética es evidente que existen algunas playas que tienen características genéticas peculiares. Es el caso de la playa de Colola, Mich. en donde se encontraron 2 tortugas con haplotipo I. Maruata, Mich. en donde se encontró una tortuga con Haplotipo H. Arenas Blancas, Mich. y Barra de la Cruz, Oax. en las que se encontraron 3 y 1 tortugas respectivamente que tenían el haplotipo M. Es importante que en estas playas existan actividades de conservación para salvaguardar estos haplotipos poco abundantes.

Si la población anidadora se comporta como una población panmítica se reducen las posibilidades de que con la pérdida de una subpoblación se presente un impacto negativo, determinante en el futuro de la especie desde el punto de vista genético. Sin embargo, se ha propuesto que subpoblaciones aisladas conservan la variabilidad genética de manera más eficiente que una sola población panmitica de tamaño similar (Pope 1996).

Las poblaciones anidadoras analizadas en este trabajo no se encuentran aisladas por lo que no es posible definir las unidades de manejo de acuerdo con la información genética obtenida.

## VARIABILIDAD GENÉTICA

El análisis de las secuencias para determinar la estructura y variabilidad genética se realizó con el programa Arlequin versión 1.1. (Schneider et al. 1997) Existen varios estimadores de la variabilidad genética que se emplean cuando se trabaja con secuencias de DNA, las medidas más comunes son:

### Diversidad genética (H)

Esta medida es equivalente a la heterocigosis esperada obtenida de datos diploides, y se define como la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes (Nei, 1987 pp. 180).

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

Y la varianza es definida por la siguiente formula:

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

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

### Diversidad de Nucleótido $\pi_n$

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

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} P_i P_j d_{ij}}{L}$$

y la varianza se obtiene de

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

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

### Frecuencia de haplotipo

Si un haplotipo es observado  $x_i$  veces en una muestra que contiene  $n$  secuencias entonces la frecuencia del haplotipo  $i$  ( $P_i$ ) se obtiene con la siguiente formula

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

y la varianza esta dada por:

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

Los valores de variabilidad genética encontrados en este trabajo se muestran en la tabla 7, junto con datos de otro trabajo de tortuga del genero *Chelonia* (Encalada, 1996) para ser comparados y evaluar como es la variabilidad de las poblaciones en este trabajo.

La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes y la diversidad nucleotídica es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes. Cuanto más altos sean estos valores mas alta es la variabilidad genética de la población. La variabilidad genética puede ser reducida en poblaciones pequeñas y una escasa variabilidad genética disminuye la capacidad de una población para adaptarse a cambios ambientales, generando la disminución de la adecuación de los individuos. Por esto el mantenimiento de las poblaciones requiere la preservación de la variabilidad genética.

La diversidad haplotípica es lo mismo que la heterocigosis esperada empleada frecuentemente en estudios de electroforesis de isoenzimas. Tiene poco valor en el análisis de secuencias debido a que cuando se analizan secuencias donde existen diferencias entre haplotipos de una sola base se consideran diferentes por lo que generalmente los valores de H obtenidos de secuencias son altos y no es objetivo compararlos con los valores de H obtenidos a partir de isoenzimas. Si además los valores de H obtenidos a partir de secuencias son cercanos a uno no es posible diferenciar loci o subpoblaciones por lo que esta medida pierde valor para interpretación biológica. Es importante observar la varianza de H que se ve afectada por el tamaño de muestra de cada subpoblación.

Para las muestras obtenidas el valor más alto de H es para las playas de Chacagua y Barra de la Cruz Oaxaca.  $H = 1$  En Chacagua esto es obvio pues solo se tiene una muestra y en Barra de la Cruz se tienen dos muestras con haplotipos diferentes. Debido al pequeño tamaño de muestra tiene mas relevancia en este caso considerar a estas dos playas como una subpoblación (Oaxaca) con valor de H de 0.67. y con una menor varianza, que es igual la playa de Cuyutlán, Colima.

Arenas Blancas es la playa que más variabilidad presenta en H con respecto a las playas de Michoacán a pesar de que recibe una población de aproximadamente 30 hembras anidadoras por temporada, de manera que aun cuando demográficamente no es importante desde el punto de vista genético, si lo es, por los niveles de variabilidad de esta localidad así como por ser la única playa del estado de Michoacán en la que se encuentran tortugas con haplotipo M.

Población		Tamaño de muestra (n)	Diversidad Haplotípica	Diversidad Nucleotídica
Colima	Cuyutlán	3	0.67 ± 0.31	0.0050
	Chupadero	2	0.00 ± 0.00	0.0000
Michoacán	Colola *	70	0.45 ± 0.05	0.0033
	Maruata	19	0.57 ± 0.06	0.0041
	Paso de Noria	15	0.25 ± 0.13	0.0018
	Arenas Blancas	19	0.60 ± 0.09	0.0052
Guerrero	Tierra Colorada	4	0.50 ± 0.26	0.0038
Oaxaca	Chacagua	1	1.00 ± 0.00	0.0000
	Barra de la Cruz	2	1.00 ± 0.50	0.0075
Colima		5	0.40 ± 0.24	0.0030
Michoacán *		123	0.47 ± 0.04	0.0036
Guerrero		4	0.50 ± 0.26	0.0038
Oaxaca		3	0.67 ± 0.31	0.0050
♦Costa Rica *		15	0.13 ± 0.11	0.0003
♦Quintana Roo		21	0.82 ± 0.06	0.0057

**Tabla 7.** Valores de variabilidad genética de este trabajo y del trabajo de Encalada 1996 (marcados con ♦). Asterisco denota playas que reciben mas de 500 nidos por temporada (Hirth, 1997).

En Maruata los valores de variabilidad son más bajos que en arenas blancas a pesar de que el número de hembras anidadoras es mayor que en Arenas Blancas, en esta playa hay actividades de conservación por parte de las cooperativas pesqueras de la localidad. Colola es la principal playa de anidación de tortugas negras en todo el Pacífico Mexicano sin embargo tiene valores de H inferiores a playas que reciben un numero inferior de hembras anidadoras cada año (Ej. Cuyutlán, Colima, Arenas Blancas y Maruata, Michoacán).

Ahora consideremos la diversidad de nucleótido que es una medida mas adecuada de variabilidad genética obtenida a partir de secuencias y no es tan dependiente del tamaño de muestra ni del tamaño de la secuencia analizada como H (Nei 1987).

Para esta medida es posible comparar con los datos del trabajo de Encalada (1996), considerando a cada uno de los estados muestreados como unidades. El valor mas alto de variabilidad de nucleótido es Quintana Roo, a pesar de que la población anidadora es inferior a 500 hembras por año, por otra parte la localidad de Costa Rica en la que está incluida la población de la playa Tortugero, una de las más importantes del mundo en cuanto a número de hebras anidadoras tiene valores de variabilidad más bajos. Michoacán tiene un valor de variabilidad menor que Quintana Roo pero superior a Costa Rica.

El relativamente alto valor de variabilidad con respecto a Costa Rica a nivel nucleótido para Michoacán puede explicarse si consideramos que la reducción en la variabilidad genética después de que una población pasa por un cuello de botella está dada por la endogamia y deriva génica. Para que estos procesos se evidencien es necesario que transcurran varias generaciones. El tiempo generacional para una tortuga es largo (se estima que las tortugas del género

Chelonia adquieren su madurez sexual a los 30 años (Hirt 1997). Si consideramos que la explotación que generó el cuello de botella en las tortugas marinas fue hace apenas hace un par de décadas no ha transcurrido el tiempo suficiente para que se observe una reducción de la variabilidad genética en las colonias nidadoras del Pacífico Mexicano. Es importante que se acumulen más datos de variabilidad genética de tortugas marinas para hacer comparaciones objetivas, idealmente si tuviéramos los valores de diversidad genética para especies con tamaños poblacionales grandes (Ej. tortuga golfina *Lepidochelys olivacea*) y muy pequeños (Ej. tortuga lora *Lepidochelys kempii*) podríamos hacer una mejor comparación.

## RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO CHELONIA

Para realizar este análisis se seleccionaron secuencias de la región control del mtDNA de tortugas del género *Chelonia* obtenidas de diversas playas de anidación en el mundo (tabla 8).

Los haplotipos seleccionados son: todos los encontrados en este trabajo que pertenecen a la población nidadora del Pacífico oriental Mexicano (n= 5) más otros de trabajos previamente publicados (tabla 7): Del Pacífico central (n= 2), Pacífico occidental (n= 1) y haplotipos del Atlántico (n= 4) representando tanto el oriente y occidente de este océano, esto es con el ánimo de tener representado el rango de distribución del género *Chelonia* en el mundo.

Para la reconstrucción filogenética se realizó el alineamiento de los haplotipos seleccionados empleando ClustalV para PC versión 1.7 (Higgins 1991) y se revisó empleando GeneDoc para PC versión 2.2.000, (Nicholas et al. 1997) el alineamiento obtenido se presenta en la figura 2.

Secuencia	Localización	Fuente
Haplo-E	Pacífico oriental México	Este trabajo
Haplo-F		
Haplo-H		
Haplo-I		
Haplo-M		
CA/Dutton		Dutton et al. 1996
CMHAW/Nor	Pacífico central Hawai	Norman et al. 1994
CMPA/Dutt		Dutton et al. 1996
CMJVAa/Nor	Pacífico occidental Java	Norman et al. 1994
CMCGC/All	Atlántico occidental Florida	Allard et al. 1994
CM5/Encal	Atlántico occidental Surinam	Encalada 1996
CM8/Encal	Atlántico oriental Guinea-Bissau	Encalada 1996
CM9/Encal	Mediterráneo Ciprus	Encalada 1996
Caretta	Grupo externo	Dutton et al. 1996

**Tabla 8.** Haplotipos empleados en la reconstrucción filogenética, océano de origen y referencia.

Para la reconstrucción filogenética se empleó el Programa PAUP versión 3.0, se realizó una búsqueda de "branch an bound" de la que se obtuvieron 4

árboles igualmente parsimoniosos. Con estos se realizó el consenso de mayoría que se presenta en la figura 3.

Actualmente el estatus taxonómico de la tortuga negra es motivo de controversia. Algunos autores sugieren que *Chelonia agassizi* es una especie, mientras que otros autores sugieren que es la subespecie *Chelonia mydas agassizi*, la controversia se debe a que existe evidencia a favor y en contra de la asignación de especie para la tortuga negra:

- Se ha encontrado que *Chelonia agassizi* y *Ch. mydas* son especies simpátricas en algunas localidades (Pritchard 1997).
- La tortuga negra es diferente en cuanto a forma, tamaño, coloración del caparazón (Figueroa y Alvarado 1990) y morfología del cráneo (Kamezaki y Matsui 1995 en este último trabajo se considera a la tortuga negra como una subespecie *Ch. mydas agassizi*).

Sin embargo, empleando herramientas moleculares (Dutton et al. 1996; Bowen y Karl 1997) no se soporta la asignación de especie a *Ch. agassizi*. Los trabajos previamente realizados con esta especie tienen tamaños de muestra pequeños ( $n < 8$ ). En este trabajo el tamaño de muestra es mayor ( $N = 135$ ), con el ánimo de poder hacer una contribución a los datos empleados en la sistemática molecular de esta especie.

El cladograma obtenido muestra que los haplotipos de *Ch. agassizi* (marcados con rectángulo gris) forman un grupo monofilético estrechamente relacionado con el grupo de las *Ch. mydas* del Pacífico central (marcados con rectángulo de puntos negros y fondo blanco) y más distantes de la *Ch. mydas* del Pacífico occidental (marcado con rectángulo de puntos blancos fondo negro). En otro clado aparte se encuentran los haplotipos de *Ch. mydas* del océano Atlántico (marcados con rectángulo de cuadros pequeños blanco y negro en la figura 3).

De este cladograma se observa que las tortugas del género *Chelonia* del Atlántico y Pacífico se encuentran en clados diferentes manteniendo un patrón filogeográfico con las dos cuencas oceánicas. Este patrón filogeográfico se observa también en las tortugas del Pacífico de manera que los haplotipos del Pacífico oriental se encuentran en un clado más cercano a los haplotipos del Pacífico central y más distante de los haplotipos del Pacífico Occidental.

En este análisis no se apoya la asignación de especie a la *Ch. agassizi*, ya que la diferenciación de los haplotipos encontrados entre las tortugas del Atlántico y el Pacífico es mayor que la existente entre los haplotipos del Pacífico. No existe duda acerca de que las *Ch. mydas* de ambas cuencas pertenecen a una misma especie, por tanto, si *Ch. agassizi* fuese una especie esperaríamos que existiera más diferencia entre los haplotipos de *Ch. agassizi* y *Ch. mydas* del Pacífico que las diferencia observada entre las *Ch. mydas* del Pacífico y el Atlántico.

```

haplo-E : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
haplo-F : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
haplo-H : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
haplo-I : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
haplo-M : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
CA/Dutton : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
CHIAM/Mor : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
CHPA/Dutt : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
CHJVAa/No : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
CH5/Encal : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
CH8/Encal : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
CH9/Encal : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
CHOCG/All : TAGCATATGACAGTAATTTTACCGTTTATTGGCCCTAAACATGAAAAATT-ATTGATCCACATAAAA-TGTTTTGATACATGANTATTAGCA
Caretta : TAGCATATGACAGTAATTTGTCGATTAATTTGGCTTTAAACATAAAAAATT-ATTATTTTACATAAACTGGTTTAGCTTCATGACTATTATACA

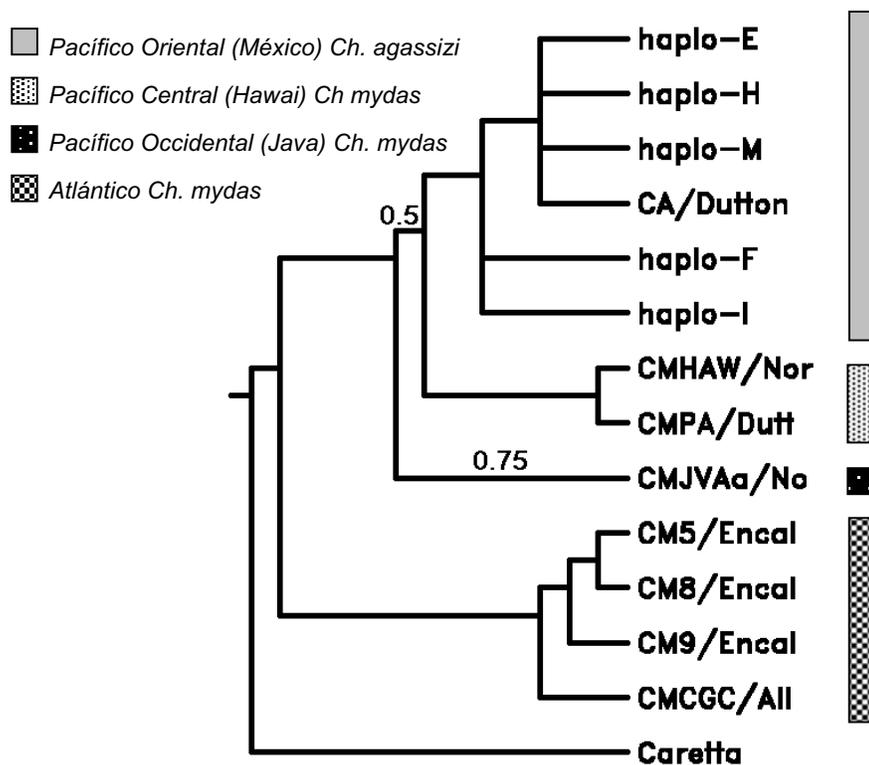
      20          40          60          80
haplo-E : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
haplo-F : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
haplo-H : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
haplo-I : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
haplo-M : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
CA/Dutton : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
CHIAM/Mor : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
CHPA/Dutt : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
CHJVAa/No : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
CH5/Encal : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
CH8/Encal : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
CH9/Encal : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
CHOCG/All : GCGAATAAATGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAG-ACCTG
Caretta : G-GTAATAAATAAGAAAATGAAATGATATAGGCATATAAAATTAACATTATTCGCAACCATGAATATCGTCACAGTAATGGTTATTTCTTAAGTTCAGCTC

      200          220          240          260          280
haplo-E : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
haplo-F : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
haplo-H : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
haplo-I : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
haplo-M : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
CA/Dutton : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
CHIAM/Mor : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
CHPA/Dutt : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
CHJVAa/No : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
CH5/Encal : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
CH8/Encal : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
CH9/Encal : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
CHOCG/All : TTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC
Caretta : ATCAGGAGAAATAAGCAACCCCTTGTAGTAAGATACAACATTACCAGTTTCAAGCCCATTAATCGCGGTACATAAECTGATCTATTCTGGCC

      300          320          340          360          380
haplo-E : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
haplo-F : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
haplo-H : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
haplo-I : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
haplo-M : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
CA/Dutton : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
CHIAM/Mor : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
CHPA/Dutt : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
CHJVAa/No : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
CH5/Encal : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
CH8/Encal : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
CH9/Encal : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
CHOCG/All : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA
Caretta : TCTGTTGTCTTTTCAGGCACATAGCAATAAAGTCTCATTGGTTCCCTTTAAAAGGCCCTTGGTTAATGAGTTCATACATTAAATTTA

```

**Figura 2.** Alineación de los 14 haplotipos empleados para la reconstrucción filogenética, los haplotipos E, F, H, I, M y CA/Dutton corresponden a tortugas de la especie *Chelonia agassizi*; Los 7 haplotipos siguientes corresponden *Ch. mydas* y el último *Caretta caretta* usado como grupo externo.



**Figura 3** Consenso de mayoría de cuatro cladogramas más parsimoniosos con un índice de consistencia de 0.87. En los rectángulos se describe el lugar de origen de los haplotipos. Todas las ramas del cladograma tienen una frecuencia de 1 (excepto marcadas con números de frecuencia relativa).

Actualmente la evidencia proporcionada por la sistemática molecular genera una hipótesis de trabajo que puede ser mejorada conforme se adicionen datos no solo moleculares para definir la situación taxonómica del complejo *Chelonia*. La evidencia morfológica no es suficiente para soportar el estatus de especie a la *Ch. agassizi*. Uno de los argumentos para mantener el estatus de especie para *Ch. agassizi* es el hecho que *Ch. agassizi* y *Ch. mydas* son simpátricas en las islas Galápagos y Nueva Guinea. Sin embargo, este no es un argumento robusto. Las tortugas del género *Chelonia* se aparean en las inmediaciones de la playa de anidación y los sitios de anidación de las *Ch. mydas* no se traslapa con los sitios de anidación de *Ch. agassizi* de manera que la simpatría se presenta en sitios en donde no hay reproducción. Con respecto a las diferencias morfológicas estas pueden considerarse como variación intra específica y no es suficiente para mantener como especie a la tortuga negra, *Ch. agassizi*.

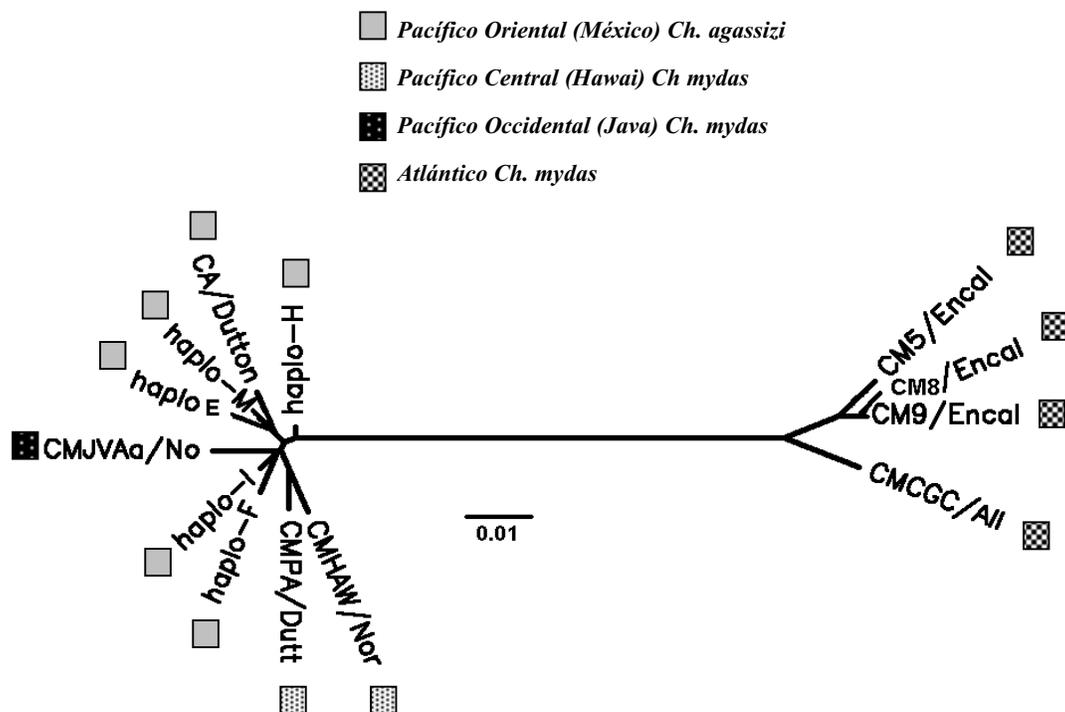
Definir, sin embargo, la importancia de los esfuerzos de conservación únicamente de acuerdo con el estatus taxonómico de la *Ch. agassizi* es inadecuado. La conservación de las colonias anidadoras del Pacífico oriental es

importante pues esta población es diferente en cuanto a composición genética y tiene diferencias morfológicas que la hacen peculiar.

## RELACIONES DE SIMILITUD DEL GÉNERO CHELONIA

Con el alineamiento mostrado en la figura 2 se realizó una matriz de distancias genéticas empleando PHYLIP 3.5 (Felsenstein 1993). Las distancias se calcularon con el modelo de Kimura de 2 parámetros con una proporción de transición : transversión de 14:1 propuesto por Karam, 1997, con esta matriz de distancia se realizó un fenograma empleando el algoritmo de Neighbor Joining para determinar las relaciones de similitud. La red obtenida se muestra en la figura 4.

En este red de fenograma (figura 4) se observa que los haplotipos del Pacífico y Atlántico están en distinto grupo. Los haplotipos de *Ch. agassizi* marcados en gris se encuentran muy cercanos en distancia con los haplotipos de *Ch. mydas* del Pacífico. Si la tortuga negra fuera una especie diferente se esperaría que los haplotipos de esta se agruparan en un grupo aparte separado por una distancia mayor que la existente entre los haplotipos de *Ch. mydas* del Pacífico y el Atlántico.



**Figura 4.** Red generada a partir de la distancia entre haplotipos del Pacífico y Atlántico, la escala representa unidades de distancia genética calculadas de acuerdo al modelo de Kimura de 2 parámetros.

## CONCLUSIONES

- La población anidadora de tortuga negra *Chelonia agassizi* del Pacífico Mexicano (Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca) no presenta diferenciación genética (estructura genética) significativa, de manera que se comporta como una población panmítica. No es posible identificar más de una unidad de manejo.
- No existe estructura genética temporal (en dos temporadas de anidación) en cuatro playas de anidación de la tortuga negra *Ch. agassizi* en el Estado de Michoacán
- Aún con la carencia de estructura genética entre las poblaciones anidadoras las playas de Colola, Maruata y Paso de Noria en Michoacán y Barra de la Cruz Oaxaca son peculiares por los haplotipos presentes en esas localidades. Se recomienda mantener las actividades de conservación en esas playas.
- Las principales playas de anidación para la tortuga negra *Ch. agassizi* en el Pacífico Mexicano están en el estado de Michoacán y en los estados de Colima, Guerrero y Oaxaca los eventos de anidación son poco frecuentes.
- Los valores de variabilidad genética de las poblaciones anidadoras de la tortuga negra *Ch. agassizi* del Pacífico Mexicano no son bajos con respecto a los reportados para otras poblaciones de tortugas del género *Chelonia*.
- En el análisis filogenético realizado con los 5 haplotipos reportados en el presente trabajo y uno de Dutton et al. 1996 para *Ch. agassizi* y haplotipos de *Ch. mydas* del Pacífico central, occidental y del Atlántico no apoyan la asignación de especie para *Ch. agassizi*.
- El nombre de *Ch. agassizi* debe usarse hasta que exista una modificación formal del estatus para esta especie descrita por Bocourt en 1868.
- Las poblaciones anidadoras de *Ch. agassizi* en el Pacífico occidental son peculiares desde el punto de vista genético por lo que han de continuarse las labores de protección sobre las mismas.

## HOJA DE CÁLCULO

Se anexa hoja de calculo en medio magnético con los datos crudos de este trabajo. los 5 haplotipos ( 400 pares de bases región control del mtDNA) obtenidos en el presente trabajo se presentan a continuación

### Haplotipo E

```
TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTTGGCCCTAAACATGAAAATTATTGAATCC
ACATAAATATTTTGATAACATGAATATTAAGCAGAGAATTTAAAAGTGAAATGATATAGGAC
ATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTCCACAGTAATTGGTTATTTCTTAAG
TAGCTATTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTTAGTAAGATAACAACATTACCAGTTTCAGGC
CCATTTAGTTTATAGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTCTTTTCAGGCA
```

CATACAAATAACAACGTTTCATTCGTTTCCTCTTTAAAAGGCCTTTGGTTGAATGAGTTCTAT  
ACATTAAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTTTT

### **Haplotipo F**

TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTTGGCCCTAAACATGAAAATTATTGAATCC  
ACATAAATATTTTGATAACATGAATATTAAGCAGAGGATTAAAAGTGAAATGATATAGGAC  
ATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTCCACAGTAATTGGTTATTTCTTAAG  
CAGCTATTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTTAGTAAGATAACAACATTACCAGTTTCAGGC  
CCATTTAGTTTATAGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTCTTTTCAGGCA  
CATACAAATAACAACGTTTCATTCGTTTCCTCTTTAAAAGGCCTTTGGTTGAATGAGTTCTAT  
ACATTAAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTTTT

### **Haplotipo H**

TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTTGGCCCTAAACATGAAAATTATTGAATCC  
ACATAAATATTTTGATAACATGAATATTAAGCAGAGAATTAAGTGAAATGATATAGGAC  
ATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTCCACAGTAATTGGTTATTTCTTAAA  
TAGCTATTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTTAGTAAGATAACAACATTACCAGTTTCAGGC  
CCATTTAGTTTATAGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTCTTTTCAGGCA  
CATACAAATAACAACGTTTCATTCGTTTCCTCTTTAAAAGGCCTTTGGTTGAATGAGTTCTAT  
ACATTAAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTTTT

### **Haplotipo I**

TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTTGGCCCTAAACATGAAAATTATTGGATCC  
ACATAAATATTTTGATAACATGAATATTAAGCAGAGAATTAAGTGAAATGATATAGGAC  
ATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTCCACAGTAATTGGTTATTTCTTAAG  
TAGCTATTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTTAGTAAGATAACAACATTACCAGTTTCAGGC  
CCATTTAGTTTATAGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTCTTTTCAGGCA  
CATACAAATAACAACGTTTCATTCGTTTCCTCTTTAAAAGGCCTTTGGTTGAATGAGTTCTAT  
ACATTAAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTTTT

### **Haplotipo M**

TAGCATATGACCAGTAATGTTAACAGTTGATTTGGCCCTAAACATGAAAATTATTGAATCC  
ACATAAATATTTTGATAACATGAATATTAAGCAGAGAATTAAGTGAAATGATATAGGAC  
ATAAAATTAACCATTATACTCAACCATGAATATCGTCCACAGTAATTGGTTATTTCTTAAG  
TAGCTATTCACGAGAAATAAGCAACCCCTTGTTAGTAAGATAACAACATTACCAGTTTCAGGC  
CCATTTAGTTTACAGCGTACATAACCTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTCTTTTCAGGCA  
CATACAAATAACAACGTTTCATTCGTTTCCTCTTTAAAAGGCCTTTGGTTGAATGAGTTCTAT  
ACATTAAATTTATAACCTGGCATAACGGTAGTTAG

## **LITERATURA CITADA**

- Allard, W. M., Miyamoto, M. M., Bjorndal, A. K., Bolten, B. A. & Bowen, B. W. (1994). Support for Natal Homing in Green Turtles from Mitochondrial DNA Sequences. *Copeia*. pp 34
- Anderson, S., Bankier, T. A., Barrell, G. B., de Bruijn, L.H.M., Coulson, R. A., Drouin, J., Eperon, C.I., Nierlich, P.D., Roe, A.B., Sanger, F., Schreier, H. P., Smith, H.J.A., Staden, R., & Young, G.I. (1981) Sequence and organization of the human genome. *Nature*. 290: 457-465.

- Avice, C. J., Bowen, W. B., Lamb, T., Meylan, B. A. & Bermingham, E. (1992). Mitochondrial Evolution at a turtle's Pace : Evidence for Low Genetic Variability and Reduced Microevolutionary Rate in Testudines. *Mol.Biol.Evol* Vol. 9(3). Pp 457-473.
- Bowen, W. B., Meylan, A. B., Ross, J. P., Limpus, C. J., Balazs, G. H. & Avice, C. J. (1992). Global Population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution*. Vol. 46. pp 865-881.
- Bowen, B.W. & Karl A.S. (1997) Population Genetics Phylogeography, and Molecular Evolution in Lutz, L. & Musick, A.J. (Editors). *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press. USA. pp 29-50.
- Cann, L.R., Stoneking, M. y Wilson, C. A. (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325:31-36
- Dutton, P. H. (1996a). Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies. In Bowen,B.W. & Witzell,W.N. *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum. NMFS-SEFSC-396. pp 17-24.
- Dutton, P. H., Davis T, G., & Owens, D. (1996b) Molecular Phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-Leucine tRNA and control region of mitochondrial DNA. *Mol Phylogenet. Evol.* 5: 511-521.
- Encalada, E.S.(1996) Conservation genetics of Atlantic and Mediterranean green turtles: inferences from mtDNA sequences In Bowen,B.W. & Witzell,W.N. *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum. NMFS-SEFSC-396. Pp 33-40.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Figuroa, A., & Alvarado,J. (1990) Morphometric comparison of the *Chelonia* populations of Michoacán, Mexico and Tortuguero, Costa Rica. Pp. 179-182 In Richardson J.I. et al (compilers) *Proceedings of the tenth Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFC- 286 pp
- Giles, E.R., Blanc, H., Cann, M.H. & Wallace, C.D. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:6715-6719.
- Heiman, M. (1997) Webcutter 2.0, disponible en:  
<http://www.ccsi.com/firstmarket/firstmarket/cutter/cut2.html>
- Higgins, D. G. Bleasby, A. J. and Fuchs, R. (1991) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS*, vol .8, 189-191.
- Hirt, H.F. (1997). Synopsis of the biological data on the green turtle *Chelonia mydas* (linnaeus 1758). FWS. USA. pp.120.
- Hutchinson, C. A., Newblod, E. J., Potter, S. S., y Hall, M .E. (1974) Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251:536-538

- Kamezaki, N. & Matsui. (1991) Geographic variation in the skull morphology of the green turtle, *Chelonia mydas*, with a taxonomic discussion. *J. Herpetol.* 29: 51-60.
- Karam, M. S. (1997). Patrones de sustitución nucleotídica de la región control del DNA mitocondrial de tortugas marinas. Tesis Biólogo. Fac. de Ciencias. UNAM. México. 72 pp.
- Moritz, C. 1994. Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9:373-375.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. USA
- Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II. 1997 GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, EMBNEW.NEWS 4:14 o <http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml>
- Norman, J. A., Moritz, C. & Limpus, C. J. (1994) Mitochondrial DNA control region polymorphism's: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Molecular Ecology*. Vol. 3 pp 363-373.
- Owens, W.D. and Ruiz, G.J. (1980). New Methods of Obtaining Blood and Cerebrospinal Fluid from Marine Turtles. *Herpetologica* Vol. 36(1). Pp 17-20
- Pope, T.R. socioecology, population fragmentation, and patterns of genetic loss in endangered primates. pp 119-159 en *Avise, J. C. y Hamrick, J.L. editors Conservation genetics, case histories from nature 1996*. Chapman y Hall USA
- Pritchard, P.C.H. (1997) Evolution, Phylogeny, and Current Status. In Lutz, L. & Musick, A.J. (Editores). *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press. USA. pp 1-28.
- Ruiz, M. G. (1978). Comparación entre patrones electroforéticos de plasma y suero de dos especies de tortugas marinas (*Lepidochelys olivacea* y *Chelonia mydas agassizii*) Tesis. FMVZ UNAM. México. 25 pp
- Schneider, S., Kueffer, J. -M., Roessli, D., and Excofier, L. (1997) Arlequin: software for population genetic data analysis. Ver 1.1. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Slatkin, M. (1991) Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res. Camb.* 58: 167-175.
- Tajima, F. (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.