

TESIS DEFENDIDA POR
ANNELISSE BÁRCENAS IBARRA
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

DR. AXAYÁCATL ROCHA OLIVARES

Director del Comité

DRA. GISELA HECKEL DZIENDZIELEWSKI

Miembro del Comité

DRA. PAULA PÉREZ BRUNIUS

Miembro del Comité

DR. AXAYÁCATL ROCHA OLIVARES

*Coordinador del programa de posgrado en
Ecología Marina*

DR. DAVID HILARIO COVARRUBIAS ROSALES

Director de Estudios de Posgrado

30 de Septiembre de 2009.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA**



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS

EN ECOLOGÍA MARINA

**DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LAS COLONIAS ANIDANTES DE TORTUGA
GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*) EN EL PACÍFICO MEXICANO CON BASE EN
ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ANNELISSE BÁRCENAS IBARRA

Ensenada, Baja California, México, Septiembre.

Ensenada, Baja California, México, Agosto del 2009. **RESUMEN** de la tesis de **ANNELISSE BÁRCENAS IBARRA**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Septiembre 2009.

**DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE LAS COLONIAS ANIDANTES DE TORTUGA
GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*) EN EL PACÍFICO MEXICANO CON BASE EN
ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL.**

Resumen aprobado por:

Dr. Ayaxácatl Rocha Olivares
Director de Tesis

La tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) es considerada la especie de tortuga marina más abundante alrededor del mundo. Sin embargo, su abundancia histórica se ha reducido severamente en algunas áreas principalmente por factores antropogénicos. Al tratarse de una especie amenazada y vulnerable, es de suma importancia conocer el nivel de variabilidad genética en las colonias anidantes. Esto permitirá reconocer unidades de manejo específicas para delimitar áreas de protección en las diferentes playas de anidación. Utilizando la región de control del ADN mitocondrial se analizó la diferenciación genética de 18 colonias anidantes de *L. olivacea* en el Pacífico mexicano. En general se observaron altos valores de diversidad haplotípica, siendo la de Baja California Sur significativamente menor a las demás ($h=0.36$) con excepción de Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Por su parte, la encontrada en Nayarit fue significativamente mayor ($h=0.85$) a todas las zonas de anidación ($p<0.05$; *t-Student*). La diversidad nucleotídica fue baja, Baja California Sur ($\pi=0.00008$) y Michoacán ($\pi=0.00026$) presentaron la mayor y menor diversidad respectivamente. El análisis de varianza molecular ($\Phi_{ST}=0.017$, $p<0.05$) reflejó una pequeña pero significativa diferenciación genética. Algunos valores de Φ_{ST} pareados mostraron diferencias significativas entre colonias anidantes, sin embargo, después de la corrección de Bonferroni estas comparaciones no fueron significativas para el conjunto de pruebas. Las estimaciones de flujo genético (Nm) obtenidas a partir de los Φ_{ST} entre colonias anidantes de *L. olivacea* del Pacífico mexicano fueron altas. El árbol filogenético basado en Neighbor Joining reflejó una baja divergencia entre los haplotipos y una topología muy compleja. Los parámetros del modelo de expansión repentina sugieren que la mayoría de las colonias anidantes han experimentado un incremento en el tamaño poblacional, especialmente en Nayarit. Tomando en cuenta el pequeño nivel de diferenciación genética encontrado en este estudio, se recomienda mantener un principio precautorio de manejo de la especie por lo menos para la colonia anidante de Baja California Sur, y continuar con los programas de protección y conservación para el resto de las colonias en el Pacífico mexicano.

Palabras Clave: *Lepidochelys olivacea*, estructura genética, ADN mitocondrial.

ABSTRACT of the thesis presented by **ANNELISSE BÁRCENAS IBARRA** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México Septiembre 2009.

GENETIC DIFFERENTIATION OF OLIVE RIDLEY TURTLE (*Lepidochelys olivacea*) NESTING COLONIES ALONG THE MEXICAN PACIFIC BASED ON MITOCHONDRIAL DNA ANALYSIS

Olive Ridleys (*Lepidochelys olivacea*) are the most abundant sea turtles around the world. However, their historical abundance has severely declined in some areas due to anthropogenic factors. Being an endangered and vulnerable species, it is very important to assess the level of genetic variability in the nesting colonies in order to properly identify management units and prioritize areas for protection in its habitat. The genetic differentiation of *L. olivacea* was analyzed in 18 nesting colonies along the Mexican Pacific using the control region of mitochondrial DNA. High haplotype diversity was found, that found in Baja California Sur ($h=0.36$) was significantly lower than the other colonies, with the exception of Guerrero, Oaxaca and Chiapas. On the other hand, diversity found in Nayarit was significantly greater ($h=0.85$) than the rest of nesting areas ($p<0.05$, *t-Student*). Nucleotide diversity values were also low, the lowest and highest values were found in Baja California Sur ($\pi=0.00008$) and in Michoacán ($\pi=0.00026$), respectively. Analysis of molecular variance ($\Phi_{ST}=0.017$, $p<0.05$) revealed a small but significant genetic differentiation. Paired Φ_{ST} showed significant differences between some nesting colonies. However, after a Bonferroni correction these comparisons were not significant for all the 36 comparisons. Estimates of gene flow (Nm) obtained from Φ_{ST} between nesting colonies of *L. olivacea* in the Mexican Pacific were high. The Neighbor Joining phylogenetic tree showed a low divergence among haplotypes and a complex topology. The parameters of the sudden expansion model suggest that most of the nesting colonies have increased in population size, especially Nayarit. Taking into account the insufficient level of genetic differentiation found in this study, it is recommended to maintain a precautionary approach to management of the species at least for the nesting colony of Baja California Sur and continue programs to protect and conserve the remaining colonies nesting in the Pacific coast of Mexico.

Key words: *Lepidochelys olivacea*, genetic structure, mitochondrial DNA.

Con todo mi amor...

A mis padres Héctor y Mary por todo el apoyo y amor brindado durante toda mi vida y por alentarme a ser una excelente persona. Este logro no hubiera sido posible sin ustedes.

A mi hermana Eréndira por su inmenso cariño, comprensión y aliento en momentos difíciles y por todas las alegrías compartidas. ¡Te quiero mucho chaparra!

A mis amigos incondicionales Erika, Julio y Lulú por todas las experiencias compartidas y enseñanzas adquiridas a través de todos estos años de amistad.

A mis maravillosas tortugas que son mi fuente de inspiración.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme una beca para la realización de este trabajo.

Al Dr. Axayácatl Rocha Olivares por aceptar dirigir esta tesis, por las recomendaciones y consejos para realizar una investigación de calidad.

A los miembros de mi comité revisor: Dras. Gisela Heckel Dziendzielewsku y Paula Pérez Brunius por sus valiosas sugerencias y comentarios que ayudaron a mejorar este documento.

A Nancy Saavedra por su inmensa ayuda y paciencia brindada tanto en el laboratorio como en el análisis de datos durante el desarrollo de este trabajo. ¡Gracias Nan y disculpa por tanta lata!

A mis grandes amigos de la maestría: Daniela, Joselito de la voz de oro y Bertha por todo el estrés, travesuras, aventuras, desveladas y parrandas compartidas que hicieron que mi estancia en Ensenada fuera uno de los momentos más gratificantes en mi vida. ¡Los quiero mucho y gracias por todo!

A mi “comadriquis” (Vania) por todas las experiencias compartidas, porque cuando parecía no lograrlo siempre estuviste ahí para darme ánimos y brindarme tu apoyo incondicional. ¡Lo logramos comadre!

A mi maravillosa familia que a pesar de estar tan lejos de mí, una sola llamada bastaba para alegrarme el día. Gracias papis por todo el apoyo moral, económico y sentimental que me han brindado durante todo mi desarrollo profesional.

A Sergio por compartir tantos momentos a lo largo de mi estancia en Ensenada. ¡Gracias por todo el cariño y amistad que me brindaste!

CONTENIDO

	Página
Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	ix
I. Introducción.....	1
<i>I.1 Generalidades de las tortugas marinas.....</i>	<i>1</i>
<i>I.2 La tortuga golfina (Lepidochelys olivacea).....</i>	<i>2</i>
<i>I.3 Antecedentes.....</i>	<i>7</i>
<i>I.4 Justificación.....</i>	<i>11</i>
<i>I.5 Hipótesis.....</i>	<i>13</i>
<i>I.6 Objetivos.....</i>	<i>13</i>
I.6.1 Objetivo General.....	13
I.6.2 Objetivos Específicos.....	13
II. Metodología.....	14
<i>II.1 Área de estudio.....</i>	<i>14</i>
<i>II.2 Obtención de muestras.....</i>	<i>15</i>
<i>II.3 Trabajo de laboratorio.....</i>	<i>16</i>
II.3.1 Extracción de ADN.....	16
II.3.2 Amplificación de región control (D-loop) mediante PCR.....	16
II.3.3 Purificación de PCR y secuenciación.....	17
<i>II.4 Análisis de datos.....</i>	<i>18</i>
II.4.1 Edición y alineamiento de secuencias.....	18
II.4.2 Búsqueda e identificación de haplotipos.....	18
II.4.3 Diversidad genética.....	18
II.4.4 Estructura y Flujo Genético.....	19
II.4.5 Comparación de diversidades mitocondriales entre playas de anidación masiva y playas solitarias.....	20

CONTENIDO (continuación)

	Página
II.4.6. Relaciones filogenéticas entre haplotipos.....	21
II.4.7. Demografía histórica.....	21
 III. Resultados.....	 23
<i>III.1 Muestreo.....</i>	<i>23</i>
<i>III.2 Edición y alineamiento de secuencias.....</i>	<i>24</i>
<i>III.3 Identificación y distribución de haplotipos.....</i>	<i>24</i>
<i>III.4 Diversidad genética.....</i>	<i>29</i>
<i>III.5 Estructura genética.....</i>	<i>33</i>
<i>III.6 Flujo genético entre colonias anidantes.....</i>	<i>34</i>
<i>III.7 Relaciones filogenéticas entre haplotipos.....</i>	<i>36</i>
<i>III.8 Demografía histórica.....</i>	<i>38</i>
 IV. Discusión.....	 40
<i>IV.1 Diversidad genética.....</i>	<i>40</i>
<i>IV.2 Estructura y flujo genético.....</i>	<i>47</i>
<i>IV.3 Filogeografía.....</i>	<i>54</i>
<i>IV.4 Demografía histórica.....</i>	<i>55</i>
<i>IV.5 Implicaciones para el manejo y la Conservación.....</i>	<i>57</i>
 V. Conclusiones.....	 60
 VI. Bibliografía.....	 62
 VII. Apéndices.....	 71

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Tortuga golfina <i>Lepidochelys olivacea</i> (tomado de Márquez, 1990).	2
2	Distribución mundial de <i>Lepidochelys olivacea</i> (tomado y modificado de Márquez, 1990).	3
3	Zonas de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> en el Pacífico mexicano.	4
4	Ciclo de vida de <i>Lepidochelys olivacea</i> (tomado y modificado de CIT, 2006).	5
5	Anidación masiva o “arribada” de <i>Lepidochelys olivacea</i> en la playa La Escobilla, Oaxaca.	6
6	Sitios de Colecta de muestras de tejido de <i>Lepidochelys olivacea</i> . Los números entre paréntesis indican las playas muestreadas en cada estado.	14
7	Mapa de la región de control del ADN mitocondrial; ARNt ^{Pro} = gen que codifica el ARN de transferencia de la prolina, RH1= región hipervariable uno, RC= región conservada, RH2= región hipervariable dos, ARNt ^{Phe} = gen que codifica el ARN de transferencia de la fenilalanina, pb = pares de bases. Las barras negras representan fragmentos de ADN analizados por diversos estudios.	25
8	Distribución y frecuencia de los haplotipos de la región control del ADN mitocondrial de <i>Lepidochelys olivacea</i> por zona de anidación a lo largo del Pacífico mexicano; en color blanco se muestran los haplotipos privados y en colores los compartidos, H=número de haplotipos.	30

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		Página
9	Comparación de la diversidad haplotípica entre las zonas de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> en el Pacífico mexicano; las barras representan la desviación estándar de cada valor.	32
10	Comparación de la diversidad nucleotídica entre las zonas de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> en el Pacífico mexicano; las barras representan la desviación estándar de cada valor.	32
11	Árbol filogenético Neighbor-Joining de los haplotipos de <i>Lepidochelys olivacea</i> en el Pacífico mexicano; a la derecha de los haplotipos se muestran rectángulos de colores que corresponden a las regiones en las que se han encontrado (la frecuencia de los individuos corresponde al número dentro de cada rectángulo); los números a la izquierda representan el valor de bootstrap no paramétrico de cada nodo (sólo se muestran valores superiores a 50); las gráficas circulares representan para cada localidad el porcentaje de haplotipos de cada clado.	37
12	Distribución de diferencias inter-haplotípicas con base en las secuencias de los haplotipos de la región control del ADN mitocondrial de <i>Lepidochelys olivacea</i> en el Pacífico mexicano.	39
13	Densidad de anidación máxima registrada en los campamentos tortugueros de la región del Pacífico mexicano central (tomado de Madonado-Gasca, 2007).	45
14	Número de nidos de tortuga golfina registrados de 1990 a 2006 en algunas playas de la región del Pacífico mexicano central.	46

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla</i>		Página
I	Tamaño de muestra de <i>Lepidochelys olivacea</i> por playa de anidación y totales por estado durante la temporada de anidación de 2006-2007.	24
II	Sitios variables entre los haplotipos de <i>Lepidochelys olivacea</i> encontrados en la zona de estudio. Los números representan la posición de la base con respecto a la secuencia del haplotipo N en dirección 5'-3'. El primer nucleótido de los haplotipos encontrados corresponde al nucleótido 15510 del genoma mitocondrial de <i>L. olivacea</i> (clave de acceso en GenBank: AM258984).	26
III	Haplotipos de la región control de ADN mitocondrial de <i>Lepidochelys olivacea</i> encontrados en distintas zonas de anidación de la especie. Los haplotipos con terminación RB son los descritos por Briseño-Dueñas (1998), con terminación AF son tomados de Bowen et al. (1998), con terminación AY son tomados de López-Castro y Rocha-Olivares (2005) y de Genbank en cuyo caso, se muestra el número de acceso. En paréntesis se muestran las sinonimias de los haplotipos (tomado y modificado de López-Castro, 2004).	27
IV	Frecuencia relativa (%) de los haplotipos de la región control de ADN mitocondrial encontrados por zona de anidación a lo largo del Pacífico mexicano; en color gris se muestran los haplotipos privados.	28
V	Índices de diversidad genética de las zonas de anidación de <i>Lepidochelys olivacea</i> a lo largo del Pacífico mexicano. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.	31
VI	Resultados del análisis de varianza molecular considerando a todas las colonias anidantes dentro de un mismo grupo.	33

LISTA DE TABLAS (continuación)

<i>Tabla</i>		Página
VII	Valores de Φ_{ST} pareados (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal).	34
VIII	Resultados del análisis de varianza molecular considerando a la colonia anidante de Baja California Sur dentro de un grupo y al resto de las colonias dentro de otro grupo.	34
IX	Valores de flujo genético (Nm) mitocondrial entre las diferentes colonias anidantes de <i>Lepidochelys olivacea</i> en el Pacífico mexicano, derivados de los valores de Φ_{ST} .	35
X	Análisis de la demografía histórica de las colonias de <i>Lepidochelys olivacea</i> en el Pacífico mexicano: los parámetros del modelo de expansión repentina de Rogers y su prueba de bondad y ajuste.	38
XI	Comparación de la diversidad genética de la región control del ADN mitocondrial de diferentes especies de tortuga marina; n = tamaño de muestra, H = número de haplotipos, h = diversidad haplotípica y π = diversidad nucleotídica.	40
XII	Comparación de la diversidad genética de la región control del ADN mitocondrial de <i>Lepidochelys olivacea</i> en diferentes zonas de anidación alrededor del mundo; n = tamaño de muestra, H = número de haplotipos, h = diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica y pb = pares de bases.	41
XIII	Estimadores de estructura poblacional y flujo genético en diferentes especies de tortugas marinas (Tomado y modificado de Rodríguez-Zárate, 2008); ADNmt= mitocondrial, ADNn= nuclear.	47

LISTA DE TABLAS (continuación)

<i>Tabla</i>		Página
XIV	Análisis de varianza molecular sin algunas de las colonias anidantes; entre paréntesis se muestra la razón por la que se excluyó del análisis.	50

I. Introducción

I.1 Generalidades de las tortugas marinas

Las tortugas marinas son un grupo primitivo de vertebrados con características anatómicas y adaptaciones a la vida marina que no han cambiado substancialmente desde que aparecieron en la Tierra. (Márquez, 1996; INE, 1999). Al igual que otros testudines (dulceacuícolas y terrestres), las tortugas marinas parecen ser conservativas en términos de su variación molecular, exhibiendo típicamente bajos niveles de diversidad entre especies y bajas tasas de evolución molecular en comparación con otros grupos de organismos (Bowen y Avise, 1995).

Son especies longevas, de maduración sexual tardía, la cual puede tardar años y hasta décadas; además, presentan una alta tasa de mortalidad durante las etapas de crías a juveniles (Márquez, 1996). Las tortugas marinas poseen el rango más amplio de distribución de todos los reptiles, encontrándose en aguas tropicales o subtropicales costeras, templadas y subárticas de todo el mundo (Pritchard, 2003). Ambos sexos realizan migraciones de miles de kilómetros a lo largo de los océanos, desde las zonas de forrajeo hasta las playas de anidación (Morreale *et al.*, 1996; Hays *et al.*, 1999; Girard *et al.*, 2006).

Hasta los siglos XVIII y XIX, las tortugas marinas fueron muy abundantes en sus áreas de distribución (UICN, 1995), las poblaciones de algunas especies se conformaban por millones de individuos (Zwinenberg, 1976; Jackson, 1997; Bjorndal *et al.*, 2000). A partir de la segunda mitad del siglo XX, la importancia comercial de las tortugas marinas aumentó rápidamente en nuestro país; la captura de tortugas marinas se desarrolló de tal manera que durante casi dos décadas (1965-1982) México contribuyó al mercado con más de la mitad de la producción mundial (INP, 2000).

En la última década las poblaciones de las diferentes especies de tortugas marinas han sufrido fuertes reducciones debido principalmente a factores como la sobreexplotación, la captura incidental, la destrucción de hábitats críticos de alimentación, anidación y reposo, y la contaminación de los mares. Como resultado, la mayoría de las poblaciones en todo el

mundo se encuentran en declive, frecuentemente reducidas a niveles críticos (UICN, 1995). Actualmente se reconocen siete especies de tortugas marinas en el mundo (Pritchard y Mortimer, 2000), todas se encuentran catalogadas como especies amenazadas o en peligro de extinción por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN), citado en el Libro Rojo de Datos (UICN, 2003); y se prohíbe su comercio en los países que han firmado la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES; Márquez, 1990).

México alberga seis de las siete especies de tortugas marinas, únicamente la tortuga kikila (*Natator depressus*) está ausente ya que es endémica de la plataforma continental de Australia y su área de anidación se restringe a la porción norte del continente Australiano (Márquez, 1990). En el Pacífico Mexicano se ha registrado la presencia de cinco especies: la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*), la tortuga verde (*Chelonia mydas*), la tortuga caguama (*Caretta caretta*), la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), y la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*).

I.2. La tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*)

La tortuga golfina es la especie de tortuga marina más pequeña (Figura 1), los adultos pueden llegar a alcanzar los 78 cm de largo recto del caparazón, con un peso promedio de 38 kg (Márquez, 1996); alcanza la madurez sexual a tallas pequeñas, aproximadamente a 62 cm de largo recto del caparazón, y exhibe tasas de maduración y crecimiento más rápidas que otras tortugas marinas (INP, 2000).

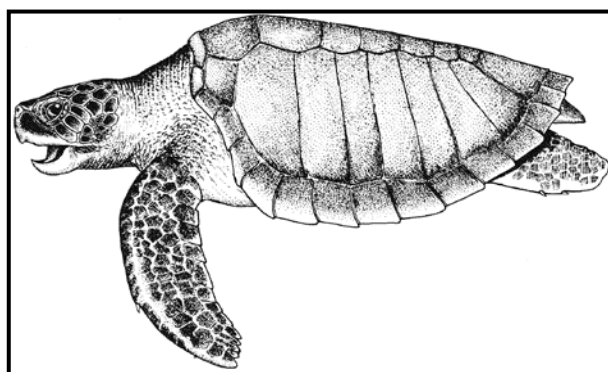


Figura 1. Tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (tomado de Márquez, 1990).

Su distribución es pantropical, habita principalmente en el hemisferio norte, entre el océano Pacífico e Índico, con la isoterma de 20°C como límite de su distribución (Figura 2) (Márquez, 1990). Algunas zonas de alimentación se localizan en Hawaii, el este de Venezuela o la región comprendida entre Colombia y Ecuador (Márquez, 1990).

En nivel mundial se reconocen dos grandes stocks para esta especie: el Índico y el del Pacífico Oriental. Una de las principales zonas de anidación se localiza en la costa noreste de la India, en el océano Índico (Pandav *et al.*, 1998); en el Pacífico Oriental se localizan otras zonas importantes, desde el suroeste de México hasta Costa Rica (Márquez, 1990; INP, 2000). Zonas de anidación de menor importancia se localizan en el norte de Australia, la Península de Malasia y el oeste de Tailandia.

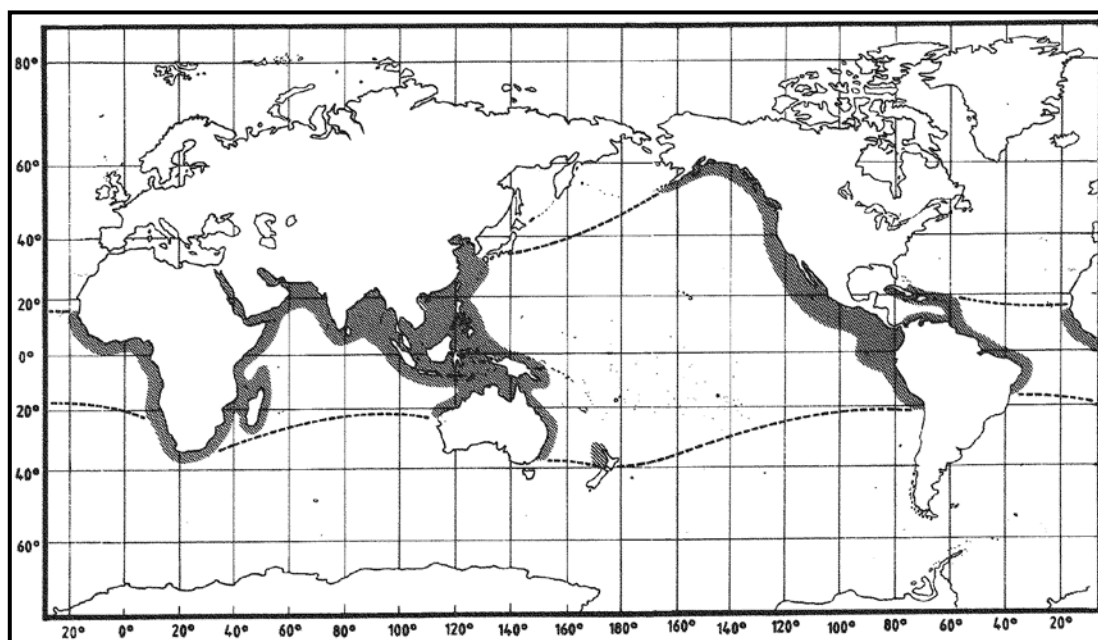


Figura 2. Distribución mundial de *Lepidochelys olivacea* (tomado y modificado de Márquez, 1990).

En México, se distribuye a lo largo de las costas del océano Pacífico, desde la península de Baja California hasta Chiapas (Figura 3; Márquez, 1990). Su principal playa de anidación se encuentra en Oaxaca donde tiene lugar uno de los desoves masivos más importantes del Pacífico Oriental; importantes anidaciones aunque no tan numerosas ocurren en Jalisco, Guerrero, Colima y Michoacán. El límite más norteño para la

reproducción de esta especie lo representan la zona sur-centro de Sinaloa y el sur de la península de Baja California. (Figura 3; Márquez, 1990).



Figura 3. Zonas de anidación de *Lepidochelys olivacea* en el Pacífico mexicano.

Fuera de las áreas de anidación, los adultos de esta especie son principalmente neríticos; se desplazan habitualmente a lo largo de las plataformas continentales, y se alimentan en aguas someras, convergiendo en verano y otoño para anidar sobre playas de suave pendiente conformadas por granos de arena fina y media. Las playas de anidación de la tortuga golfina se encuentran asociadas a desembocaduras de ríos o sistemas lagunares y estuarinos (Márquez, 1990). En cuanto a las zonas de alimentación, no se conoce muy bien su localización, pero al igual que en otras especies de tortugas marinas, se cree que se encuentran separadas por cientos o miles de kilómetros de las zonas de anidación (Márquez, 1996).

El ciclo reproductivo es anual en la mayoría de las tortugas; más del 60% anida todos los años, el 29% cada dos años y el 11% cada tres años (Figura 4; Márquez, 1990 y 1996). Para la reproducción, hembras y machos migran desde las zonas de alimentación hasta las

zonas de anidación; el apareamiento se realiza cerca de las playas de anidación o a lo largo de las rutas migratorias, y se produce principalmente en la superficie del mar. Después del apareamiento los machos regresan a las zonas de alimentación, las hembras permanecen en aguas poco profundas con un promedio de 15 días entre cada anidación. Al finalizar la temporada de anidación (julio-febrero) las hembras regresan a las zonas de alimentación, donde permanecen hasta la siguiente temporada reproductiva.

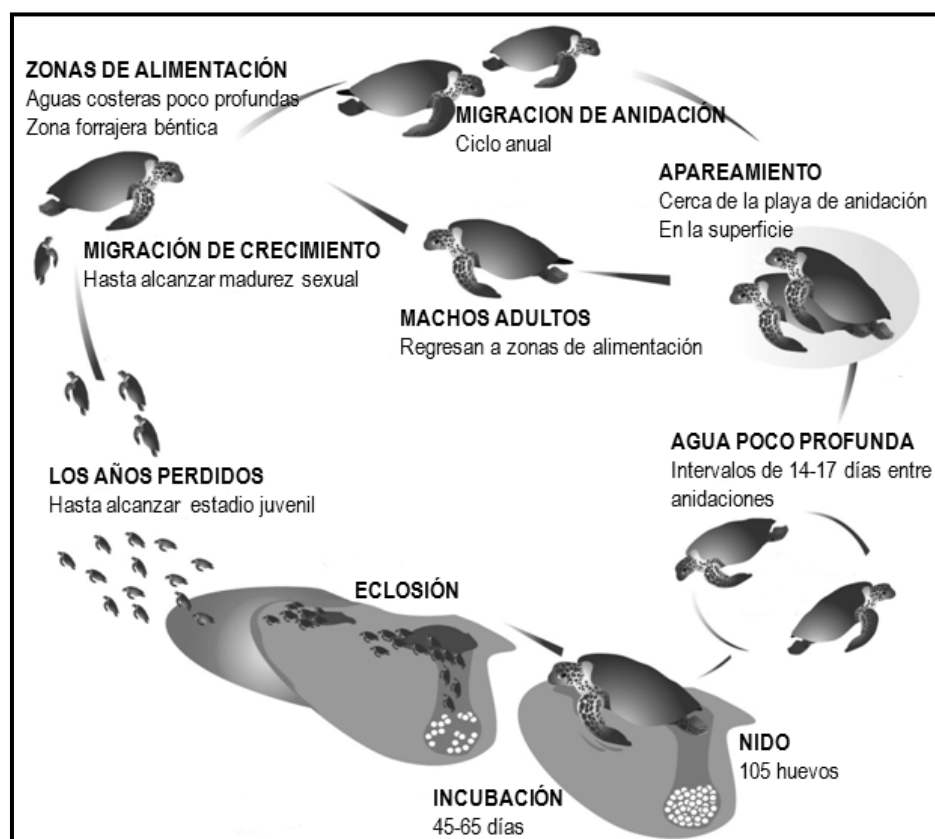


Figura 4. Ciclo de vida de *Lepidochelys olivacea* (tomado y modificado de CIT, 2006).

La tortuga golfinia presenta dos comportamientos de anidación: 1) solitario, que es la forma más común e involucra de 40 a 50 hembras anidantes en la playa (Márquez, 1990), y 2) masivo o “arribada”, comportamiento único entre las tortugas marinas, que se caracteriza por un gran número de hembras anidando sincrónicamente en la misma playa (Figura 5)

(Valverde y Gates, 2000); se han estimado desde 5,000 a 150,000 hembras anidantes durante unas cuantas noches.

El tipo de comportamiento de anidación puede tener impacto en el crecimiento poblacional (Plotkin y Bernardo, 2003), en los niveles de paternidad múltiple (Jensen *et al.* 2006) y en la diversidad genética (Rodríguez-Zárate, 2008). En este sentido, algo importante de señalar es el efecto diferencial de la deriva genética en playas de anidación solitaria y playas de arribada; el tamaño de la población efectiva es considerablemente mayor en playas de arribada, y por lo tanto, el efecto de la deriva sería menor y habría mayor diversidad genética en comparación con las playas de anidación solitaria.



Figura 5. Anidación masiva o “arribada” de *Lepidochelys olivacea* en la playa La Escobilla, Oaxaca.

La tortuga golfina es considerada la tortuga marina más abundante alrededor del mundo, en comparación con otras tortugas marinas (Limpus, 1995). Sin embargo, su abundancia histórica se ha reducido severamente en algunas áreas, principalmente por factores antropogénicos. Aunque se reconoce que las colonias anidantes del Pacífico Mexicano se encuentran en recuperación (INP, 2000), permanece en la categoría de especie

amenazada en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y de los Recursos Naturales (UICN, 1995). En México la NOM-059-SEMARNAT-2001 la cataloga como especie en peligro de extinción (DOF, 2002).

Regulaciones internacionales han sido establecidas para prohibir la captura, sacrificio o venta de tortugas marinas. En México, la Ley Federal Mexicana prohíbe, desde 1990, matar tortugas en cualquier parte del país; se han impulsado, desde hace más de tres décadas, las actividades dirigidas a conservación, protección e investigación de tortugas marinas, con el fin de entender su biología, movimientos migratorios, conocer las densidades poblacionales en los sitios de anidación y caracterización genética de las poblaciones, a fin de delimitar unidades de manejo para aplicar estrategias dirigidas a su recuperación (INE, 1999). Quizás la estrategia más importante para la recuperación de las poblaciones de tortugas marinas ha sido la instalación y operación de campamentos tortugueros en las playas más importantes de anidación, que en conjunto con los programas de marcado y recaptura, han generado importante información sobre diversos aspectos de su biología.

No obstante, las tortugas marinas pasan la mayor parte de su vida en el mar, donde las observaciones directas son un tanto inaccesibles; las crías al eclosionar migran hacia el mar y se desconoce que ocurre durante y después de estas migraciones, generalmente se les vuelve a ver cuando ya han alcanzado la madurez en el caso de las hembras, ya que reaparecen en las playas de anidación, los machos rara vez se observan en tierra. Por estas razones, los estudios de ecología molecular se han convertido en una herramienta muy importante para estudiar la biología de las tortugas marinas; en años recientes, han esclarecido muchos aspectos de la historia natural y la evolución de las tortugas marinas que son relevantes para los programas de conservación (Bowen y Avise, 1995).

I.3. Antecedentes

Un desafío central para los biólogos es establecer vínculos entre la ecología y la evolución de las especies. Uno de esos vínculos es la relación entre la capacidad de dispersión y la escala espacial sobre las cuales las poblaciones difieren genéticamente. Los estudios de diferenciación genética poblacional permiten hacer inferencias acerca de cómo las fuerzas

microevolutivas han interactuado a lo largo de la historia de una especie. Por ejemplo, la diferenciación genética de la población puede reflejar la historia vicariante de las poblaciones y la cantidad de flujo de genes que históricamente se ha producido entre ellas. Debido a que las diferencias genéticas constituyen la materia prima para la selección natural, la diferenciación genética de la población también puede indicar las posibilidades de adaptación local o especiación en el futuro (Bohonak, 1999).

Los primeros estudios de marcado y recaptura demostraron que las hembras de tortugas marinas mostraban una fuerte fidelidad hacia las zonas de anidación donde nacían, aún cuando sus hábitats de alimentación se traslapaban con otras colonias reproductoras (Hendrickson, 1958; Carr y Ogren, 1960).

A partir de estas observaciones se plantearon dos modelos que explican este comportamiento de fidelidad: 1) filopatría natal y 2) facilitación social. En el primer modelo (Carr, 1967), las hembras primerizas regresan a su región natal a anidar y permanecen fieles a lo largo de su vida. En el segundo (Owens *et al.*, 1982), las hembras primerizas siguen a otras hembras con experiencia fuera de los hábitats de alimentación a las zonas de reproducción, a las que regresarán posteriormente. Si las hembras regresan fielmente a sus sitios de origen, entonces cada colonia anidante debe poseer una firma genética única en términos de ADN mitocondrial (Bowen y Karl, 2007).

En los últimos años, la hipótesis de la filopatría natal ha sido probada y confirmada en tres especies de tortugas marinas con datos de ADN mitocondrial, pero no en golfinas (Bowen *et al.*, 1992 y 1994; Bass *et al.*, 1996; FitzSimmons *et al.*, 1997).

La diferenciación genética en linajes maternos implica una independencia demográfica de las colonias (en escalas de tiempo ecológico), tal que para fines de manejo, cada colonia anidante debería ser vista como autónoma con respecto a la reproducción de las hembras (Bowen y Avise, 1995). Sin embargo, no se ha examinado la filopatría natal en machos de tortugas marinas, y es posible que los machos muestren mayor flexibilidad en la elección de grupos reproductivos, quizás a través de la facilitación social (FitzSimmons *et al.* 1997b, Abreu-Grobois *et al.* 2000, Bowen y Karl 2007).

El ADN mitocondrial ha demostrado ser particularmente efectivo para detectar la estructura poblacional en las tortugas marinas, debido a que presenta una alta tasa

mutacional, herencia matrilineal y la ausencia de recombinación (FitzSimmons *et al.*, 2000). En los últimos años, el empleo de la región control de ADN mitocondrial ha mostrado ser muy eficiente en la identificación de poblaciones en tortugas marinas; ésta región evoluciona de 4 a 7 veces más rápidamente que el genoma mitocondrial completo, el cual se ha analizado por fragmentos de restricción (RFLP) (Avice *et al.*, 1987). Por esta razón, la región control es el segmento de ADN mitocondrial de elección para los estudios en playas de anidación (Abreu-Grobois *et al.*, 1996).

La mayoría de las veces, los marcadores heredados por las hembras ofrecen una ventaja distinta porque proveen información sobre las conductas reproductoras de las hembras, dicha conducta es de gran importancia para la supervivencia de la especie (Bowen y Avice, 1995). Dada su herencia matrilineal la dinámica evolutiva mitocondrial es sensible a la filopatría natal de las hembras (Bowen, 1995; FitzSimmons *et al.*, 2000). Algunos estudios que han empleado este locus para evaluar la estructura genética poblacional en tortugas marinas son: la tortuga verde en el Atlántico occidental (Encalada *et al.*, 1996), la tortuga Carey en el Caribe (Bass *et al.*, 1996), la laúd (Dutton *et al.*, 1999) y las golfinas a nivel global (Bowen *et al.*, 1998).

En estudios genéticos de estructura poblacional en tortuga golfina en el Pacífico Oriental, se han encontrado diferentes niveles de diferenciación genética entre las colonias anidantes, resultando en dos escenarios: 1) población panmíctica (Briseño-Dueñas, 1998; López-Chávez, 2000) y 2) estructura genética (López-Castro y Rocha-Olivares, 2005; Rodríguez-Zárate, 2008).

Briseño-Dueñas (1998), analizó la variación genética de la región control del ADN mitocondrial de seis colonias anidantes incluyendo localidades en México (n= 101; Sinaloa, Jalisco, Guerrero, Oaxaca y Chiapas), Costa Rica y el norte de Australia; concluyendo que las colonias del Pacífico Oriental pertenecen a una sola población panmíctica y sólo se diferencian de las colonias de Australia.

López-Chávez (2000), analizó la distribución geográfica de la variación de tres loci de microsatélites del ADN nuclear no específicos para esta especie, en ocho colonias de localidades en México (n= 160; Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Chiapas), Nicaragua y Costa Rica. La mayoría de la variación genética se encontró dentro de las

poblaciones. Este resultado corrobora y complementa aquel obtenido a partir de los datos con la región control (Briseño-Dueñas, 1998) y refleja la existencia de un alto intercambio genético entre las poblaciones, por lo menos en escalas de tiempo genético (varias generaciones).

No obstante, ninguno de los estudios anteriores incluyó las playas de anidación de la península de Baja California Sur. López-Castro *et al.* (2004), encontraron que las tallas de las crías de la península eran significativamente mayores al promedio registrado para algunas playas de la costa occidental de nuestro país y para algunas otras partes del mundo; sugiriendo que esta área podría albergar una población diferenciada a la del resto del Pacífico Oriental.

Considerando lo anterior, López-Castro y Rocha-Olivares (2005) compararon el ADN mitocondrial de muestras provenientes de Baja California Sur contra muestras provenientes del continente (Briseño-Dueñas, 1998); proporcionando evidencia sobre la existencia de una población diferenciada respecto al continente. Baja California Sur presentó diferencias significativas con algunas colonias (Guerrero y Costa Rica) y se caracterizó por tener una baja diversidad genética debido a la dominancia del haplotipo K en un 91.6% de las tortugas analizadas. Sin embargo, en este trabajo se analizaron muestras contemporáneas (temporada de anidación 2002-2003) con información histórica (anterior a 1998); los resultados reflejan los efectos tanto de una señal geográfica como de una temporal en la estructura genética. Por otra parte, el esfuerzo de muestreo no fue equitativo, pudiendo pasar por alto haplotipos en las localidades donde el esfuerzo de muestreo fue menor.

Recientemente, Rodríguez-Zárate (2008) analizó tres loci microsatelitales específicos provenientes de 18 colonias anidantes del Pacífico mexicano, distribuidas en los estados de Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Guerrero, Michoacán y Chiapas; abarcando la mayor área geográfica hasta la fecha y con muestras de una misma temporada (2006-2007). El análisis de estructura poblacional no fue concluyente debido al bajo número de loci analizados y a los resultados contrastantes que dependieron del índice de fijación estimado; los resultados obtenidos mediante el índice de F_{ST} sustentan la diferenciación encontrada por López-Castro y Rocha-Olivares (2005), mientras que los

resultados obtenidos mediante el índice de fijación de R_{ST} sugieren la ausencia de estructura poblacional entre las colonias anidantes de tortuga golfina en el Pacífico mexicano (Briseño-Dueñas, 1998; López-Chávez, 2000).

I.4. Justificación

Aunque la tortuga golfina es la especie más abundante de todas las tortugas marinas, es también la que menos se ha investigado. Esto podría deberse al hecho de que no abunda en regiones del mundo en donde se ha dirigido la mayor parte de los recursos para la investigación de estas especies. Además, buena parte de la información generada sobre esta especie ocurre en países en vías de desarrollo donde permanece en la literatura "gris" como informes técnicos, tesis o artículos de difusión con escasa circulación (Abreu *et al.*, 2000).

En los últimos años ha surgido la preocupación con respecto a las relaciones genéticas entre las hembras anidadoras de tortuga golfina alrededor del mundo, debido a la reducción drástica en el número de anidaciones en las diferentes playas, con respecto a datos históricos. Clifton *et al.* (1982) estimaron un total de 10 millones de adultos antes de 1950; en 1969, después de años de explotación, el estimado fue de poco más de un millón. Al tratarse de una especie amenazada y vulnerable, es de suma importancia conocer el nivel de variabilidad genética en las colonias anidantes por las implicaciones que esto conlleva (ej. cuellos de botella, vulnerabilidad a cambios ambientales).

Si bien en el Pacífico Oriental se han desarrollado diversos estudios sobre la estructura poblacional de la especie, no existe un resultado definitivo y las opiniones son encontradas; muchos de estos estudios tienen limitaciones o desventajas que pueden influir en la interpretación de sus resultados. Por otra parte, la mayoría de los estudios genéticos poblacionales en tortugas marinas toman a la filopatría natal como la principal fuente de estructura poblacional y aislamiento reproductivo, no obstante, la tortuga golfina puede presentar cierta flexibilidad al escoger las playas de anidación y ésta puede variar tanto espacial como temporalmente.

El trabajo de Rodríguez-Zárate (2008) es hasta la fecha el más completo, en el sentido de la cobertura de un área geográfica mayor y el muestreo simultáneo. Pese a esto,

sus resultados no fueron concluyentes, el número de loci analizados fue bajo y el tamaño de muestra muy variable. Por otra parte, es recomendable comparar estudios que involucren tanto el flujo de machos (en este caso los microsatélites) y el de las hembras (ADN mitocondrial) para proporcionar una explicación más completa de la estructura genética de la población.

Este estudio analiza muestras contemporáneas de una misma temporada de anidación provenientes de la mayoría de playas de anidación de la tortuga golfina en la Península de Baja California y playas del Pacífico continental mexicano. Se buscó incrementar y estandarizar los tamaños de muestra en comparación con los trabajos anteriores con el fin de evaluar la estructura genética poblacional con base a datos contemporáneos más extensos, mediante el análisis de la región control del ADN mitocondrial.

Este trabajo pretende generar información que permita conocer la diversidad genética mitocondrial de la especie en la región del Pacífico mexicano, así como hacer inferencias sobre la estabilidad temporal (histórica) de la diversidad genética de las poblaciones de la especie en las playas de anidación mexicanas. Dado su estatus de especie en peligro de extinción, la información generada será de utilidad para el desarrollo de planes de manejo con mayor base científica.

I.5. Hipótesis

Las hipótesis nulas de este estudio son:

1. No existe diferenciación genética mitocondrial entre las colonias anidantes de tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* a lo largo del Pacífico Mexicano.
2. No existe diferenciación genética mitocondrial entre las colonias anidantes peninsulares y las continentales.
3. No existen diferencias en los niveles de diversidad mitocondrial entre las playas de anidación masiva y las playas de anidación solitaria.

I.6. Objetivos

I.6.1 Objetivo general

Estimar la diversidad mitocondrial y el grado de diferenciación genética entre las colonias anidantes de tortuga golfina *L. olivacea* del Pacífico mexicano.

I.6.2 Objetivos particulares

1. Estimar la diversidad mitocondrial en las colonias anidantes.
2. Estimar los niveles de estructuración genética mitocondrial entre colonias anidantes.
3. Estimar el grado de diferenciación genética mitocondrial entre las colonias anidantes peninsulares y las continentales.
4. Comparar los niveles de diferenciación genética mitocondrial entre playas masivas y playas solitarias.
5. Evaluar los patrones filogenéticos y filogeográficos de *L. olivacea*.
6. Evaluar la demografía histórica de las colonias anidantes de *L. olivacea* en el Pacífico mexicano.

II. Metodología

II.1 Área de estudio

La zona de estudio comprendió toda la costa del Pacífico mexicano incluyendo la península de Baja California. En la península de Baja California Sur los muestreos se realizaron en las playas de Punta Arenas, Punta Colorada y Parque Nacional Cabo Pulmo; ubicadas sobre el litoral del Golfo de California. En la costa del Pacífico se incluyeron las playas de Todos Santos, Pescadero, San Cristóbal y San José del Cabo. Para el continente se obtuvieron muestras de las playas El Verde Camacho en Sinaloa; Platanitos y Nuevo Vallarta en Nayarit; Bahía de Banderas y Playón de Mismaloya en Jalisco; Boca de Apiza-El Chupadero en Colima; Playa Ticuiz en Michoacán; Tierra Colorada en Guerrero; La Escobilla, San Juan de Chacagua y Barra de la Cruz en Oaxaca; y Puerto Arista en Chiapas. (Figura 6).

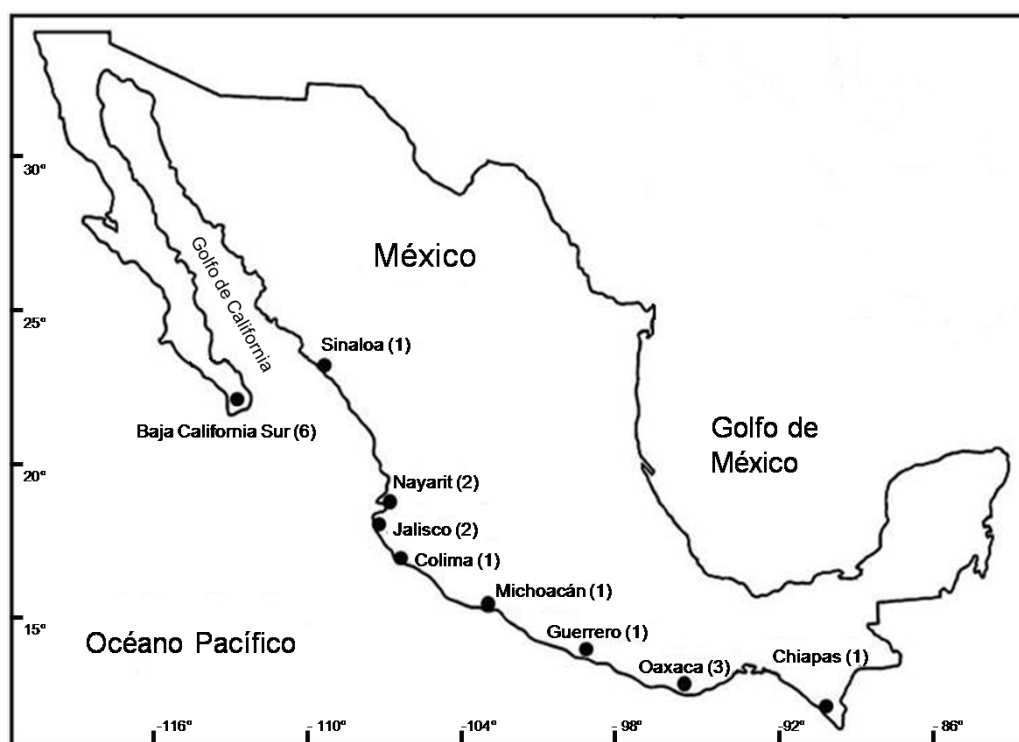


Figura 6. Sitios de Colecta de muestras de tejido de *Lepidochelys olivacea*. Los números entre paréntesis indican las playas muestreadas en cada estado.

II.2 Obtención de muestras

En este estudio se utilizaron las muestras obtenidas por Rodríguez-Zárate (2008), que se colectaron durante la temporada de anidación septiembre 2006-febrero 2007. La colecta en la península de Baja California Sur estuvo a cargo de la M. en C. Jimena Rodríguez Zárate en colaboración con ASUPMATOMA, A.C. (Asociación Civil) y el Municipio. de Los Cabos. En el continente, se contó con la colaboración de la CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). El muestreo se dirigió a obtener biopsias de tejido cutáneo de las hembras.

Para evitar el remuestreo, después de obtener las muestras se marcó a las hembras con marcas metálicas tipo *inconel* de numeración ascendente y con las siglas ML. Las marcas se obtuvieron mediante la colaboración del Programa de Tortugas Marinas de la CONANP y fueron donadas por el National Oceanic & Atmospheric Administration U.S. Department of Commerce (NOAA) de los Estados Unidos. En los casos en que no fue posible marcar a las hembras, las muestras se tomaron en un periodo de tiempo no mayor a 15 días durante el cual se espera que no se presente la reanidación. Cuando no fue posible obtener una biopsia de la hembra anidante, se muestreó su nido tomando una muestra de tejido de un embrión o una cría muertos por causas naturales. Sólo fueron considerados aquellos nidos puestos dentro de un periodo no mayor a 15 días, para evitar el muestreo múltiple y sesgar la frecuencia de aparición de haplotipos.

El tamaño de muestra depende de la técnica utilizada, el nivel de diferenciación genética y la pregunta bajo consideración. Para delimitar poblaciones reproductoras con el ADN mitocondrial, se recomienda un tamaño de muestra de 20 individuos para la mayor parte de las evaluaciones poblacionales (FitzSimmons *et al.*, 2000). Tomando en cuenta lo anterior, y buscando obtener un tamaño de muestra que fuera representativo de la variabilidad genética de la región control del ADN mitocondrial para *L. olivacea* en las costas del Pacífico mexicano, se adoptó un tamaño de muestra de 30 organismos por zona de anidación (separadas entre sí por distancias que oscilan entre 100 a 1000 km).

II.3 Trabajo de laboratorio

II.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN del tejido de las hembras se realizó mediante el protocolo de digestión con proteinasa K y se usó cloruro de litio para su purificación. Primero, la proteinasa K digiere las proteínas y éstas son precipitadas por remoción de sales mediante el cloruro de litio. Enseguida, mediante cloroformo y alcohol isoamílico (24:1) se procedió a la separación de restos de tejido y lípidos. Finalmente, se llevó a cabo la purificación de ADN total por precipitación, añadiendo acetato de sodio 3M pH 5.2 y etanol absoluto frío. El ADN extraído (stock) se preservó en TE 1x pH 8.0 a -20°C. Para cada stock de ADN purificado se realizaron alícuotas con una dilución 1:10 para realizar la amplificación de la región control de ADN mitocondrial; en los casos en que la concentración del ADN fue alta, se realizaron diluciones 1:100.

Para el tejido de embriones, la extracción se realizó empleando la técnica de Resina Chelex (Estoup *et al.*, 1996). Esta es una técnica de extracción rápida de ADN; una porción de tejido se incubó en 500 µl de una solución chelex al 10% (Biorad, Resina Chelex 100 /100-200 mesh, preparada en agua desionizada estéril a -20°C) previamente calentada a 60°C. Para obtener una mejor amplificación de la región control de ADN mitocondrial, se adicionan 7.5 µl de proteinasa K [10 mg/ml]. Las muestras son llevadas al horno durante una hora a 55°C y finalmente 15 minutos a 100°C, para desnaturalizar la proteinasa K. El ADN extraído fue conservado a -20°C.

II.3.2 Amplificación de la región control (D-loop) del ADN mitocondrial

Para amplificar la región control del ADN mitocondrial, se utilizaron los cebadores o primers LCM-15382 (5'-GCTTAACCCTAAAGCATTGG-3'), diseñado por el Dr. Abreu-Grobois *et al.*, (2006) y H87910 (5'-GGGTTTAGTTAAAAAATACGG-3') diseñado por López-Castro y Rocha-Olivares (2005). Las amplificaciones se realizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este procedimiento consiste en la generación de múltiples copias de un fragmento específico del ADN delimitado por los cebadores.

Se hicieron reacciones de 25 μ l que incluyeron 0.5 μ l dNTP's, 1x PCR buffer (Tris-HCL 10 mM, KCl 50 mM, 1.5 mM $MgCl_2$), 0.5 μ M de cada primer, 0.15 unidades de Taq DNAPol y 3.0 μ l de ADN genómico. Estas reacciones fueron sometidas a un perfil de termociclado con un periodo inicial de 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de: desnaturalización, 2 min a 94°C; anillamiento, 45 s a un intervalo de 56°C a 50°C dependiendo de la localidad; y polimerización, 1:30 min a 72°C; finalmente, un periodo de 5 min a 72°C. En todas las reacciones se incluyeron controles negativos (reacciones libres de ADN) para descartar la contaminación de los reactivos utilizados.

Para evaluar la cantidad y calidad de las amplificaciones, los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis, en geles de agarosa al 1.5%.

II.3.3 Purificación y secuenciación de ADN

Antes de llevar a cabo el proceso de secuenciación, es necesario purificar el ADN; la purificación consiste en eliminar los dNTPs y oligonucleótidos que no fueron utilizados en la reacción de PCR, mediante el protocolo de limpieza exoSAP-IT[®]. Dicho protocolo involucra la acción de dos enzimas hidrolíticas: exonucleasa y fosfatasa alcalina de camarón; la primera rompe los enlaces fosfodiéster del ADN de cadena sencilla (primers), y la segunda elimina los grupos fosfatos de dNTP's. Se utilizó una proporción aproximada de 2.5 μ l de producto de PCR por cada 1.0 μ l de exoSAP-IT[®]; cada muestra amplificada se incubó por 15 min a 37°C para la digestión de las enzimas y 15 min a 80°C para su desnaturalización.

Una vez limpios, los productos de PCR se utilizaron para preparar reacciones de secuenciación de 12 μ l; 3.5 μ l de agua destilada estéril, 3 μ l del primer (LCM15382) con concentración 1 Mm, 2 μ l de Big Dye terminator v3.1 (Applied Biosystems, California) y 3.5 μ l de producto limpio de PCR. Las reacciones tuvieron una desnaturalización inicial de 1 min a 94°C, seguida de 25 ciclos con el siguiente perfil de temperaturas: desnaturalización, 10 s a 94°C; anillamiento, 10 s a 50°C; y extensión, 4 min a 60°C. Los fragmentos secuenciados se limpiaron mediante precipitación etanólica, y se detectaron en un secuenciador automático GENE ANALYZER ABI 377 (Applied Biosystems, California).

II.4 Análisis de datos

II.4.1 Edición y alineamiento de secuencias

La complementariedad de las secuencias nucleotídicas de cada hebra de ADN y los posibles errores causados por el secuenciador, se verificaron con el programa CodonCode Aligner[®] v2.0.6; con este proceso se garantiza que la secuencia sea la correcta antes de comenzar las comparaciones.

Una vez verificadas, se alinearon las secuencias individuales con el programa Clustal W (Higgs *et al.*, 1994) y se identificaron los sitios variables entre secuencias con el programa MEGA v4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Finalmente, con las secuencias alineadas se obtuvo la lista de haplotipos totales y por localidad con el programa Dna SP v4.9 (Rozas *et al.* 2003)

II.4.2 Búsqueda e identificación de haplotipos

De las distintas fuentes de información disponibles (GeneBank; Briseño-Dueñas, 1998; Bowen *et al.*, 1998; y López-Castro y Rocha-Olivares, 2005), se encontraron un total de 26 haplotipos de la región control del ADN mitocondrial para la tortuga golfina en las distintas zonas de distribución a nivel mundial.

Tras establecer el número de haplotipos para este estudio, se procedió a compararlos con los haplotipos registrados para la especie, principalmente con los del Pacífico Oriental. Se construyeron matrices de distancia utilizando el programa PAUP v4.0 (Swofford, 1998) con la finalidad de determinar la identidad de los haplotipos encontrados en este estudio; estas matrices consideran el número total de diferencias (mutaciones, incluyendo indels) entre pares de haplotipos.

II.4.3 Diversidad genética

Para estimar la diversidad genética de las colonias anidantes, se calculó el índice de diversidad haplotípica (h), que se define como la probabilidad de que dos haplotipos de la muestra elegidos al azar sean diferentes. Se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

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

donde n es el tamaño de muestra, k es el número de haplotipos encontrados y p_i es la frecuencia del i ésimo haplotipo de la muestra (Nei, 1987).

También se utilizó el índice de diversidad nucleotídica (π), el cual estima la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos en posición escogidos al azar sean diferentes. Se calcula a partir de la fórmula:

$$\pi = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_i p_j d_{ij}}{L} \quad (2)$$

donde p es la frecuencia de cada uno de los nucleótidos i y j que son comparados, d es el número de diferencias de nucleótidos por sitio entre las secuencias comparadas y L es el número de loci (Nei, 1987), que en el caso del ADN mitocondrial se refiere a la longitud de la secuencia. Los cálculos de los índices se realizaron con el programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Ya que en algunas zonas de anidación se muestreó más de una playa (Tabla I), los análisis de diversidad genética se realizaron de la siguiente manera: a) Cuando el tamaño de muestra fue menor o igual a diez individuos, todas las playas se agruparon en una sola región; y b) Cuando el tamaño de muestra fue mayor a diez individuos, se realizó una prueba *t-Student* (Hutcheson, 1970) para comparar las diversidades genéticas. Cuando no se encontraron diferencias significativas, las playas se agruparon en una sola región.

II.4.4 Estructura y Flujo Genético

Para estimar el nivel de diferenciación genética de las colonias anidantes se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992), en donde se probó la hipótesis nula de panmixia (ausencia de estructura genética) en su conjunto y entre pares de muestras mediante el índice de fijación Φ_{ST} (Wright, 1951). Dicho índice utiliza las frecuencias haplotípicas para cuantificar la pérdida de diversidad debida a la ausencia de apareamiento al azar en la población en su conjunto; sus valores van de 0 (frecuencias

alélicas idénticas entre muestras; panmixia) a 1 (cada muestra se ha fijado a una variante alélica distinta).

Para determinar diferencias entre las distintas colonias, se hicieron comparaciones pareadas mediante Φ_{ST} , análogo al F_{ST} , que además de las frecuencias haplotípicas, incorpora también las distancias genéticas inter-haplotípicas como componente de la varianza. Fue necesario corregir la significancia de las pruebas con la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). Todos los análisis se realizaron con el programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Los valores de Φ_{ST} pareados obtenidos en el AMOVA se utilizaron para estimar el flujo genético (Nm) entre las colonias anidantes. El flujo genético se define como el número de migrantes entre poblaciones por generación y se obtiene a partir de la ecuación descrita por Nei (1987):

$$Nm = \left(\frac{1 - \Phi_{ST}}{2\Phi_{ST}} \right) \quad (3)$$

donde Nm es el número efectivo de hembras que migra entre poblaciones por generación.

II.4.5 Comparación de diversidades mitocondriales entre playas de anidación masiva y playas solitarias

La comparación de diversidades mitocondriales entre estos dos tipos de playas se realizó mediante una prueba t de Hutcheson que compara índices de diversidad (Hutcheson, 1970):

$$t = \frac{H'_1 - H'_2}{S_{H'_1 - H'_2}} \quad (4)$$

donde H'_1 y H'_2 corresponden a los índices de diversidad y S es la varianza de cada H' .

II.4.6 Relaciones filogenéticas entre haplotipos

Con el propósito de evaluar las relaciones evolutivas entre los haplotipos de *L. olivacea*, se construyó un árbol filogenético mediante el método de distancia Neighbor Joining, utilizando el programa MEGA v4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Para el Neighbor Joining se calculó el mejor modelo evolutivo que se ajustara a nuestros datos, para ello se utilizó el programa Modeltest v3.7 (Posada y Crandall, 1998); este programa ajusta mediante verosimilitud máxima el mejor de un total de 56 modelos de evolución molecular. Con base en el modelo evolutivo se calculó la matriz de distancias genéticas con ayuda del programa PAUP v4.0 (Swofford, 1998) utilizada para la reconstrucción filogenética; dicha matriz también fue utilizada para el análisis de estructura genética. Se realizó un remuestreo (bootstrap) no paramétrico de 500 pseudorréplicas para evaluar la topología del árbol resultante. Finalmente, se utilizó a *Lepidochelys kempii* en la reconstrucción filogenética para enraizar el árbol.

II.4.7 Demografía histórica

Con el fin de conocer aspectos sobre la demografía histórica de las colonias anidantes de tortuga golfina en el Pacífico mexicano, que permitieran establecer eventos de colonización o cuello de botella ocurridos en el pasado, se utilizó un análisis de distribución de diferencias inter-haplotípicas (mismatch distribution). Es posible reconocer estos eventos ya que el aumento o disminución del tamaño poblacional deja señales en la forma de la distribución de las diferencias inter-haplotípicas (Rogers y Harpending, 1992; Rogers, 1995). Las poblaciones que han permanecido en equilibrio demográfico estable por mucho tiempo presentan distribuciones caóticas y disparejas (multimodales), mientras que aquellas que han sufrido cuellos de botella o expansiones presentan distribuciones suaves (unimodales; Harpending, 1994).

Para este análisis, se construyó la distribución de diferencias inter-haplotípicas para cada colonia anidante y se calcularon los parámetros del modelo de expansión repentina de Rogers y Harpending (1992). En este análisis se compararon los valores observados en nuestros datos contra los esperados por el modelo; los datos del modelo suponen la existencia de una expansión demográfica repentina. Las distribuciones de diferencias inter-

haplotípicas y los parámetros del modelo de expansión repentina son: $\tau = 2\mu t$, $\theta_0 = 2\mu N_0$ antes de la expansión, $\theta_1 = 2\mu N_1$ después de la expansión, donde μ es la tasa de mutación específica del fragmento, t es el tiempo en generaciones desde la expansión, y N es el tamaño efectivo de la población (Rogers y Harpending, 1992). Se probó la bondad de ajuste del modelo utilizando el método de mínimos cuadrados mediante el programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

III. Resultados

III.1 Muestreo

Durante la temporada de anidación 2006-2007 se muestrearon 19 playas distribuidas en nueve estados a lo largo de todo el Pacífico mexicano. Se obtuvo un total de 583 muestras de tejido; 298 pertenecieron a hembras anidantes y 285 a embriones. Para los estados de Sinaloa y Nayarit únicamente se obtuvieron muestras de embriones. Cuatro campamentos recibieron placas de marcaje, sin embargo, éstas llegaron demasiado tarde durante la temporada de anidación, por lo que el marcaje de hembras fue limitado; en la mayoría de las playas la colecta de muestras se completó antes de recibir las marcas y las pinzas. No obstante, se logró marcar un total de 89 hembras pertenecientes a los estados de Colima, Oaxaca y Chiapas como se reportó en el trabajo de Rodríguez Zárate (2008).

En la mayoría de las zonas de anidación se secuenciaron 30 individuos; en los casos particulares de Guerrero y Michoacán se analizaron todas las tortugas disponibles (N=18) (Tabla I).

En aquellas localidades en las que se muestrearon tanto hembras como embriones, se intentó que la mayor parte de las muestras genotipificadas provinieran de las hembras; cuando esto no fue posible, se completó el tamaño de muestra con embriones. Dicho lo anterior, del total de muestras obtenidas (583) durante la temporada de anidación, para este estudio se utilizaron un total de 246 muestras; 152 de hembras y 94 de embriones (Tabla I).

Se obtuvo un éxito del 100% en la extracción, amplificación y secuenciación de las muestras, es decir, las 246 muestras fueron genotipificadas.

Tabla I. Tamaño de muestra de *Lepidochelys olivacea* por playa de anidación y totales por estado durante la temporada de anidación de 2006-2007.

Estado	Playa	Hembras	Embriones	Total
Baja	Todos Santos	2	0	
California	Pescadero	1	2	
Sur	San Cristobal	2	3	
	El Suspiro	6	4	30
	San Jose del Cabo	6	0	
	Cabo Pulmo	1	1	
	Punta Colorada	2	0	
Sinaloa	El Verde Camacho	0	30	30
Nayarit	Platanitos	0	15	30
	Nuevo Vallarta	0	15	
Jalisco	El Salado	13	0	30
	Playón de Mismaloya	17	0	
Colima	Boca de Apiza	6	24	30
Michoacán	Playa Ticuiz	18	0	18
Guerrero	Tierra Colorada	18	0	18
Oaxaca	La Escobilla	24	0	
	Barra de la Cruz	3	0	30
	San Juan de Chacagua	3	0	
Chiapas	Punta Arista	30	0	30
Total		152	94	246

III.2 Edición y alineamiento de secuencias

Después de verificar la determinación de bases de las secuencias individuales, éstas fueron alineadas. El tamaño del alineamiento múltiple correspondió al máximo número de nucleótidos compartidos entre todas las secuencias, después de eliminar los extremos de baja calidad. Dicho alineamiento produjo un fragmento total de 653 pares de bases (pb); el tamaño de las secuencias sin alinear varió entre 649 y 651 pb.

III.3 Identificación y distribución de los haplotipos

Al comparar las 246 secuencias, se observaron 19 sitios variables: 10 transiciones, 4 transversiones y 6 indels (borrado o inserción) de un solo nucleótido; estos polimorfismos

resultaron en 29 haplotipos de la región control del ADN mitocondrial para tortuga golfina en el Pacífico mexicano (Tabla II). La nomenclatura utilizada en el presente estudio para aquellos haplotipos que ya habían sido reportados para la especie es la propuesta por López-Castro y Rocha-Olivares (2005, Tabla III en este estudio).

El fragmento de ADN de la región control analizado en este estudio (653 pb) es mayor que el de los haplotipos reportados para la especie. Cabe señalar que los diferentes haplotipos registrados para la especie, presentaban tamaños entre 399 y 508 pb, dependiendo de la fuente de origen. Por lo tanto, las comparaciones se realizaron por separado y únicamente se consideró el área de traslape de los haplotipos reportados y los encontrados en este estudio. Por esta razón, varios haplotipos de este trabajo puede ser iguales a un mismo haplotipo reportado por otros autores (Figura 7).

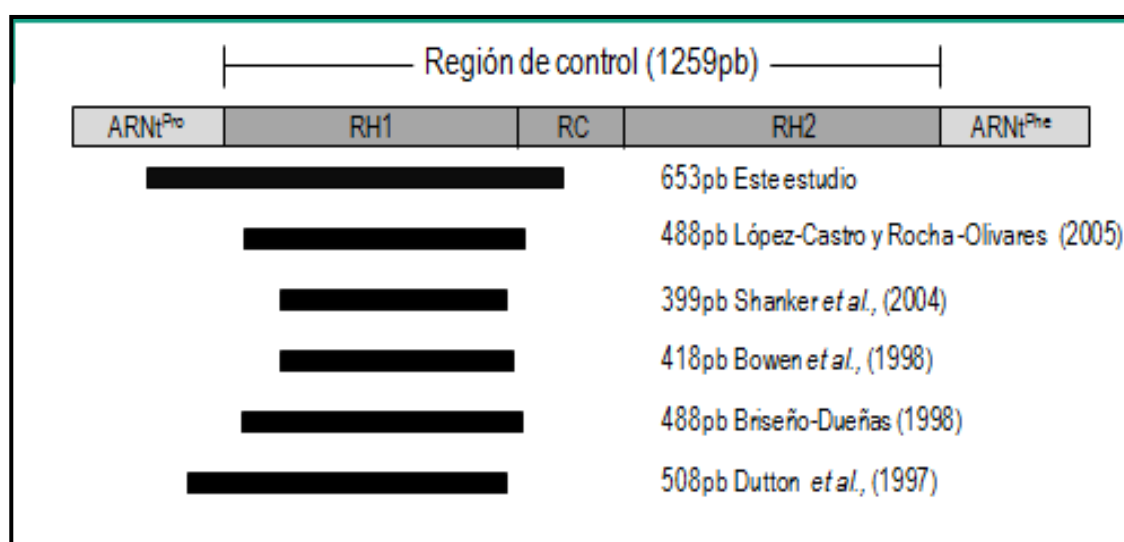


Figura 7. Mapa de la región de control del ADN mitocondrial; ARNt^{Pro}= gen que codifica el ARN de transferencia de la prolina, RH1= región hipervariable uno, RC= región conservada, RH2= región hipervariable dos, ARNt^{Phe}= gen que codifica el ARN de transferencia de la fenilalanina, pb = pares de bases. Las barras negras representan fragmentos de ADN analizados por diversos estudios.

Las comparaciones indicaron que de los 29 haplotipos registrados en este estudio, diez ya habían sido reportados para las colonias anidantes de tortuga golfina en esta región por Briseño-dueñas (1998) y López-Castro y Rocha-Olivares (2005). En la comparación con Briseño-dueñas (1998) se encontró que el haplotipo Lo14=R, Lo15=T, Lo21=M, Lo22=W y Lo24=R (Apéndice I, Tabla III); sin embargo, esta comparación se encuentra

basada en un fragmento de sólo 488pb (Figura 7, Apéndice I). Las igualdades en la comparación con López-Castro y Rocha-Olivares (2005) fue la siguiente: Lo1=N, Lo5=O, Lo7=V, Lo9=L y Lo13=U (Clave de acceso GenBank: AY920519-AY920523) (Tabla III, Apéndice II).

Tabla II. Sitios variables entre los haplotipos de *Lepidochelys olivacea* encontrados en la zona de estudio. Los números representan la posición de la base con respecto a la secuencia del haplotipo N en dirección 5'-3'. El primer nucleótido de los haplotipos encontrados corresponde al nucleótido 15510 del genoma mitocondrial de *L. olivacea* (clave de acceso en GenBank: AM258984).

Haplotipo	Posición del Nucleótido																		
	139	198	218	246	284	393	395	422	460	462	464	465	468	469	509	510	532	588	591
Lo1	T	T	C	A	C	G	C	T	G	T	A	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo2	T	T	C	A	C	G	C	T	G	T	A	-	A	-	A	T	-	T	C
Lo3	T	T	C	A	C	-	C	T	G	T	A	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo4	T	T	C	G	C	G	C	T	G	T	A	A	A	-	A	T	-	T	C
Lo5	T	T	C	A	C	G	C	T	G	T	A	A	A	-	A	T	-	T	T
Lo6	T	T	C	A	C	G	C	T	A	C	A	-	A	-	A	T	-	T	C
Lo7	T	T	C	G	C	G	C	T	G	T	A	A	A	-	A	T	-	T	T
Lo8	T	T	C	A	C	G	C	T	G	T	A	A	A	-	A	T	-	T	C
Lo9	T	T	C	A	T	G	C	T	G	T	G	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo10	T	T	C	A	C	G	C	T	G	T	A	-	A	-	A	-	-	T	T
Lo11	T	T	C	A	C	G	C	T	G	T	A	-	A	-	A	T	-	C	T
Lo12	T	T	C	A	C	G	C	T	G	T	A	A	A	-	G	T	-	T	T
Lo13	T	T	C	A	C	G	C	T	A	C	A	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo14	T	T	A	A	T	G	C	T	G	T	G	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo15	T	T	C	A	C	G	T	T	G	T	A	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo16	T	T	C	A	C	G	C	T	G	T	A	-	A	-	A	T	A	T	T
Lo17	T	G	C	A	C	G	C	T	G	T	A	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo18	-	T	C	A	C	G	C	T	G	T	A	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo19	T	T	C	A	C	G	C	T	A	C	A	-	A	C	A	T	-	T	T
Lo20	T	G	C	A	C	G	C	T	G	T	A	A	A	-	A	T	-	T	T
Lo21	T	T	C	A	T	G	C	T	G	T	A	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo22	T	T	C	A	C	G	C	T	G	T	A	A	C	-	A	T	-	T	T
Lo23	T	T	C	G	C	G	C	T	G	T	A	A	C	-	A	T	-	T	T
Lo24	T	T	A	A	T	G	C	T	G	T	G	-	A	-	A	T	-	C	T
Lo25	-	T	C	A	T	G	C	T	G	T	G	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo26	T	T	T	A	C	G	C	T	G	T	A	A	A	-	A	T	-	T	T
Lo27	T	T	A	A	C	G	C	T	G	T	A	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo28	T	T	C	A	C	G	C	G	G	T	A	-	A	-	A	T	-	T	T
Lo29	T	G	C	A	T	G	T	G	G	T	G	-	A	-	A	T	-	T	T

 Nuevos sitios variables de la región control del ADN mitocondrial encontrados en este estudio.

Tabla III. Haplotipos de la región control de ADN mitocondrial de *Lepidochelys olivacea* encontrados en distintas zonas de anidación de la especie. Los haplotipos con terminación RB son los descritos por Briseño-Dueñas (1998), con terminación AF son tomados de Bowen *et al.* (1998), con terminación AY son tomados de López-Castro y Rocha-Olivares (2005) y de Genbank en cuyo caso, se muestra el número de acceso. En paréntesis se muestran las sinonimias de los haplotipos (tomado y modificado de López-Castro, 2004). En color gris se muestran los haplotipos encontrados en este estudio.

Atlántico	India	Indopacífico	Australia	Costa Rica	México	Número de acceso
EAF						
FAF						AF051773
		JAF (ARB)	ARB (JAF)			AF051774
	KAF	KAF				AF051775
	NW1					AF513542
	NW2					AF513547
	NW3					AF513544
	NW4					AF513545
	NW5					AF513546
		HAF				
		IAF				
			DRB			
			GAF			
				BRB (MAY)*		
				LOU		U40661
				LAF (ERB)	LAY (ERB)	AY920519
				OAF (NRB)	OAY (NRB)	AY920521
				NAF (KRB)	NAY (KRB)	AY920520
					CRB (QAY)*	
					FRB (RAY)*	
					GRB (SAY)*	
					IRB (TAY)*	
					UAY (MRB)	AY920522
					VAT (ORB)	AY920523
					PRB (WAY)*	

* Nomenclatura propuesta por López-Castro y Rocha-Olivares (2005).

De los 29 haplotipos encontrados, el 52% (11 haplotipos) fueron haplotipos privados, es decir, sólo se presentaron en una zona de anidación. Nayarit fue la zona de anidación más polimórfica con un total de 11 haplotipos, de los cuales sólo dos fueron privados (Tabla IV, Figura 8).

Tabla IV. Frecuencia relativa (%) de los haplotipos de la región control de ADN mitocondrial encontrados por zona de anidación a lo largo del Pacífico mexicano; en color gris se muestran los haplotipos privados.

Haplotipo	Zona de anidación									Total
	BCS	Sinaloa	Nayarit	Jalisco	Colima	Guerrero*	Michoacán*	Oaxaca	Chiapas	
N	80	60	33	57	57	72	33	63	63	59.8
O	7	10	17	4	10	6	6	3	3	8.5
R	3	3	-	-	10	-	17	7	-	4.1
Lo2	3	-	13	-	-	-	-	3	3	2.8
U	-	3	-	-	-	-	17	-	7	2.4
T	-	7	-	1	3	6	-	-	3	2.4
Lo18	-	-	-	1	3	-	6	3	7	2.4
L	-	3	7	2	-	-	-	-	-	2.0
M	-	3	3	-	-	6	-	7	-	2.0
V	-	7	3	-	-	-	-	-	3	1.6
Lo10	-	-	7	-	-	-	-	3	3	1.6
Lo12	-	-	3	-	-	6	-	3	-	1.2
Lo3	-	-	-	-	7	-	-	-	-	0.8
Lo4	-	-	-	-	3	-	-	-	3	0.8
Lo8	-	-	7	-	-	-	-	-	-	0.8
Lo11	-	-	3	1	-	-	-	-	-	0.8
Lo19	-	-	-	-	7	-	-	-	-	0.8
Lo6	-	-	3	-	-	-	-	-	-	0.4
Lo16	3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4
Lo17	3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4
Lo20	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0.4
W	-	-	-	-	-	6	-	-	-	0.4
Lo23	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0.4
Lo24	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0.4
Lo25	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0.4
Lo26	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0.4
Lo27	-	-	-	-	-	-	-	3	-	0.4
Lo28	-	-	-	-	-	-	-	3	-	0.4
Lo29	-	3	-	-	-	-	-	-	-	0.4
Haplotipos privados (%)	33	11	18	40	33	17	0	20	10	52

* Tamaño de muestra de 18 individuos, para todas las demás se obtuvieron 30 individuos.

Le siguen en orden descendiente las zonas de Jalisco, Oaxaca y Chiapas con diez haplotipos y Sinaloa con nueve. Las zonas de anidación con menor número de haplotipos fueron Michoacán con cinco haplotipos y Colima, Guerrero y Baja California Sur con seis haplotipos; cabe señalar que en Michoacán no se observaron haplotipos privados, por otro lado Jalisco fue la zona de anidación con mayor número de haplotipos privados (4) (Tabla IV, Figura 8).

N fue el haplotipo más abundante, observado en el 60% de los individuos en promedio en todas las zonas de anidación, seguido por el haplotipo O con el 9%; además, fueron los únicos haplotipos que estuvieron presentes en todas las zonas de anidación. El resto de los haplotipos presentaron abundancias menores al 2 (Tabla IV, Figura 8).

III.4 Diversidad genética

Para el caso de Baja California Sur, se consideró a las siete playas como una sola región debido a que en todas las playas se muestrearon menos de 10 individuos (Tabla I).

Por otro lado, al comparar a Nayarit y Jalisco por playas, no se encontraron diferencias significativas en la diversidad genética ($p > 0.05$; *t-Student* Hutcheson, 1970). Por esta razón, se decidió estimar la diversidad como una misma zona de anidación (Tabla V).

En el caso particular de Oaxaca, no se muestra la diversidad genética de las otras dos playas (Barra de la Cruz y San Juan Chacagua), ya que se obtuvo un bajo e insuficiente número de organismos ($n=3$) para estimar diversidades locales (Tablas I y V).

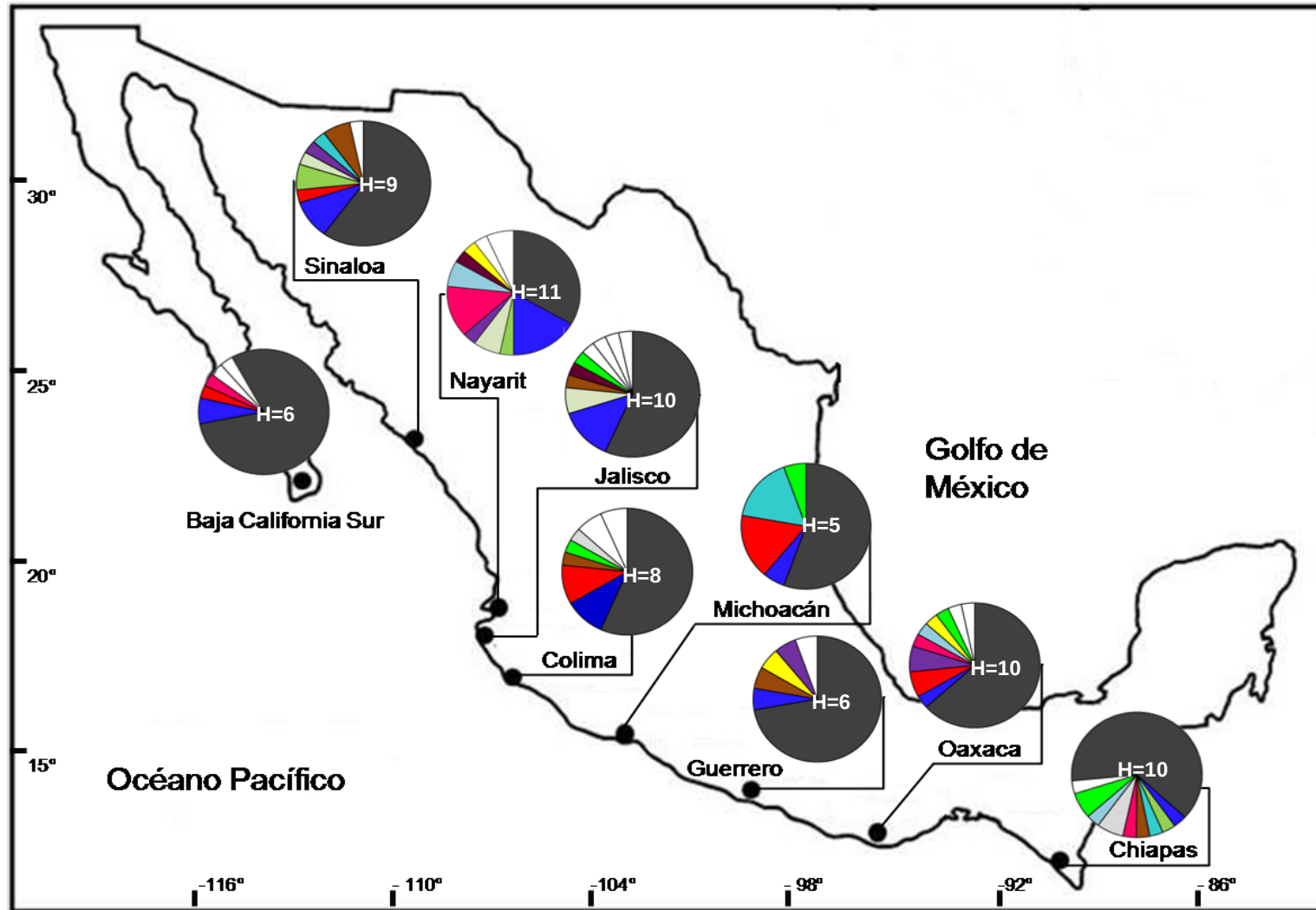


Figura 8. Distribución y frecuencia relativa de los haplotipos de la región control del ADN mitocondrial de *Lepidochelys olivacea* por zona de anidación a lo largo del Pacífico mexicano; en color blanco se muestran los haplotipos privados y en colores los compartidos, H=número de haplotipos.

En general, se observaron altos valores de diversidad haplotípica (h); el valor más bajo fue para la península de Baja California Sur ($h=0.363$), y el más alto fue para Nayarit ($h=0.853$) (Tabla V; Figura 9).

Tabla V. Índices de diversidad genética de las zonas de anidación de *Lepidochelys olivacea* a lo largo del Pacífico mexicano. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Zona de anidación	Tamaño de muestra	No. Haplotipos	Diversidad haplotípica $h (\pm DS)$	Diversidad nucleotídica $\pi (\pm DS)$
Baja California Sur	30	6	0.363 $\pm$ 0.111	0.00081 $\pm$ 0.00077
Sinaloa	30	9	0.637 $\pm$ 0.098	0.00209 $\pm$ 0.00148
Nayarit	30	11	0.853 $\pm$ 0.047	0.00243 $\pm$ 0.00165
Platanitos	15	9	0.914 $\pm$ 0.052	0.00275 $\pm$ 0.00188
Nuevo Vallarta	15	6	0.790 $\pm$ 0.078	0.00205 $\pm$ 0.00151
Jalisco	30	10	0.671 $\pm$ 0.092	0.00215 $\pm$ 0.00151
El Salado	13	4	0.615 $\pm$ 0.136	0.00169 $\pm$ 0.00133
Playón de Mismaloya	17	8	0.728 $\pm$ 0.114	0.00255 $\pm$ 0.00176
Colima	30	8	0.669 $\pm$ 0.091	0.00242 $\pm$ 0.00165
Guerrero	18	6	0.490 $\pm$ 0.142	0.00113 $\pm$ 0.00099
Michoacán	18	5	0.667 $\pm$ 0.103	0.00260 $\pm$ 0.00178
Oaxaca	30	10	0.602 $\pm$ 0.104	0.00156 $\pm$ 0.00119
La Escobilla	24	8	0.563 $\pm$ 0.119	0.00159 $\pm$ 0.00122
Chiapas	30	10	0.602 $\pm$ 0.104	0.00166 $\pm$ 0.00125

La diversidad haplotípica de Baja California Sur es significativamente menor a la de las otras zonas de anidación con excepción de Guerrero, Oaxaca y Chiapas ($p < 0.05$; *t-Student*). Por otro lado, la diversidad haplotípica de Nayarit es significativamente mayor a la de todas las zonas de anidación ($p < 0.05$; *t-Student*).

La diversidad nucleotídica (π) presentó bajos valores; el valor más bajo fue el de Baja California Sur ($\pi=0.000811$), y el más alto el de Michoacán ($\pi=0.002600$) (Tabla V). No se encontraron diferencias significativas para la diversidad nucleotídica entre ninguna de las zonas de anidación del Pacífico Mexicano ($p > 0.05$, Figura 10).

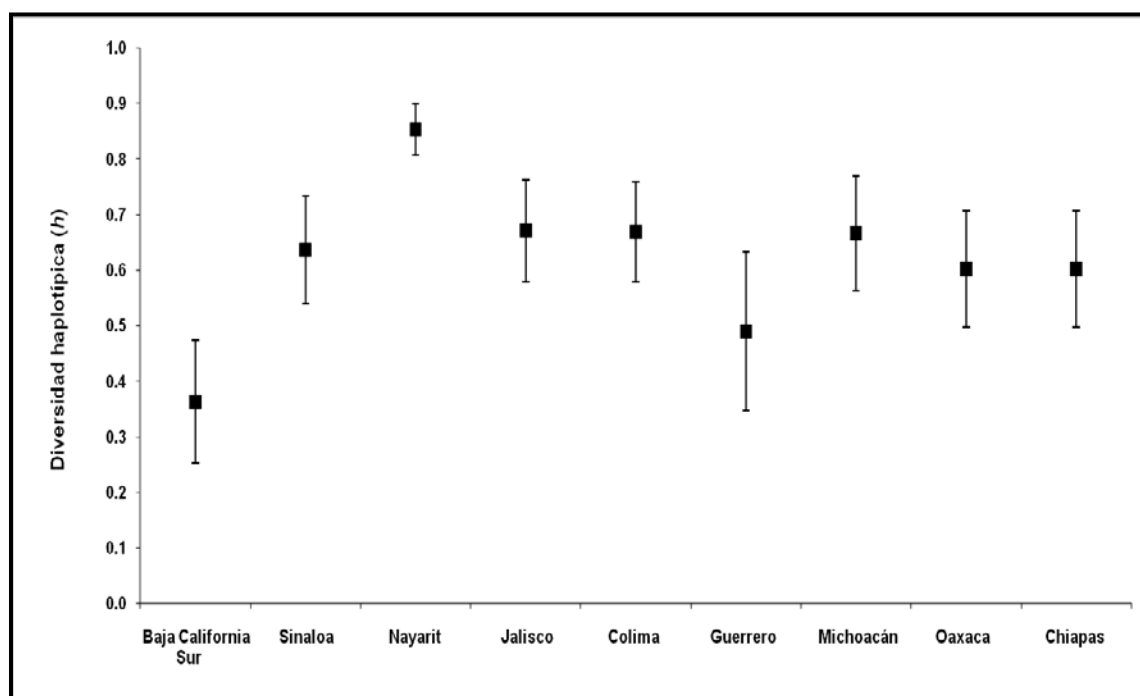


Figura 9. Comparación de la diversidad haplotípica entre las zonas de anidación de *Lepidochelys olivacea* en el Pacífico mexicano; las barras representan la desviación estándar de cada valor.

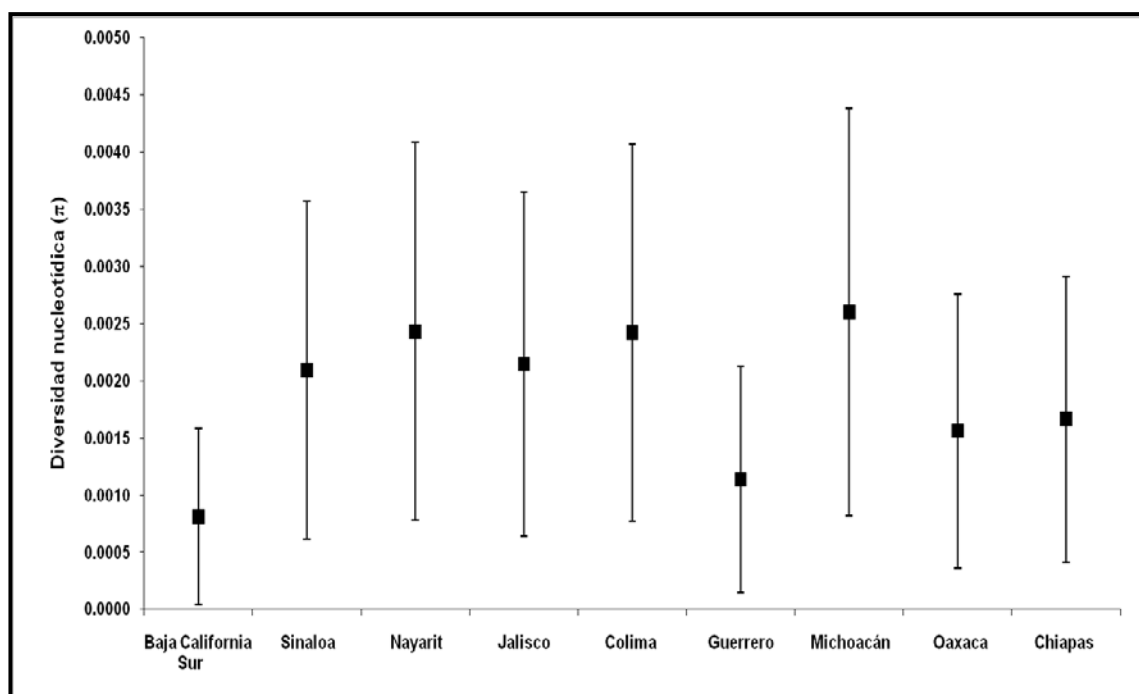


Figura 10. Comparación de la diversidad nucleotídica entre las zonas de anidación de *Lepidochelys olivacea* en el Pacífico mexicano; las barras representan la desviación estándar de cada valor.

III.5 Estructura genética

El análisis de varianza molecular, considerando como distancia genética la matriz de distancias basada en el modelo evolutivo que mejor se ajustó a nuestros datos (K81uf+I), produjo un valor global de Φ_{ST} de 0.017 ($p=0.036$). Esto indica que existen diferencias pequeñas pero significativas entre las distintas colonias anidantes de tortuga golfina en el Pacífico mexicano; aunque sólo el 1.73 % de la varianza ocurrió entre colonias (Tabla VI).

Tabla VI. Resultados del análisis de varianza molecular considerando a todas las colonias anidantes dentro de un mismo grupo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	8	0.008	0.00001	1.73
Dentro de poblaciones	237	0.154	0.00065	98.27
Total	245	0.162	0.00066	
Índice de fijación $\Phi_{ST} = 0.017$ ($p=0.036$)				

El análisis global de Φ_{ST} no permite determinar qué colonias anidantes se encuentran diferenciadas, por lo que se realizó un análisis de diferenciación por pares de colonias. Algunos valores pareados de Φ_{ST} mostraron diferencias significativas entre colonias anidantes de *L. olivacea* en el Pacífico mexicano en las pruebas individuales ($p<0.05$, Tabla VII).

Dichas comparaciones mostraban un porcentaje de varianza molecular entre 3.7 y 9.3% entre las localidades comparadas (Tabla VII). Sin embargo, después de la corrección de Bonferroni (Rice, 1989) esas comparaciones no fueron significativas para el conjunto de las 36 comparaciones (Tabla VII).

Tabla VII. Valores de Φ_{ST} pareados (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal).

Zona de anidación	BCS	Sinaloa	Nayarit	Jalisco	Colima	Michoacán	Guerrero	Oaxaca	Chiapas
BCS		0.16	0.03^{Ns}	0.24	0.33	0.03^{Ns}	0.61	0.35	0.30
Sinaloa	0.014		0.04^{Ns}	0.80	0.75	0.23	0.50	0.42	0.17
Nayarit	0.044	0.036		0.04^{Ns}	0.12	0.03^{Ns}	0.06	0.09	0.06
Jalisco	0.015	-0.016	0.037		0.64	0.15	0.31	0.63	0.02^{Ns}
Colima	0.004	-0.018	0.022	-0.012		0.52	0.35	0.72	0.36
Michoacán	0.093	0.017	0.065	0.025	-0.014		0.05	0.16	0.02^{Ns}
Guerrero	-0.007	-0.004	0.043	0.004	0.005	0.077		0.36	0.30
Oaxaca	0.001	-0.005	0.030	-0.011	-0.016	0.028	0.001		0.005^{Ns}
Chiapas	0.005	0.014	0.026	0.041	0.007	0.070	0.006	0.038	

Ns: no significativo después de la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

Para evaluar el nivel de diferenciación genética entre las colonias peninsulares y las continentales, se agruparon las frecuencias haplotípicas desde Sinaloa hasta Chiapas (continente) y se compararon con las frecuencias haplotípicas de Baja California Sur (península). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($\Phi_{ST} = 0.0013$; $p=0.34$), es decir, no existen diferencias genéticas entre las colonias anidantes peninsulares y las continentales (Tabla VIII).

Tabla VIII. Resultados del análisis de varianza molecular considerando a la colonia anidante de Baja California Sur dentro de un grupo y al resto de las colonias dentro otro grupo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	1	0.661	0.00081	0.13
Dentro de poblaciones	244	150.880	0.61836	99.87
Total	245	151.541	0.61917	
Índice de fijación $\Phi_{ST} = 0.0013$ ($p=0.34$)				

III.6 Flujo genético entre colonias anidantes

Las estimaciones de Nm obtenidas a partir de los Φ_{ST} entre colonias anidantes de *L. olivacea* del Pacífico mexicano reflejaron altos niveles de flujo genético entre ellas. El valor más bajo de flujo genético fue entre Baja California Sur y Michoacán ($Nm=5$); también se observaron bajos valores entre Michoacán y Guerrero, Nayarit y Chiapas ($Nm=6$, $Nm=7$, $Nm=7$, respectivamente, Tabla IX). Dichos valores se asocian con los Φ_{ST} mayores que fueron significativos individualmente antes de la corrección de Bonferroni (Tabla VII).

El valor máximo de flujo genético fue infinito e indica homogeneidad genética y panmixia entre estas colonias (cero diferenciación genética); la colonia de Sinaloa es la que presenta mayor flujo genético con las otras colonias anidantes (Tabla IX).

Se presentaron valores de cientos de migrantes por generación entre la colonia de Colima con las de Guerrero ($Nm=104$) y Baja California Sur ($Nm=114$); la de Jalisco con la de Guerrero ($Nm=118$) y entre la colonia de Oaxaca con las de Baja California Sur y Guerrero ($Nm=370$, $Nm=340$, respectivamente, Tabla IX).

Tabla IX. Valores de flujo genético (Nm) mitocondrial entre las diferentes colonias anidantes de *Lepidochelys olivacea* en el Pacífico mexicano, derivados de los valores de Φ_{ST} .

Zona de anidación	BCS	Sinaloa	Nayarit	Jalisco	Colima	Michoacán	Guerrero	Oaxaca	Chiapas
BCS									
Sinaloa	35								
Nayarit	11	14							
Jalisco	32	∞	13						
Colima	114	∞	22	∞					
Michoacán	5	29	7	19	∞				
Guerrero	∞	∞	11	118	104	6			
Oaxaca	370	∞	16	∞	∞	17	340		
Chiapas	97	34	19	12	76	7	89	13	

∞ = Flujo genético infinito. En negritas se muestran los valores de flujo genético que corresponden a los Φ_{ST} pareados que fueron significativos antes de la corrección de Bonferroni.

III.7 Relaciones filogenéticas entre haplotipos

El árbol filogenético Neighbor Joining reflejó una baja divergencia entre los haplotipos y una topología muy compleja. Aunque no fue posible identificar un patrón filogeográfico claro en la distribución y agrupamiento de los haplotipos, se puede observar la presencia de varios grupos pequeños (clados; Figura 11).

El grupo basal alberga los haplotipos más ancestrales de las colonias anidantes de Sinaloa, Nayarit, Colima Michoacán y Chiapas; no obstante, este clado estuvo pobremente representado. El clado D se conforma por un haplotipo y aunque está muy diferenciado del clado C, sólo se observó en las colonias de Baja California Sur, Nayarit, Oaxaca y Chiapas. El clado C, contiene a la mayoría de los haplotipos de las colonias de Nayarit, Guerrero y Chiapas.

En el “clado B”, están presentes la mayoría de los haplotipos de las colonias de Jalisco, Colima, Michoacán y Oaxaca; se puede observar que en este clado existe un nivel de divergencia muy bajo entre haplotipos. Esto podría obedecer al hecho de que estos haplotipos sólo difieren entre ellos por cambios en uno o dos pares de bases.

Tanto en la colonia de Baja California Sur como la de Chiapas, la mayoría de haplotipos se encuentran distribuidos en los clados C y B.

El clado A, representa a los haplotipos más derivados e incluye a la mayoría de los haplotipos de Sinaloa. Cabe destacar que en este clado el haplotipo privado Lo29 de Sinaloa es sumamente divergente con respecto a sus haplotipos hermanos.

La presencia de muy pocas ramas con valores de bootstrap no-paramétrico superiores a 50% refleja la pobre señal filogenética de estas secuencias y lo endeble de la topología obtenida. Dicha cohesividad molecular producto de la baja tasa evolutiva del genoma mitocondrial de las tortugas, también se vio claramente reflejada en las bajas diversidades nucleotídicas (Tabla VI).

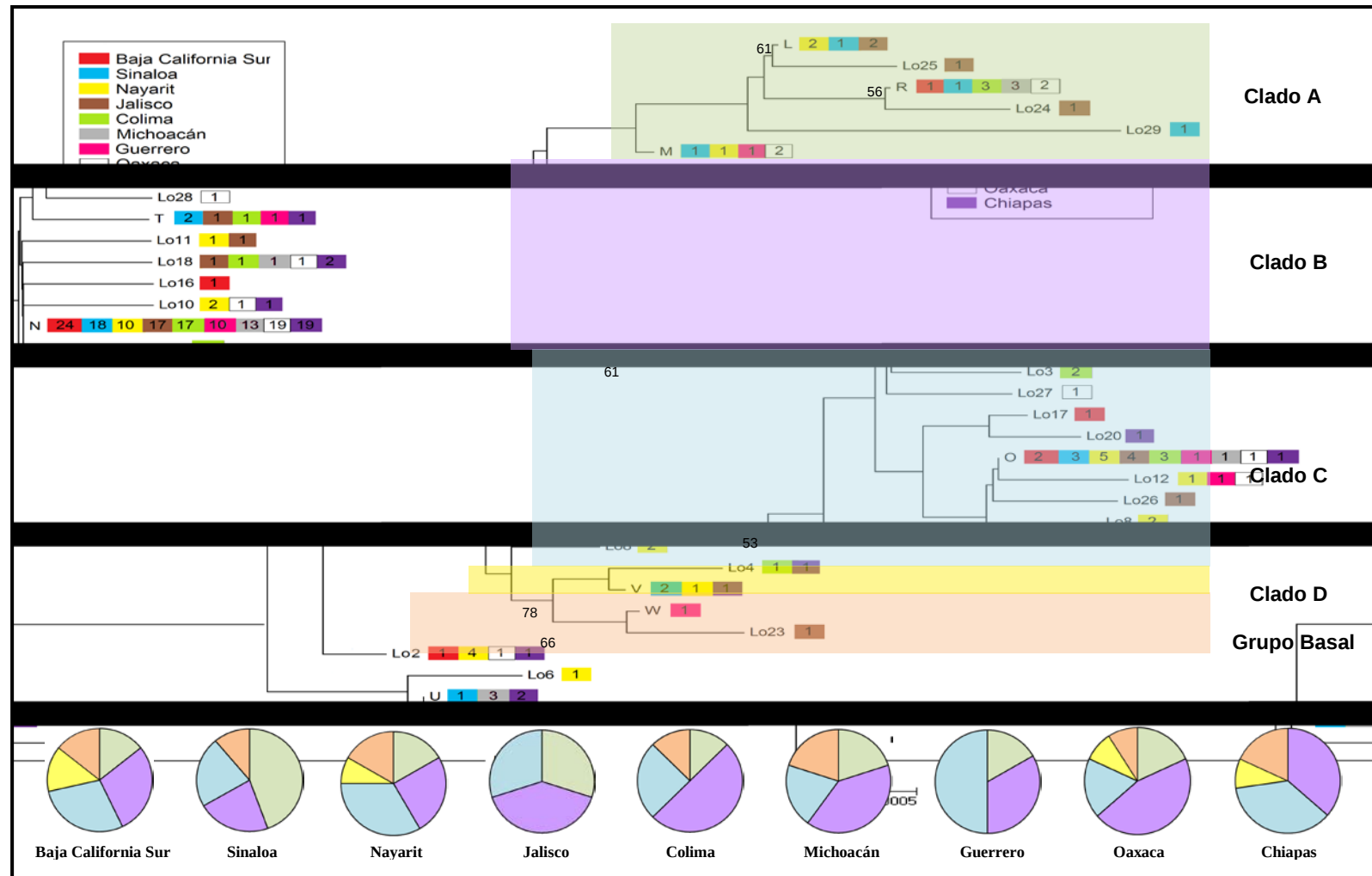


Figura 11. Árbol filogenético Neighbor-Joining de los haplotipos de *Lepidochelys olivacea* en el Pacífico mexicano; a la derecha de los haplotipos se muestran rectángulos de colores que corresponden a las regiones en las que se han encontrado (la frecuencia de los individuos corresponde al número dentro de cada rectángulo); los números a la izquierda representan el valor de bootstrap no paramétrico de cada nodo (sólo se muestran valores superiores a 50); las gráficas circulares representan para cada localidad el porcentaje de haplotipos de cada clado.

III.8 Demografía histórica

La baja divergencia inter-haplotípica también se manifestó en la distribución de diferencias inter-haplotípicas de las secuencias de los haplotipos de tortuga golfina, las cuales muestran que el número de diferencias pareadas entre haplotipos fue bajo. La colonia de Guerrero presentó el menor número máximo de diferencias pareadas (4), mientras que el valor mayor fue para las colonias de Sinaloa y Jalisco (8 en ambos casos).

La mayoría de las colonias anidantes presentaron una distribución unimodal, principalmente en el valor de cero diferencias, reflejando la predominancia del haplotipo N. Aunque en las colonias de Colima y Michoacán parece existir una distribución multimodal consistente con una población en equilibrio demográfico estable (Figura 13; Harpending, 1994), la prueba de bondad de ajuste (H_0 : existe un evento de expansión demográfica en las colonias) y la falta de significancia de la misma ($p > 0.05$) indica que todas las colonias, con excepción de Oaxaca, se ajustan al modelo de expansión repentina (Tabla X).

Los parámetros θ_0 y θ_1 del modelo sugieren que la mayoría de las colonias anidantes han experimentado un incremento en el tamaño poblacional, especialmente en Nayarit, donde se observó un incremento considerable. Para la colonia de Baja California Sur este incremento ha sido en menor magnitud que en las otras colonias (Tabla X).

Tabla X. Análisis de la demografía histórica de las colonias de *Lepidochelys olivacea* en el Pacífico mexicano: los parámetros del modelo de expansión repentina de Rogers y su prueba de bondad de ajuste.

Colonias anidantes									
	BCS	Sinaloa	Nayarit	Jalisco	Colima	Guerrero	Michoacán	Oaxaca	Chiapas
Parámetros									
H	6	9	11	10	8	6	5	10	10
τ	3.000	1.035	1.666	1.094	3.596	1.482	3.342	0.471	1.816
θ_0	0.000	0.854	0.000	0.830	0.002	0.004	0.000	0.000	0.000
θ_1	0.563	2.212	99999.000	2.771	2.077	1.156	2.629	99999.000	1.883
Prueba de bondad de ajuste									
$S.D.D$	0.00659	0.00148	0.00653	0.00103	0.03236	0.00452	0.02454	0.06640	0.00199
p	0.51600	0.92100	0.31900	0.94300	0.36500	0.75800	0.47500	0.02300	0.90200

H es el número de haplotipos, $\tau = 2\mu t$, donde μ es la tasa de mutación específica del fragmento, t es el tiempo en generaciones desde la expansión, $\theta_0 = 2\mu N_0$ antes de la expansión, $\theta_1 = 2\mu N_1$ después de la expansión, μ es como arriba y N es el tamaño efectivo de la población. S.D.D. es la suma de las desviaciones cuadradas, p es la significancia.

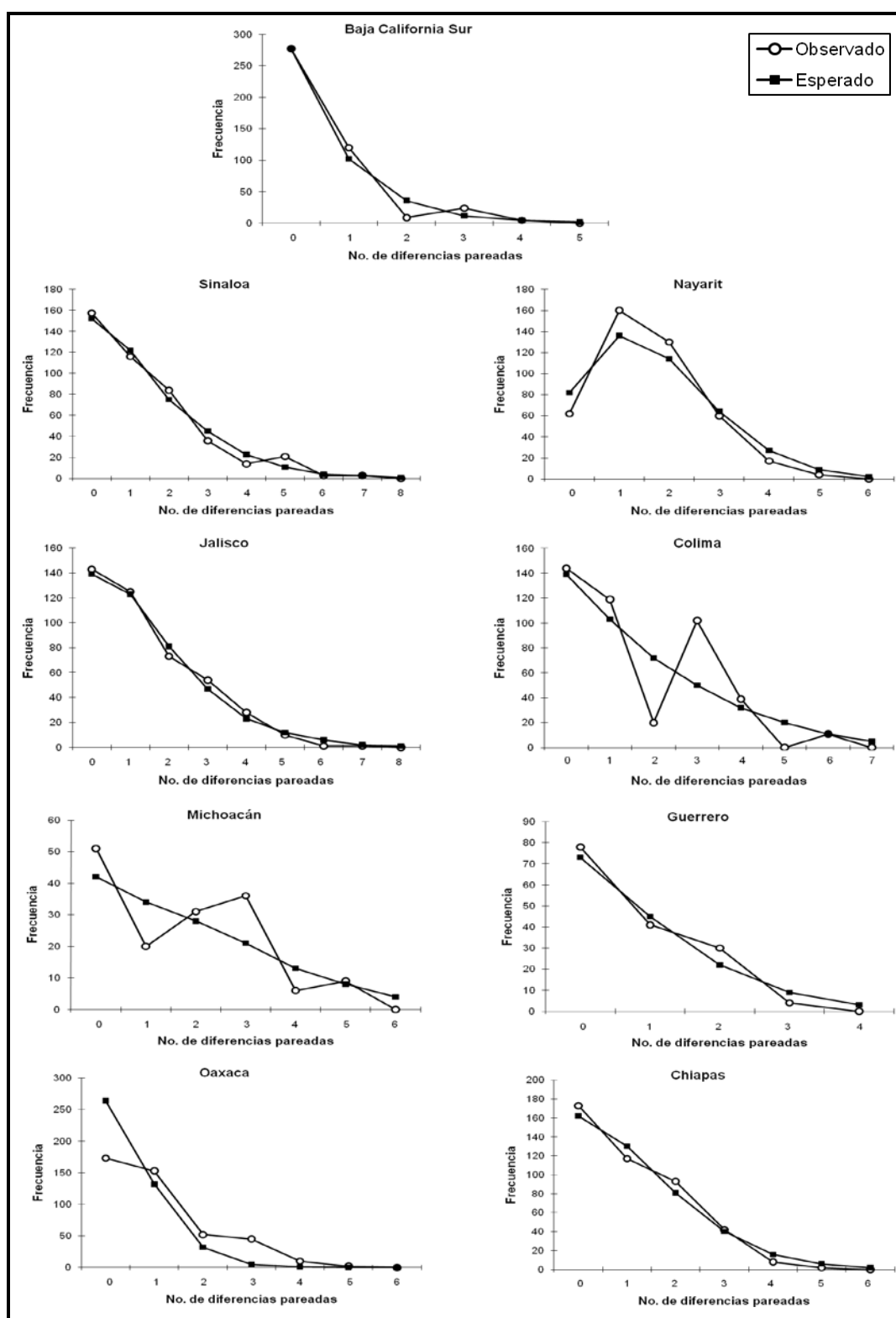


Figura 12. Distribución de diferencias inter-haplotípicas con base en las secuencias de los haplotipos de la región control del ADN mitocondrial de *Lepidochelys olivacea* en el Pacífico mexicano.

IV. Discusión

IV.1 Diversidad genética

La diversidad genética de la región control mitocondrial de *L. olivacea* es baja encontrada a lo largo del Pacífico mexicano, lo que generalmente se ha observado en tortugas marinas, dulceacuícolas y terrestres (orden Testudina, Tabla XI; Avise, *et al.*, 1992). Los niveles bajos de diversidad genética se relacionan con la baja tasa evolutiva del ADN mitocondrial en Testudinos, a diferencia de otros grupos de vertebrados. Se han reportado altos valores de diversidad genética de la región control en la Pardela Balear (*Puffinus mauretanicus*, $h=0.94$ y $\pi=0.03$) y en Ballena Jorobada (*Megaptera novaeangliae*, $h=0.90$ y $\pi=0.01$) (Juste *et al.*, 2006; Falconi y Caballero, 2007).

Tabla XI. Comparación de la diversidad genética de la región control del ADN mitocondrial de diferentes especies de tortuga marina; n= tamaño de muestra, H= número de haplotipos, h= diversidad haplotípica y π = diversidad nucleotídica.

Especie	Región	n	H	h	π	Fuente
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Pacífico mexicano	246	29	0.62	0.0019	Este estudio
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Gran Caribe	103	21	0.50	0.006	Bass <i>et al.</i> (1996)
<i>Chelonia mydas</i>	Océano Índico	288	7	0.42	0.0219	Bourjea <i>et al.</i> (2007)
<i>Caretta caretta</i>	Atlántico	249	10	0.67	0.0230	Encalda <i>et al.</i> (1998)
<i>Dermochelys coriacea</i>	Mundial	175	11	0.66	0.0015	Dutton <i>et al.</i> (1999)

Esta baja tasa evolutiva puede estar relacionada con el largo periodo generacional en la mayoría de los Testudinos (Avise *et al.*, 1992). Por ejemplo, en tortugas marinas la edad de primera madurez ocurre aproximadamente entre los 13 y 50 años, que está entre las más tardías conocidas entre los vertebrados. En organismos de tiempo generacional corto, hay más replicaciones de ADN en la línea germinal (material genético transmitido a la siguiente generación) por año, y por consiguiente más oportunidades para mutaciones. Otra correlación puede existir con la baja tasa metabólica de los Testudinos. Martín y Palumbi

(1993) descubrieron que existe una fuerte correlación positiva entre la tasa metabólica y la tasa de sustitución del ADN nuclear y mitocondrial en los vertebrados estudiados. Observaron que los tiburones que poseen tasa evolutiva similar a las tortugas y un metabolismo bajo, muestran una disminución de 5 a 10 veces más en la tasa evolutiva del ADN mitocondrial que la observada en primates y que la mayor tasa evolutiva del ADN mitocondrial en mamíferos se relaciona con su mayor tasa metabólica.

La diversidad haplotípica de *L. olivacea* de este trabajo es similar a la reportada para otras colonias anidantes del Pacífico Oriental (Briseño-Dueñas, 1998; López-Castro y Rocha-Olivares, 2005). Por otro lado, en comparación con el stock de la costa este de la India, la diversidad haplotípica de las tortugas golfinas del Pacífico es consistentemente mayor, mientras que el valor de π es menor; siendo el de este trabajo el valor más pequeño reportado hasta ahora para el Pacífico Oriental (Tabla XII). Salta a la vista la diferencia entre el tamaño de muestra y el número de haplotipos entre este estudio con lo reportado por otros autores.

Tabla XII. Comparación de la diversidad genética de la región control del ADN mitocondrial de *Lepidochelys olivacea* en diferentes zonas de anidación alrededor del mundo; n= tamaño de muestra, H= número de haplotipos, h= diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica y pb= pares de bases.

Zona de anidación	n	H	h	π	pb	Fuente
Pacífico mexicano	246	29	0.62	0.0019	653	Este estudio
Pacífico Oriental*	137	11	0.53	0.0021	488	López-Castro y Rocha-Olivares (2005)
Pacífico Oriental**	101	14	0.60	0.0026	488	Briseño-Dueñas (1998)
Costa este de la India	81	8	0.27	0.0030	399	Shanker <i>et al.</i> , (2004)

* Se incluyó a Baja California Sur

** No se incluyó a Baja California Sur

El mayor tamaño de muestra y del fragmento de ADN de este estudio permitió incrementar la probabilidad de registrar un mayor número de haplotipos (29) que en los otros dos estudios (11 y 14; Tabla XII). Briseño-Dueñas (1998) reportó un total de 11 haplotipos, derivados del análisis de 488 pb de la región control del ADN mitocondrial para el stock del Pacífico Oriental. Shanker *et al.* (2004) encontraron ocho haplotipos en 399 pb de la región control del ADN mitocondrial para el stock de la India.

Con un mayor número de haplotipos se esperaría que la diversidad haplotípica fuera mayor; sin embargo, dicha diversidad no difirió mucho de lo reportado con menor número de haplotipos. De los 29 haplotipos registrados en este estudio, 15 son haplotipos privados (52%). A pesar del alto porcentaje de haplotipos privados que se registró, su frecuencia no superó el 1% dentro de cada zona de anidación en la que se presentaron y su contribución a la diversidad haplotípica no es la que se esperaría con mayores frecuencias.

A pesar del alto número de haplotipos, uno solo (N) fue ubicuo y preponderante en todas las zonas de anidación, además de ser el más abundante (33-80%), lo que concuerda con lo reportado anteriormente para la especie en el Pacífico Oriental (Briseño-Dueñas, 1998; López-Castro y Rocha-Olivares, 2005). La predominancia de un haplotipo es una característica genética de ambos stocks de *L. olivacea*. En el stock de la India esta tendencia se encuentra mucho más acentuada; para una colonia de *L. olivacea* en Sri Lanka ($h=0.72$), en la que se observaron cuatro haplotipos, uno de ellos abarcaba el 47% de la frecuencia total (Bowen *et al.* 1998); Shanker *et al.* (2004) encontraron ocho haplotipos distintos; sin embargo, la diversidad haplotípica fue baja ($h=0.27$), ya que un haplotipo constituía el 85.2% de la frecuencia total.

En cuanto a la diversidad nucleotídica, los valores bajos reflejan una divergencia somera entre los haplotipos. La mayor parte de los haplotipos encontrados en este estudio difieren entre sí en sólo dos o tres pares de bases, lo que posiblemente refleje su origen reciente. Esto implicaría que no ha transcurrido tiempo suficiente para que se acumulen más mutaciones en la región control del ADN mitocondrial, que puedan incrementar la diversidad nucleotídica y producir una mayor divergencia entre estos haplotipos. También han sido observados niveles bajos de diversidad nucleotídica por López-Castro y Rocha-Olivares (2005) para la colonia anidante de Baja California Sur ($\pi= 0.00059$) y por Bowen *et al.*, (1998) para la colonia de Surinam ($\pi= 0.0005$). Ambos estudios atribuyen esta baja diversidad nucleotídica a la colonización reciente de esta especie en ambas zonas.

En el caso particular de los altos valores de diversidad nucleotídica de la costa este de la India y los bajos de la haplotípica (Shanker *et al.*, 2004), la explicación puede deberse a que aunque son pocos haplotipos, algunos de ellos difieren por más de 11 pares de bases; es decir, existe mucha divergencia entre estos haplotipos.

De manera general, se observa un patrón en los niveles de diversidad haplotípica en el Pacífico mexicano. El valor más alto se presenta en Nayarit, los valores medios se encuentran en las zonas de Sinaloa, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas y el más bajo se observó en Baja California Sur. Sin embargo, este patrón no se observa en los estudios de ADN nuclear para esta especie, tales diferencias pueden ser resultado de las diferentes tasas evolutivas de ambos marcadores. Tanto López-Chávez (2000) como Rodríguez-Zárate (2008) reportan altos niveles de heterocigosidad para *L. olivacea* en el Pacífico mexicano; concluyen que estos valores no reflejan pérdida de variabilidad genética. Sin embargo, estos altos valores pueden ser producto del alto polimorfismo que pueden presentar los microsatélites, la especificidad de los mismos y la inclusión de nuevas localidades.

En un principio se mencionó que el efecto de la deriva genética es diferente dependiendo del tipo de comportamiento de anidación de la especie. En playas de anidación solitaria se espera un mayor efecto puesto que el tamaño de la población efectiva es menor, y se verá reflejado en bajos niveles de diversidad genética. Por otra parte, las playas de anidación masiva con mayor tamaño efectivo, no se verían tan afectadas por la deriva y se esperaría mayor diversidad en comparación con las playas de anidación solitaria.

En este estudio no se encontraron diferencias significativas en la diversidad genética entre ninguna de las playas de anidación solitaria con la de anidación masiva ($p > 0.05$ para todas las comparaciones; *t-Student*), salvo en el caso de Nayarit ($h = 0.8529$, $\pi = 0.00243$), cuya diversidad haplotípica fue significativamente mayor a la del resto de las zonas de anidación incluyendo Oaxaca ($p < 0.05$; *t-Student*). En el caso de la diversidad haplotípica, Baja California Sur fue significativamente menor a las demás colonias con excepción de Guerrero, Oaxaca y Chiapas ($p < 0.05$; *t-Student*). Esto es consistente con el trabajo de López-Castro y Rocha-Olivares (2005). Los autores atribuyen esta baja diversidad a diferentes factores como una fuerte deriva genética asociada con un efecto fundador y una reciente colonización de la península o un cuello de botella producido por la sobrepesca y la caza furtiva.

Si bien Oaxaca es el único estado en el Pacífico mexicano en el que *L. olivacea* anida en forma masiva, también es cierto que es uno de los estados donde se ha observado una

mayor explotación comercial y captura incidental de la especie. A finales de la década de los años setenta se habían extraído más de 100 000 tortugas por año, antes del cierre de la industria en 1981 (Frazier y Salas, 1982). Los impactos de tales tasas de extracción se reflejaron rápidamente en los stocks mexicanos: de las cuatro principales playas de anidación masiva (Playón de Mismaloya, Piedra de Tlacoyunte, San Juan Chacahua y La Escobilla), tres se colapsaron a mediados de los setenta (Peñaflores-Salazar *et al.*, 2001). Únicamente La Escobilla sobrevivió como playa de anidación masiva; sin embargo nunca recuperó sus abundancias históricas. Aunque en 1990 se implementó la veda total para la captura de tortugas marinas en México, actualmente La Escobilla es una de las playas donde se registra una alta incidencia de pesca furtiva (Albavera-Padilla, 2007). Aunque se esperaría que el tamaño efectivo poblacional en playas de anidación masiva fuera mayor que el de las solitarias, existen ciertas desventajas que presenta este tipo de anidamiento. Éstas pueden ser una alta tasa de mortalidad densodependiente, atraer y mantener a los depredadores. Además puede existir un riesgo de pérdida catastrófica debido a la inversión reproductiva en un solo sitio, que si bien no merma el tamaño poblacional tampoco permite un mayor crecimiento (Bernando y Plotkin, 2007). Esto tendría efecto en el tamaño efectivo de la población y por consiguiente en los niveles de diversidad genética. El estudio de Briseño-Dueñas (1998) también reportó bajos niveles de diversidad haplotípica para Oaxaca ($h= 0.61$), en comparación con otras playas de anidación solitaria como Sinaloa ($h= 0.62$) y Jalisco ($h= 0.68$).

La alta diversidad haplotípica de Nayarit probablemente se relacione con la tendencia poblacional en aumento que exhiben la mayoría de las zonas de anidación de *L. olivacea* a lo largo de la costa del Pacífico mexicano (INP, 2000), lo que puede verse reflejado en altos niveles de diversidad genética. En el caso particular de Nayarit, hasta el 2002 se tenía un registro de aproximadamente 2000 nidos por temporada reproductiva. Para el 2006 los nidos registrados eran alrededor de 4000, es decir, las anidaciones se duplicaron en sólo cuatro años (Maldonado-Gasca, 2007). Si bien las otras colonias de anidación solitaria también han experimentado un crecimiento poblacional, éste no ha sido tan grande como en la colonia de Nayarit. A nivel regional, en la zona de la boca del Golfo de California y en las costas del Pacífico Central se registraron un total de 26 campamentos tortugueros. En

Sinaloa se registraron cinco campamentos, siete en Nayarit, en Jalisco diez y cuatro más en Colima, siendo Nuevo Vallarta, Nay. y el Playón de Mismaloya, Jal., los que presentaron mayor densidad de anidación (Figura 13).

De 1990 a 2005, los campamentos tortugueros de Nayarit y áreas aledañas, han mostrado un aumento en el número de anidaciones de la tortuga golfina, con un decremento notable en 2002 por efecto del Huracán Kena (Figura 14). Trejo *et al.* (2007) mencionan que el acoso antropogénico que sufren los organismos en sus zonas de anidación originales puede ocasionar que éstos lleguen a lugares alternos y se refleje en un incremento poblacional.

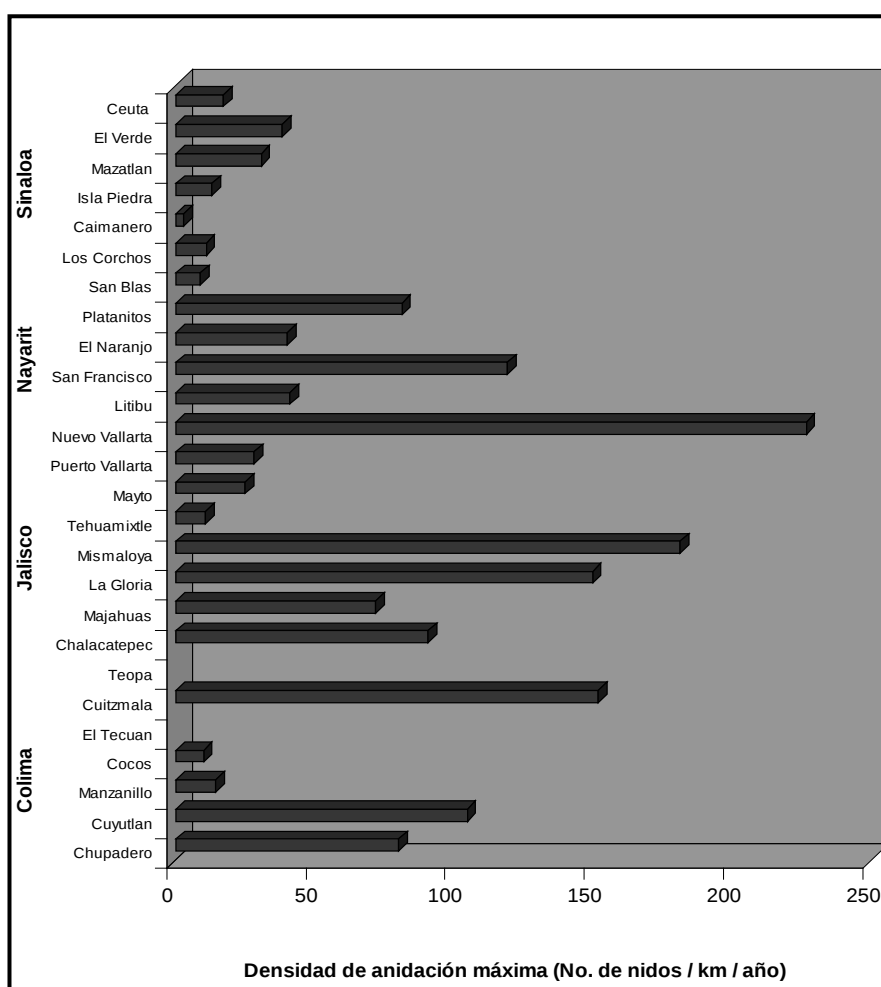


Figura 13. Densidad de anidación máxima registrada en los campamentos tortugueros de la región del Pacífico Mexicano Central (tomado de Madonado-Gasca, 2007).

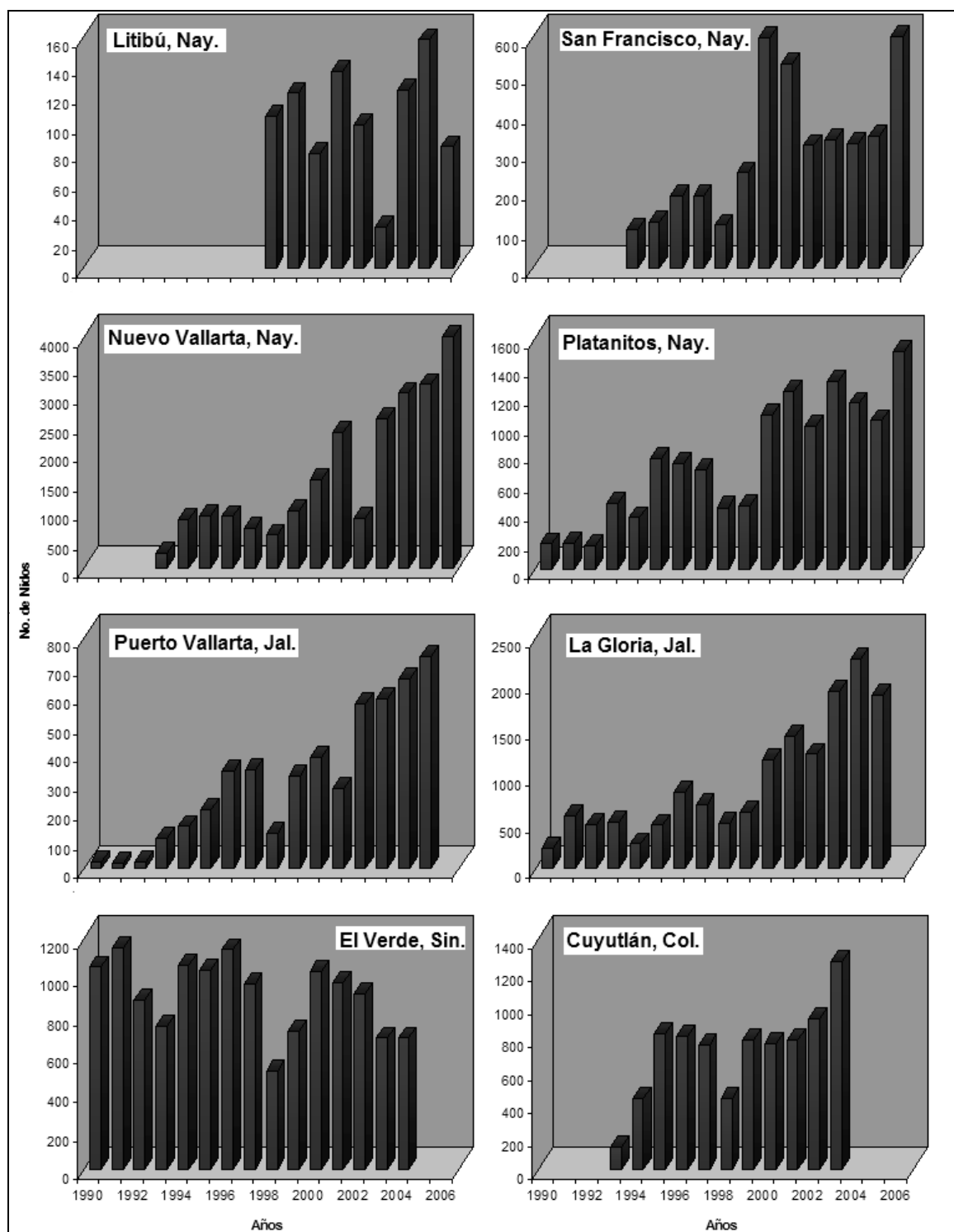


Figura 14. Número de nidos de tortuga golfina registrados de 1990 a 2006 en algunas playas de la región del Pacífico Mexicano central (tomado de Madonado-Gasca, 2007).

IV.2 Estructura y flujo genético

Las colonias anidantes de *L. olivacea* muestran una estructura poblacional marcada a escala mundial (Bowen *et al.*, 1998; Shanker *et al.*, 2004), lo que también se ha observado para otras especies de tortuga marina. Pero en una escala regional los niveles de estructura genética han resultado pequeños (López-Castro y Rocha-Olivares, 2005; Rodríguez-Zárate, 2008; este estudio) o nulos (Briseño-Dueñas, 1998; López-Chávez, 2000; Aggarwal *et al.*, 2003; Shanker *et al.*, 2004; Tabla XIII).

Tabla XIII. Estimadores de estructura poblacional y flujo genético en diferentes especies de tortugas marinas (Tomado y modificado de Rodríguez-Zárate, 2008); ADNmt= mitocondrial, ADNn= nuclear.

Especie	Zona geográfica	Nivel de diferenciación	Flujo genético (Nm)	Marcador	Fuente
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Global	$\Phi_{ST}=0.586^*$	0.2 - 4.5	ADNmt	Bowen <i>et al.</i> , 1998
<i>L. olivacea</i>	Índico	$\Phi_{ST}= -0.01 - 0.04$	2 - 36	ADNmt	Shanker <i>et al.</i> , 2004
<i>L. olivacea</i>	Pacífico Oriental	$\Phi_{ST}= 0.036$	7 - >50	ADNmt	Briseño-Dueñas, 1998
<i>L. olivacea</i>	Pacífico Oriental	$\Phi_{ST}= 0.03$	8 - ∞	ADNn	López-Chávez, 2000
<i>L. olivacea</i>	Pacífico Oriental	$\Phi_{ST}= 0.048^*$	3- ∞	ADNmt	López-Castro y Rocha-Olivares, 2005
<i>L. olivacea</i>	Pacífico mexicano	$R_{ST}= 0.00002$ $F_{ST}= 0.21^*$	6 - ∞	ADNn	Rodríguez-Zárate, 2008
<i>L. olivacea</i>	Pacífico mexicano	$\Phi_{ST}= 0.017^*$	5 - ∞	ADNmt	Este estudio
<i>Dermochelys coriacea</i>	Global	$F_{ST} = 0.415^*$	0 - >25	ADNmt	Dutton <i>et al.</i> , 1999
<i>Chelonia mydas</i>	Atlántico y Mediterráneo	$\Phi_{ST}= 0.33^*$	1-4	ADNmt	Encalada et al., 1996
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Caribe	$\Phi_{ST}= 0.63^*$	0 - 2.0	ADNmt	Bass <i>et al.</i> , 1996
<i>Caretta caretta</i>	Global	$\Phi_{ST}= 0.638^*$	0.02 - 2.5	ADNmt	Encalada et al., 1998

* $p<0.05$ (Φ significativamente diferente de cero).

En la costa este de la India, tanto los análisis de ADN mitocondrial como los de ADN nuclear corroboran la ausencia de estructura poblacional, es decir, que las colonias anidantes de tortuga golfina en esta región conforman una población panmíctica (Aggarwal

et al., 2003; Shanker *et al.*, 2004). Los alelos de loci microsatelitales, así como los haplotipos mitocondriales, se encontraron distribuidos al azar en las muestras, lo que sugiere que no existe diferenciación genética entre las poblaciones en la costa Oriental de la India. Este hallazgo es consistente con estudios de marcado y recaptura, que han demostrado que las hembras anidan en múltiples playas en Orissa (Pandav, 2001). Lo más notable es la diferenciación genética entre las colonias de la India y la colonia anidante de Sri Lanka. Las tortugas golfinas a lo largo de toda la costa Oriental de la India (~ 1500 km de Madras a Gahirmatha) comprenden una sola población, mientras que Sri Lanka se encuentra a sólo 500 km al sur de Madras.

En el Pacífico Oriental, los niveles de diferenciación genética parecen diferir dependiendo del marcador utilizado, la escala geográfica y la temporada de colecta de datos (Tabla XIII).

En este estudio, el análisis de estructura genética de *L. olivacea* a lo largo del Pacífico mexicano reflejó un nivel bajo pero significativo de estructura poblacional $\Phi_{ST}=0.017$, $p=0.036$, lo que concuerda con lo reportado por López-Castro y Rocha-Olivares (2005). Las comparaciones pareadas entre las zonas de anidación (Tabla VII), indican que existen diferencias significativas individualmente entre la colonia de Nayarit con las colonias de Baja California Sur, Sinaloa, Jalisco y Michoacán; y entre la de Chiapas con las de Jalisco y Oaxaca, siendo esta última la más significativa ($p=0.005$). No obstante, después de la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989), dichas diferencias no son significativas. Esta corrección somete a la prueba a un criterio de rechazo de la hipótesis nula más estricto, corrigiendo la creciente probabilidad de obtener resultados significativos a medida que se incrementa el número de pruebas/comparaciones (Rice, 1989). Lo anterior indica que los niveles de diferenciación entre pares de colonias son insuficientes para mantener la significancia después de aplicar una corrección tan conservativa como la secuencial de Bonferroni. Esto es congruente con el incipiente nivel de diferenciación ($\Phi_{ST}=0.017$) encontrado en la prueba global, cuyo poder estadístico es mayor que el de las pruebas pareadas y que sugiere que, si bien hay altos niveles de flujo genético entre las localidades, hay una desviación significativa del estado de panmixia. Sin embargo, puede ser otro factor

y no la corrección secuencial de Bonferroni el que esté influyendo en estos resultados aparentemente contradictorios.

Briseño-Dueñas (1998; ADN mitocondrial) y López-Chávez (2000; ADN nuclear) habían concluido que las colonias anidantes del Pacífico Oriental conformaban una sola población genéticamente homogénea. Sin embargo, López-Castro y Rocha-Olivares (2005) reportaron un nivel de estructura poblacional bajo pero significativo (ADN mitocondrial; $\Phi_{ST} = 0.048$, $p = 0.006$), a lo largo de los 3000 km del hábitat de anidación de *L. olivacea* entre Baja California Sur y Costa Rica. Lo relevante de este estudio radica en la inclusión de la colonia anidante de Baja California Sur en el análisis de estructura poblacional, y es precisamente esta colonia, la única que presentó diferenciación genética con dos de las colonias anidantes (Guerrero y Costa Rica). No obstante, ellos recomiendan que se tomen con cautela estos resultados, debido a que en su estudio se compararon dos temporadas de anidación diferentes y el tamaño de muestra no fue homogéneo para todas las zonas de anidación estudiadas.

El estudio de Rodríguez-Zárate (2008), basado en las mismas muestras de este trabajo y en el análisis de microsatélites, es el más reciente sobre genética poblacional de esta especie en el Pacífico mexicano. Además de incluir a Baja California Sur, posee la mayor cobertura en área geográfica de la distribución de la especie, un tamaño de muestra mucho mayor que el de los otros estudios y un muestreo sinóptico en todas las zonas de anidación durante la misma temporada reproductiva (Tabla XIII). Los resultados del estudio fueron contrastantes; se encontraron niveles de diferenciación significativos entre las colonias anidantes de *L. olivacea* a partir de las frecuencias alélicas microsatelitales ($F_{ST} = 0.21$, $p < 0.05$); mientras que al incorporar las distancias genéticas interalélicas, el índice ($R_{ST} < 0.001$, $p > 0.05$) obtenido disminuyó y no fue significativamente distinto de cero, indicando homogeneidad genética (Tabla XIII). Entre las colonias con diferenciación genética (después de la corrección de Bonferroni), se encuentra Baja California Sur.

Para evaluar el efecto de las localidades con mayor o menor diversidad genética en el nivel de diferenciación genética global, se excluyeron individualmente las colonias de Baja California Sur, Guerrero y Nayarit del análisis de varianza molecular (Tabla XIV).

Tabla XIV. Análisis de varianza molecular excluyendo algunas colonias anidantes; entre paréntesis se muestra la razón por la que se excluyó del análisis.

Localidades excluidas	Fuente de variación (%)		Valor de Φ_{ST}	Nivel de significancia
	Entre poblaciones	Dentro de poblaciones		
Baja California Sur (Baja diversidad genética)	1.62	98.38	0.016	p= 0.053
Guerrero (Baja diversidad genética y tamaño de muestra)	1.73	98.27	0.017	p= 0.040
Nayarit (Diferenciación significativa antes de Bonferroni)	1.03	98.97	0.010	p= 0.136
Nayarit y Baja California Sur	0.82	99.18	0.008	p= 0.194

Estos resultados corroboran el que la inclusión de las colonias de Baja California Sur y Nayarit puede estar asociada a la existencia de estructura genética. Sin embargo, la colonia de Nayarit parece influir también. Rodríguez-Zárate (1998), mediante el índice de F_{ST} , también encontró diferencias significativas después de la corrección de Bonferroni entre la colonia de Nayarit y las de Jalisco y Oaxaca.

La filopatría natal es el paradigma dominante para las migraciones de tortugas marinas y podría ser la fuente principal de estructura poblacional y aislamiento reproductivo; aunque la filopatría involucra cierta especificidad geográfica, al parecer varía ampliamente. Las frecuencias haplotípicas en las colonias anidantes pueden variar geográficamente de manera significativa dependiendo de la especie: tortuga caguama (*Caretta caretta*) en una escala de 100 km (Bowen *et al.* 2005), las tortugas verdes (*Chelonia mydas*) en una escala de 500 km (Lee *et al.* 2007), en la tortuga golfina (*L. olivacea*) y en la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) la escala puede abarcar miles de kilómetros (Bowen *et al.*, 1998; Shanker *et al.*, 2004; Dutton *et al.* 2007).

Como en otras tortugas marinas, la estructura poblacional en *L. olivacea* se fundamenta principalmente en el comportamiento filopátrico. Sin embargo, a diferencia de

otras tortugas marinas *L.olivacea* parece distinguirse por ser oportunista (Plotkin *et al.*, 1996) y presentar una filopatría natal no tan estricta de acuerdo con datos de marcaje y recaptura. Las hembras podrían realizar exploraciones de nuevas áreas aptas para anidación y anidar en playas distintas en diferentes temporadas reproductivas. Estudios de marcaje y recaptura de la especie han revelado que el intercambio entre sitios de anidación alternativos puede ocurrir, y tener rangos de variación de 7 a 2500 km (Briseño-Dueñas 1998) e involucrar a más de un país (ej. México-Colombia, Costa Rica-Nicaragua).

Estos cambios entre sitios de anidación son probablemente esenciales para la prosperidad de las tortugas marinas. Sin embargo, una estricta filopatría natal (en una escala de millones de años), sería una estrategia poco adaptativa en el caso de que el hábitat de anidación cambie y se deteriore por distintos factores (ambientales o antropogénicos). El registro de marcaje y recaptura indica que hembras que han sido marcadas en Oaxaca han sido recapturadas en Jalisco, Michoacán, Guatemala, El Salvador y Colombia. También existen registros sobre hembras marcadas en Sinaloa que se han recapturado en Nayarit, Oaxaca y Chiapas. Estas observaciones corroboran los altos niveles de flujo genético encontrados en este estudio ($Nm \geq 20$) y los reportados en otros estudios para el Pacífico mexicano (Briseño-Dueñas 1998; López-Chávez 2000; López-Castro y Rocha-Olivares 2005; Rodríguez-Zárate 2008). Estimaciones de Nm mayores de 1-4, indican que el flujo genético es suficiente para mantener un reservorio genético relativamente homogéneo (Slatkin 1987). Generalmente, los valores pequeños de Nm se asocian a valores significativos de Φ_{ST} pareados; sin embargo, estas estimaciones deben considerarse con precaución, ya que cuando Φ_{ST} es cercano a cero no puede ser estimado con precisión el orden de magnitud de Nm (Templeton 1998). Por otra parte, no es posible distinguir eventos recientes de colonización de movimientos contemporáneos entre colonias anidantes (Bowen *et al.* 1998).

Al igual que en el estudio de Rodríguez-Zárate (2008), el intercambio genético entre colonias no responde a un patrón geográfico definido. Se encontraron valores similares de flujo genético tanto entre localidades separadas por pocos cientos de kilómetros, como en aquellas distanciadas por miles de kilómetros. Lo anterior refleja un intercambio de flujo

genético estocástico que puede estar asociado a requerimientos ambientales y biológicos propios de la especie poco conocidos (Rodríguez-Zárate 2008).

Probablemente la tortuga golfina siempre ha sido una especie con un comportamiento filopátrico laxo, a diferencia de otras especies de tortuga marina, como lo que sugieren los estudios de diferenciación genética en el Océano Índico (Aggarwal *et al.*, 2003; Shanker *et al.*, 2004), donde no existe diferenciación genética en el ADN mitocondrial ni en el ADN nuclear. La región del Océano Índico alberga la población más ancestral de *L. olivacea* a nivel mundial. Estudios de filogeografía de la especie señalan que esta población pudo haber servido como fuente para colonizar recientemente los Océanos Pacífico y Atlántico (Bowen *et al.*, 1998; Shanker *et al.*, 2004). En el caso del Océano Pacífico la colonización pudo haber ocurrido hace aproximadamente unos 300, 000 años (tomando como referencia el año 1950; Shanker *et al.*, 2004). Por un lado, es posible que no haya pasado tiempo suficiente para que las mutaciones acumuladas puedan ser detectadas. Y por el otro, que la filopatría natal laxa de la tortuga golfina en el Pacífico Oriental refleje un comportamiento heredado por las colonias anidantes de la India.

Si existe un intercambio genético considerable entre las colonias anidantes de *L. olivacea* en el Pacífico mexicano, ¿cómo es posible detectar niveles de diferenciación genética? La explotación comercial que sufrió la especie de los años sesenta a finales de los ochenta resultó en una gran reducción poblacional de las colonias anidantes en el Pacífico mexicano. Prueba de ello, es el declive total de algunas playas de anidación masiva y cuyas abundancias históricas jamás se recuperaron. En este sentido, la sobreexplotación pudo influir en la pérdida de diversidad genética. Aunque existiera evidencia de un intercambio genético constante entre las colonias anidantes de *L. olivacea* en el Pacífico mexicano, hay que tomar en cuenta que no todas las colonias tenían las mismas abundancias así como tampoco el mismo tamaño efectivo poblacional o nivel de explotación. Tal pudo ser el caso de Baja California Sur, que siendo el límite más norteño de la especie, pudo haber tenido un menor tamaño efectivo poblacional y por ende la deriva génica después de la sobreexplotación dejó más erosionada la diversidad genética. Esto pudo ocasionar que no se recuperaran tan rápido como las otras colonias, aún con un alto grado de flujo genético. López-Castro y Rocha-Olivares (2005) reportaron un total de cinco haplotipos para la

colonia de Baja California Sur como resultado del análisis de 48 individuos. Los haplotipos registrados en este estudio fueron el L, N, O, U y V. Tanto la diversidad haplotípica ($h=0.16$) como la nucleotídica ($\pi=0.0006$) fueron muy bajas como consecuencia de la dominancia del haplotipo N en el 91.6% de las muestras y la baja divergencia entre los cinco haplotipos. Cabe señalar que en este estudio no se registró ningún haplotipo privado.

En este estudio se encontraron un total de seis haplotipos para esta colonia a partir del análisis de 30 individuos. Al igual que en el estudio de López-Castro y Rocha-Olivares (2005), los haplotipos N y O estuvieron presentes. Sin embargo, se registró un nuevo haplotipo (Lo2) y dos haplotipos privados (Lo16 y Lo17), también se observó el haplotipo R que en el trabajo de López-Castro y Rocha-Olivares (2005) únicamente se encontró en la colonia anidante de Guerrero. Los niveles de diversidad genética ($h=0.36$, $\pi=0.0008$) también fueron bajos debido a la dominancia del haplotipo N (80%) y a la baja divergencia entre haplotipos.

La colonia anidante de Baja California Sur presenta los valores más bajos de diversidad genética en comparación con las otras colonias anidantes continentales tanto en este estudio como en el de López-Castro y Rocha-Olivares (2005). No obstante, se puede observar que la diversidad genética de *L. olivacea* en esta colonia ha tenido un incremento en los últimos seis años. No se desmiente el hecho de que Baja California Sur sea diferente a las otras colonias de *L. olivacea* en el Pacífico mexicano, y probablemente en el pasado lo fue más, pero de acuerdo a la biología de la especie, quizás esa diferenciación está desapareciendo, lo que puede verse reflejado en el bajo valor del Φ_{ST} global y su nivel de significancia.

A pesar de la gran cantidad de estudios genéticos sobre estructura poblacional en numerosos taxa que se han desarrollado en la última década, poco es lo que se puede generalizar al respecto. Existen muchos desacuerdos acerca de si las estimaciones de flujo genético son exactas, parciales o engañosas; si las poblaciones no se han aproximado a un equilibrio entre el flujo genético y la deriva, supuesto de los modelos utilizados para inferir el flujo genético, entonces la estructura poblacional debería ser interpretada en términos de historia (ej. efecto fundador, eventos de vicarianza, eventos de expansión) en lugar de flujo genético (Bohanak, 1999). Para cualquier estudio de genética poblacional, a menudo

existen datos insuficientes sobre el comportamiento, la ecología, la biogeografía y el uso de la especie como recurso humano que permitan la discriminación entre las hipótesis que consideran estos factores y sus interacciones.

IV.3 Filogeografía

Las siete especies de tortugas marinas han existido por millones de años y entre ellas, las especies del género *Lepidochelys* son las que más recientemente han divergido de su ancestro en común (Bowen y Karl 1996). Algunos linajes como los de las tortugas verdes (género *Chelonia*) pueden haber evolucionado independientemente por diez millones de años. Sin embargo, las separaciones observadas entre las poblaciones del Atlántico-Mediterráneo e IndoPacífico de *Chelonia mydas*, *Caretta caretta* y *L. olivacea* probablemente datan de unos pocos de miles a unos pocos de millones de años (Bowen y Karl 1996).

De acuerdo a estudios filogeográficos de *L. olivacea* (Bowen *et al.*, 1998, Shanker *et al.*, 2004), la distribución de esta especie en el Pacífico Oriental es de origen reciente. Probablemente la colonización ocurrió por individuos provenientes del Océano Índico, cuya población de tortugas golfinas parece ser la más antigua.

Los bajos valores de diversidad genética, así como el análisis filogenético de los distintos haplotipos de *L. olivacea* de este estudio reflejó una baja divergencia entre ellos. Esta baja divergencia puede observarse especialmente en los haplotipos agrupados en el “clado B” (Figura 11), donde parece existir la presencia de un grupo parafilético; la baja divergencia se refleja en una señal filogenética muy pobre que ocasiona árboles poco definidos. Esta baja divergencia puede atribuirse al origen reciente de esta especie en el Océano Pacífico y a que no haya transcurrido el tiempo necesario para acumular mutaciones que diferencien en mayor medida a unos haplotipos de otros. Por otra parte, la distribución de los haplotipos en las diferentes zonas de anidación no presenta un patrón filogeográfico claro, la distribución de los haplotipos parece ser estocástica independientemente de las colonias que los contienen. Esto coincide con los altos niveles

de flujo genético observados para la especie en este estudio, y puede corroborar la presencia de panmixia en las colonias anidantes de *L. olivacea* a lo largo del Pacífico mexicano.

Briseño-Dueñas (1998), no encontró evidencia suficiente para confirmar la existencia de filopatría en las colonias continentales ($\Phi_{st}=0.018$, $p>0.05$ y $Nm >50$). Por su parte, los resultados obtenidos por López-Castro y Rocha-Olivares (2005) ($\Phi_{st}=0.048$, $p<0.05$ y $Nm<16$) indican flujos genéticos menores, además de un nivel de diferenciación mayor entre todas las colonias que, aunados con las diferencias entre Baja California Sur con dos de las colonias continentales, sugieren la posibilidad de que sí exista filopatría de las hembras en Baja California Sur. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos resultados pueden estar influidos tanto por una señal temporal así como una geográfica. Es necesario validar dicha filopatría con otros métodos como el marcado y recaptura de hembras anidantes, así como comparaciones genéticas a largo plazo.

IV.4 Demografía histórica

Se observa un patrón muy similar en la distribución de diferencias inter-haplotípicas de todas las colonias anidantes de *L. olivacea* en el Pacífico mexicano. Esta similitud puede indicar que estas colonias exhiben una misma historia demográfica, propia de una población panmíctica. En la mayoría de las colonias se observa una distribución unimodal, con la moda en cero diferencias, lo que es consistente con el modelo de una reciente expansión demográfica (Rogers y Harpending, 1992). López-Castro y Rocha-Olivares (2005) también observaron la presencia de una moda en cero diferencias.

Cabe destacar que en la colonia de Nayarit se presenta una distribución unimodal en el valor de una diferencia, esto hace que la curva de frecuencias se encuentre desplazada hacia la derecha, lo que contrasta con las otras colonias en donde la primera moda se encuentra en cero diferencias. El mismo caso fue reportado por López-Castro y Rocha-Olivares (2005) para la colonia de Costa Rica; ellos argumentan que a partir de esta distribución puede inferirse que Costa Rica es la colonia más antigua y que probablemente

a partir de ésta se hayan originado, por dispersión, las demás colonias. Sin embargo, en este caso no podemos hacer tal conjetura, simplemente podemos decir que Nayarit podría ser la colonia más antigua del Pacífico mexicano. Por otra parte, esto también podría indicar la estabilidad de Nayarit en cuanto a tamaño poblacional (Rogers y Harpending, 1992).

El modelo de expansión repentina se ajustó para todas las colonias de tortuga golfina, a excepción de Oaxaca (Tabla XI). En 1990, después de casi tres décadas de explotación comercial, se estableció la veda total para la captura de tortugas marinas en nuestro país. Probablemente esta medida, aunada a la biología reproductiva de la especie, contribuyeron a la rápida recuperación de las colonias en el Pacífico mexicano. Las curvas con forma de “L” en la distribución de frecuencias (Figura 13), pueden reflejar el colapso que sufrieron estas colonias, ya que esta forma es característica de poblaciones que han pasado por cuellos de botella. Por otra parte, la predominancia del haplotipo N (68%) ocasiona que muchas comparaciones pareadas sean entre este haplotipo, de ahí que la moda se presente en cero diferencias. Para el caso de Oaxaca, Márquez et al., (2007) mencionan que esta colonia ha mostrado una recuperación sostenida a partir de que los esfuerzos de recuperación fueron iniciados, por lo que podemos suponer que ha permanecido más estable a diferencia de las otras colonias.

Los parámetros del modelo de expansión repentina (θ_0 y θ_1) indican que, pese a que se presenta un crecimiento poblacional en la colonia de Baja California Sur, éste ha sido en menor magnitud en comparación con los incrementos poblacionales de las colonias continentales y en especial con Nayarit, en donde el incremento poblacional ocurrió con mayor magnitud. López-Castro y Rocha-Olivares (2005) mencionan que el menor incremento en el crecimiento poblacional puede estar relacionado con un régimen selectivo más severo caracterizado por factores limitantes tales como la humedad. Donde sólo aquellos individuos con la habilidad de compensarlos tendrían éxito reproductivo y por tanto sus descendientes tendrán mayores probabilidades de reproducirse bajo condiciones similares. En contraste con las costas continentales del Pacífico mexicano, se encuentran las zonas reproductivas más importantes, la anidación en la península es menos gregaria, pocas hembras anidan en esta zona, lo que provoca que el número efectivo se mantenga pequeño.

IV.5 Implicaciones para el manejo y la Conservación

Muchas poblaciones de tortugas marinas se han visto gravemente afectadas por actividades antropogénicas como la sobrepesca comercial, la captura accidental, la destrucción de hábitats críticos de alimentación, anidación y reposo y la contaminación de los mares (Limpus 1995), por lo que la mayoría de sus poblaciones en todo el mundo se encuentran en declive, frecuentemente a niveles críticos (UICN, 1995).

Las herramientas genéticas más poderosas en el estudio de las tortugas marinas son aquellas que se orientan a identificar unidades reproductivas demográficamente independientes (poblaciones) que se encuentran en una o varias playas de anidación. Moritz (1999) llama a estas unidades reproductivas “Unidades de Manejo” (UM) y las considera sinónimos de los “stocks” pesqueros por su utilidad para propósitos de conservación y manejo. Las UM, serán entonces poblaciones cuyo nivel de diferenciación genética no es necesariamente alto pero que al comportarse como unidades reproductivas independientes van a acumular discontinuidades significativas en las frecuencias individuales de conjuntos de alelos compartidos. En muchos casos, la utilización de los marcadores genéticos para la identificación de las UM representa la única opción para estos propósitos y se ha constituido como un punto de apoyo para la toma de decisiones en programas de conservación y manejo, junto con otros elementos (p. ej. tasas de natalidad y mortalidad, sobrevivencia, etc.) dentro de los ámbitos políticos, económicos y sociales.

A pesar de los signos de recuperación de *L. olivacea* en el Pacífico Oriental, los factores antropogénicos que afectan la viabilidad de las colonias en las playas de anidación no han desaparecido totalmente. Entre los de mayor importancia tenemos a la caza furtiva y la comercialización ilegal de huevos, la destrucción de áreas de anidación y hábitats de alimentación, la captura incidental frente a las costas y a lo largo de sus rutas migratorias, la falta de vigilancia y aplicación de la ley.

Por otra parte, la idea de que las tortugas golfinas puedan constituir una población panmíctica (Briseño-Dueñas 1998, López-Chávez 2000) llevó a que todos los esfuerzos de conservación se concentraran en las colonias de mayor abundancia donde, evidentemente, una mayor proporción de rendimiento reproductivo y de la diversidad genética es protegido

(López-Castro y Rocha-Olivares 2005). Este enfoque ha sido aceptable, debido a la dificultad de proteger a todas y cada una de las colonias reproductivas de la especie, un problema compartido con la mayoría de los recursos marinos (Palumbi 2003). Los resultados de López-Castro y Rocha-Olivares (2005) indicaron claramente que Baja California Sur puede ser una colonia reproductivamente aislada, poniendo en duda la idea de la panmixia en las tortugas golfinas del Pacífico Oriental. La falta de reconocimiento de la individualidad de la colonia de Baja California Sur en el plan de manejo de las especies puede dar lugar, y muy probablemente ha conducido ya, a los efectos negativos sobre la colonia de anidación de Baja California Sur, su variabilidad genética y su éxito en el futuro (López-Castro y Rocha-Olivares 2005). Y aunque algunos resultados de este estudio pueden sugerir homogeneidad genética entre las colonias anidantes de *L. olivacea* a lo largo del Pacífico mexicano, las diferencias significativas encontradas en las frecuencias haplotípicas entre Baja California Sur y las colonias continentales son suficientes para clasificar a las tortugas golfinas de Baja California Sur como una unidad de manejo (Moritz 1994), por lo que la protección y conservación de la península en áreas de anidación debe ser una prioridad en México. Algunos de los resultados obtenidos por Rodríguez-Zárate (2008) muestran que las colonias de tortuga golfina en el Pacífico mexicano se comportan como una población panmíctica. Sin embargo, las diferencias encontradas entre pares de poblaciones sugieren que algunas colonias albergan diferencias genéticas que son reconocidas a partir del análisis del ADN nuclear, lo que permitiría distinguir a algunas colonias como unidades reproductivamente independientes. Conocer sobre las tendencias poblacionales de las diferentes colonias anidantes podría brindar información importante, desafortunadamente no existen datos para cada una de las localidades estudiadas. Con base en lo anterior, el presente trabajo recomienda mantener el principio precautorio de manejo de la especie basado en Unidades de Manejo independientes (UM) (Moritz, 1999).

A fin de identificar áreas clave para la conservación, es esencial realizar estudios continuos de las áreas de anidación durante la temporada reproductiva para obtener estimaciones más precisas de información básica, tales como la densidad de población, éxito reproductivo, las condiciones en que se produce la anidación, así como la

continuación de estudios genéticos (López-Castro y Rocha-Olivares 2005; Rodríguez-Zárate 2008). La conservación de las tortugas marinas es un tema complejo y plagado de conflictos e intereses y existe mucha incertidumbre con respecto a las numerosas facetas sociales, económicas y biológicas (López-Castro y Rocha-Olivares 2005). Si se espera que la conservación tenga éxito, se necesitan planes de manejo específicos que incluyan datos reales sobre las relaciones entre las poblaciones: moleculares, demográficos y de comportamiento; involucrando no sólo playas de anidación sino también a los hábitats de alimentación. En el caso de *L. olivacea*, son necesarios más estudios sobre su comportamiento migratorio y el comportamiento reproductivo de los machos.

V. Conclusiones

1. El análisis de estructura poblacional de *Lepidochelys olivacea* reflejó un incipiente nivel de diferenciación lo que puede reflejar la reciente colonización del Pacífico Oriental o estar asociado a factores evolutivos de la especie tales como su comportamiento filopátrico laxo que pudo haber heredado de las colonias anidantes de la India.
2. El flujo genético pareció estocástico y no correspondió a un patrón geográfico definido, lo que también se observó mediante el análisis de loci microsatelitales en estas mismas muestras. Los altos niveles de flujo genético pueden estar asociados con la filopatría laxa que exhibe la especie, comportamiento que se ha evidenciado a través de datos de marcaje y recaptura, y que también ha sido observado en el stock de la India.
3. La colonia de Nayarit fue la única playa de anidación solitaria que presentó diferencias significativas en la diversidad genética con Oaxaca (playa de anidación masiva). Los altos valores de diversidad encontrados para Nayarit pueden estar asociados al mayor crecimiento poblacional de esta colonia en los últimos años en comparación con las demás.
4. La colonia de Baja California Sur no presentó diferencias significativas con Oaxaca, sin embargo, exhibió los valores más bajos de diversidad genética de todas las colonias anidantes. Estos bajos valores de diversidad pueden atribuirse a diversos factores como: una fuerte deriva genética asociada con un efecto fundador, un cuello de botella producido por la sobrepesca o una selección producida por las condiciones ambientales extremas de la zona para la anidación.
5. Los niveles de diferenciación observados entre pares de colonias fueron insuficientes para mantener la significancia después de la corrección secuencial de

Bonferroni, sin embargo, el valor global de Φ_{ST} refleja la existencia de una desviación del estado de panmixia a pesar de los altos niveles de flujo genético observados. Por lo que este estudio recomienda mantener un principio precautorio de manejo de la especie basado en Unidades de Manejo independientes.

6. Para una mejor interpretación de la estructura poblacional de *Lepidochelys olivacea* en el Pacífico mexicano son necesarios más estudios que involucren las interacciones entre los hábitats específicos de anidación, reproducción y alimentación, así como el comportamiento filopátrico de los machos.

VI. Bibliografía

- Abreu-Grobois, F.A., A.L. Bass, R. Briseño-Dueñas, P.H. Dutton, S.E. Encalada y N.N. FitzSimmons, 1996. Mitochondrial DNA Dloop sequences of marine turtles. En: B.W. Bowen y W.N. Witzell (eds). Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics. NOAA, Informe Técnico NMFSSEFSC396 (National Technical Information Service, Springfield, VA), 147–162 p.
- Abreu-Grobois, F.A., R. Briseño-Dueñas y C. Barragán-Ochoa. 2000. Genética poblacional y filogeografía de las tortugas marinas golfina (*Lepidochelys olivacea*) y laúd (*Dermochelys coriacea*) en el Pacífico mexicano. Informe Final de Proyecto UNAM-CONABIO G007. 54 pp.
- Abreu-Grobois F.A., J. Horrocks, A. Formia, R. LeRoux, X. Velez-Zuazo, P. Dutton, L. Soares, P. Meylan y D. Browne. 2006. New mtDNA Dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution capacity of mixed stock analysis. En: M. Frick, A. Panagopoulou, A.F. Rees y K. Williams (eds). Libro de resúmenes del 26 simposium annual de la Biología y Conservación de las Tortugas Marinas, Grecia, 179 p.
- Albavera, P. E. 2007. Situación actual de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en playas de arribada del Pacífico mexicano. En: Reunión Nacional sobre Conservación de Tortugas Marinas, 25 al 28 de Noviembre de 2007, Ver., Veracruz. Libro de resúmenes, 10 p.
- Avise, J.C., J. Arnold, R. Martin Ball, E. Bermingham, T. Lambt', J.E. Neigel, C.A. Reeb y N.C. Saunders. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics. 18:489-522.
- Avise, J. C., B.W. Bowen, T. Lamb, A.B. Meylan y E. Bermingham. 1992. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. Molecular Biology and Evolution. 9:457–473 p.
- Aggarwal, R.K., K. Shanker, J. Ramadevi, T.P. Velavan, B.C Choudhury y L. Singh. 2003. Genetic analysis of olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) populations from the East coast of India using microsatellite markers and mitochondrial d-loop haplotypes. En: S. Sadove, N.J. Pilcher y K. Shanker (eds). Proceedings of the 23rd Annual

Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Del 17-21 de Marzo de 2003, Kuala Lumpur, Malaysia. NOAA Technical Memorandum, National Technical Information Service, Springfield, VA, USA.

- Bass, A.L., D.A. Good, K.A. Bjorndal, J.I. Richardson, Z.M. Hillis, J.A. Horrocks y B.W. Bowen. 1996. Testing models of female migratory behavior and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA control region sequences. *Molecular Ecology*. 5: 321–328 p.
- Bernando, J. y P. Plotkin. 2007. An evolutionary perspective on the arribada phenomenon and reproductive behavioral polymorphism of olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*). En: P. Plotkin *Biology and Conservation of Ridley Sea Turtles*, Pamela Plotkin (Editor). Johns Hopkins University Press. Pag.59-88.
- Bjorndal, K.A, A.B. Bolten y M.Y. Chaloupka. 2000. Green turtle somatic growth model: Evidence for density dependence. *Green turtle somatic growth model: Evidence for density dependence. Ecological Applications*. 10(1):269–282 p.
- Bohonak, A. J. 1999. Dispersal, Gene Flow, and Population Structure. *The Quarterly Review of Biology*. 74(1):21-45 p.
- Bourjea, J., S. Lapègue, L. Gagnevin, D. Broderick, J.A. Mortimer, S. Ciccione, D. Roos, C. Taquet y H. Grizel. 2007. Phylogeography of the green turtle, *Chelonia mydas*, in the Southwest Indian Ocean. *Molecular Ecology* 16: 175–186.
- Bowen, B. W. 1995. Tracking Marine Turtles with Genetic Markers Voyages of the ancient mariners. *BioScience*. 45(8): 528-534 p.
- Bowen, B.W., A.B. Meylan, J. P. Ross, C.J. Limpus, G.H. Balazs y J.C. Avise, 1992. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46: 865–881 p.
- Bowen, B.W., N. Kamezaki, C.J. Limpus, G.H. Hughes, A.B. Meylan y J.C. Avise, 1994. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution*. 48:1820–1828 p.
- Bowen, B.W. y J.C. Avise. 1995. Conservation Genetics of marine turtles. En: J.C. Avise y J.L. Hamrick (eds). *Conservation Genetics: Case histories from nature*. Chapman and Hall, U. S. A., 190-237 p.

- Bowen, B.W. y S.S. Karl. 1996. Population structure, phylogeography, and molecular evolution, En: P.L. Lutz y J.A. Musik (eds). *The Biology of Sea Turtles*, CRC Press. Boca de Raton, Florida. 29-50 p.
- Bowen, B.W., A.M. Clark, F.A. Abreu-Grobois, A. Chavez, H.A. Reichart y R.J. Ferl. 1998. Global phylogeography of the ridley sea turtles (*Lepidochelys spp.*) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genetica*. 101:179-189 p.
- Bowen, B.W. y S.A. Karl. 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology*. 16(23):4886-4907 p.
- Briseño-Dueñas, R. 1998. Variación genética en la región control del ADN mitocondrial de poblaciones de la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*, en el Pacífico Oriental y las implicaciones para su conservación. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. 70 pp.
- Carr, A. y L. Ogren. 1960. The ecology and migrations of sea turtles IV: The green turtle in the Caribbean Sea. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 121:7-48 p.
- Carr, A. 1967. So excellent a fishe. *A Natural History of Sea*. Natural History Press. Garden City. New York, xii y 248p.
- CIT (Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas). 2006. [impresión electrónica]. Disponible en: <http://www.iacseaturtle.org/acercatort.asp>. Desde Sobre las Tortugas Marinas/Ciclo de vida/Ciclo de reproducción de las Tortugas Marinas. [Con acceso el 13 de Julio de 2009].
- Clement, M., D. Posada y K.A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9:1657-1659 p.
- Cliffton, K., D.O. Cornejo y R.S. Felger. 1982. Sea turtles of the Pacific coast of Mexico. En K.A. Bjorndal (ed). *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 199-209 p.
- Dutton, P.H., B.W. Bowen, D.W. Owen, A. Barragan y S.K. Davis. 1999. Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Journal of Zoology* 248: 397-409 p.

- Encalada, S.E., P.N. Lahanas, A. Bjorndal, A.B. Bolten, M.M. Miyamoto y B.W. Bowen. 1996. Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology* 5:473-483 p.
- Encalada, S E, K.A. Bjorndal, A.B. Bolten *et al.* 1998. Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean regions as inferred from mtDNA control region sequences. *Marine Biology*. 130:567–575 p.
- Estoup, A., C.R. Larglader, E. Perrot y D. Chourrout. 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular marine Biology and Biotechnology*. 5(4):295-298 p.
- Excoffier, L., P.E. Smouse y J.M Quattro.1992. Analisis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491 p.
- Excoffier, L., G. Laval y Schneider S. 2005. Arlequin ver 3.1. An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary informatics on line*. 1:47-50 p.
- FitzSimmons, N., C. Moritz, C. Limpus, L. Pope y R. Prince. 1997a. Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics* 147:1843-1854 p.
- Fitzsimmons, N., C. Limpus, J.A. Norman, A.R. Goldizen, J.D. Miller y C. Moritz. 1997b. Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94:8912–8917 p.
- FitzSimmons, N.C., C. Moritz y B.W. Bowen. 2000. Population identification. En K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (eds). *Research and management techniques for the conservation of sea turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, 72-79 p.
- Frazier, J. y S. Salas. 1982. Ecuador Closes Commercial Turtle Fishery. *Marine Turtle Newsletter* 20:5-6 p.
- Girard, C., J. Sudre, S. Benhamou, D. Ross y P. Luschi. 2006. Homing in green turtles *Chelonia mydas*: oceanic currents act as a constraint rather than as an information source. *Marine Ecology Progress Series*. 322:281-289 p.

- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*. 66(4):591-600 p.
- Hays, G.C., P. Luschi, F. Papi, C. del Seppia y R. Marsh. 1999. Changes in behaviour during the inter-nesting period and post-nesting migration for Ascension Island green turtles. *Marine Ecology Progress Series*. 189:263-273 p.
- Hendrickson, J.R. 1958. The green turtle *Chelonia mydas* in Malaya and Sarawak. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 130:455–535 p.
- Higgs, D., Thompson, J. y Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:4673-4680 p.
- Hulin, V y J.M. Guillon. 2007. Female philopatry in a heterogeneous environment: ordinary conditions leading to extraordinary ESS sex ratios. *BMC Evolutionary Biology*. 7(13):11 p.
- Hutcheson, K. 1970. A test for compared diversities base don the Shannon formula. *J. Theoret. Biol.* 29:151-154 p.
- Instituto Nacional de Ecología. 1999. Programa Nacional de Protección, Conservación, Investigación y Manejo de Tortugas Marinas. SEMARNAP. México. 81 p.
- Instituto Nacional de la Pesca. 2000. Sustentabilidad y Pesca Responsable en México: Evaluación y Manejo. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). México.
- Jackson, J.B.C. 1997. Reefs since Columbus. *Coral Reefs* 16(Suppl.):S23-S32 p.
- 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 sea turtle rookeries. *Molecular Ecology* 15:2567-2575 p.
- Lahanas, P.N., K.A. Bjorndal, A.B. Bolten, S.E. Encalada, M.M. Miyamoto, R.A. Valverde y B.W. Bowen. 1998. Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Marine Biology*. 130:345–352 p.

- López-Castro, M. C. 2004. Caracterización genética de la colonia anidante de tortuga golfina *Lepidochelys olivacea*, en Baja California Sur, México. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Tesis de Maestría en Ciencias. 86 pp.
- López-Castro, M. C., R. Carmona y W. J. Nichols. 2004. Nesting characteristics of the olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*) in Cabo Pulmo, southern Baja California. *Marine Biology*. 145:811-820 p.
- Lopez-Castro, M.C. and A. Rocha-Olivares. 2005. The panmixia paradigm of eastern Pacific olive ridley turtles revised: consequences for their conservation and evolutionary biology. *Molecular Ecology*. 14(11):3325-34 p.
- López-Chávez, F. J. 2000. Determinación de la estructura genética de colonias de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), del Pacífico tropical Oriental. Universidad de Colima. Tesis de Maestría. 58 pp.
- Limpus, C. J. 1995. Global overview of the status of marine turtles: a 1995 viewpoint. En: K.A. Bjorndal (ed). *Biology and Conservation of Sea Turtles*, Segunda edición. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., 605-609 p.
- Maldonado-Gasca, A. 2007. Programa de Protección de las Tortugas Marinas y sus Nidos en el Área del Proyecto Litibú en Nayarit. FONATUR. 64 pp.
- Márquez, M.R. 1990. FAO species catalogue. Vol.11: Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO Fisheries Synopsis No. 125, Vol. 11. Rome, FAO. 81 pp.
- Márquez, M.R. 1996. Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de Cultura Económica. 200 pp.
- Martin, A.P y S.R. Palumbi. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90: 4087-4091.
- Miller, J. D. 1985. Embryology of marine turtles. En C. Gans, F. Billet y P.F. Maderson (eds). *Biology of the Reptilia*, Vol. 14A, John Wiley & Sons. New York. 305 p.
- Morreale, S., E. Standora, J. Spotila y F. Paladino. 1996. Migration corridor for sea turtles. *Nature*. 384: 319-320 p.

- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, U.S.A. 456 pp.
- Owens, D. W., M.A. Grassman y J. R. Hendrickson. 1982. The imprinting hypothesis and sea turtle reproduction. *Herpetologica* 38:124–135 p.
- Pandav, B., B.C Choudhury y K. Shanker. 1998. The Olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) in Orissa: an urgent call for n intensive and integrated conservation program. *Current Science* 75:1323-1328 p.
- Pandav, B. 2001. Conservation and management of olive ridley sea turtles on the Orissa coast. PhD Thesis Utkal University, Bhubaneshwar India.
- Peñaflores-Salazar, C., J. Vasconcelos-Pérez, E. Albavera-Padilla y M.C. Jiménez Quiroz. 2001. Especies sujetas a protección especial. Tortuga golfina. En: M.A. Cisneros, L.F. Beléndez, E.Zárate, M. T. Gaspar, L. C. López, C. Saucedo y J. Tovar (eds). *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México. Evaluación y Manejo. 1999-2000*. Publicado en CD. Instituto Nacional de la Pesca/SEMARNAT. México, 1001-1021 p.
- Plotkin, P. y J. Bernardo. 2003. Investigations into the basis of the reproductive behavioral polymorphism in *Lepidochelys olivacea*. En J.A. Seminoff (ed). *Proceedings of the Twenty-second Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Informe Técnico NMFS-SEFSC-503. 29 p.
- Posada, D. y K.A. Crandall. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note* 14(9):817-818 p.
- Posada, D., K.A. Crandall y A.R. Templeton. 2000. GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*. 9:487-488 p.
- Pritchard, P.C.H. y J.A Mortimer. 2000. Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies. En: K. L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN Publicación No. 4. 23-41 p.
- Pritchard, P.C.H. 2003. Condición Global de las Tortugas Marinas. Primera Conferencia de Las Partes: Primera Parte. INFO-001. En: Secretaría CIT, Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas – Informe Final Primera Conferencia de las Partes Contratantes. Secretaría Pro Tempore de la Conservación

- Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas. San José, Costa Rica. 81-93 p.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1):223-225 p.
- Rodríguez-Zárte, C. J. 2008. Estructura genética de las colonias reproductoras de tortuga golfinia *Lepidochelys olivacea*, en Baja California y playas del Pacífico Continental Mexicano. Tesis de Maestría. 73 pp.
- Rogers, A. R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*. 49(4):608-615 p.
- Rogers, A. R. y H.C. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*. 9(3):552-569 p.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. y Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497 p.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 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. Diario Oficial de la Federación, 6 de Marzo de 2002.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787–792 p.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).
- Trejo-Robles J.A., R.E. Carretero-Montes y F.A. Silva Batiz. 2007. Seis años de análisis de la protección de la tortuga golfinia (*Lepidochelys olivacea*). Campamento la gloria, (Santuario Playón de Mismaloya) Tomatlán, Jalisco. En: Reunión Nacional sobre Conservación de Tortugas Marinas, 25 al 28 de Noviembre de 2007, Ver., Veracruz. Libro de resúmenes. 24 p.

- UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). 1995. Estrategia Mundial para la Conservación de las Tortugas Marinas. Comisión de la Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido. 24 p.
- UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). 2003. Directrices para emplear los criterios de la Lista Roja de la UICN a nivel regional: Versión 3.0. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido. ii + 26 pp.
- Valverde, R.C. y C.A. Gates. 2000. Estudios de Poblaciones en Playas de Arribadas. En: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (eds). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN Publicación No. 4. 64-69 p.
- Wright, S. 1951. The general structure of populations. *Annals of Eugenics* 1:232-334.
- Zwinenberg, A.J. 1976. The olive ridley, *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829): probably the most numerous marine turtle today. *Bulletin of Maryland Herpetology Society* 12 (3):75-95 p.

VII. Apéndices

Apéndice I. Matriz del número de diferencias totales (incluyendo indels) entre los distintos haplotipos de ADN mitocondrial de *Lepidochelys olivacea* registrados por Briseño-Dueñas (1998) y los encontrados en este estudio; los números representan diferencias entre cada uno de éstos y los cuadros en color gris oscuro indican igualdad entre los haplotipos.

	Lo 1	Lo 2	Lo 3	Lo 4	Lo 5	Lo 6	Lo 7	Lo 8	Lo 9	Lo 10	Lo 11	Lo 12	Lo 13	Lo 14	Lo 15	Lo 16	Lo 17	Lo 18	Lo 19	Lo 20	Lo 21	Lo 22	Lo 23	Lo 24	Lo 25	Lo 26	Lo 27	Lo 28	Lo 29	PRB	IRB	FRB	GRB	CRB	BRB	DRB	ARB
Lo 1																																					
Lo 2	*																																				
Lo 3	1	1																																			
Lo 4	2	2	3																																		
Lo 5	1	1	2	1																																	
Lo 6	2	2	3	4	3																																
Lo 7	2	2	3	*	1	4																															
Lo 8	1	1	2	1	*	3	1																														
Lo 9	2	2	3	4	3	4	4	3																													
Lo 10	1	1	2	3	2	3	3	2	3																												
Lo 11	*	*	1	2	1	2	2	1	2	1																											
Lo 12	2	2	3	2	1	4	2	1	4	3	2																										
Lo 13	2	2	3	4	3	*	4	3	4	3	2	4																									
Lo 14	3	3	4	5	4	5	5	4	1	4	3	5	5																								
Lo 15	1	1	2	3	2	3	3	2	3	2	1	3	3	4																							
Lo 16	1	1	2	3	2	3	3	2	3	2	1	3	3	4	2																						
Lo 17	1	1	2	3	2	3	3	2	3	2	1	3	3	4	2	2																					
Lo 18	1	1	2	3	2	3	3	2	3	2	1	3	3	4	2	2	2																				
Lo 19	3	3	4	5	4	1	5	4	5	4	3	5	1	6	4	4	4	4																			
Lo 20	2	2	3	2	1	4	2	1	4	3	2	2	4	5	3	3	1	3	5																		
Lo 21	1	1	2	3	2	3	3	2	1	2	1	3	3	2	2	2	2	2	4	3																	
Lo 22	2	2	3	2	1	4	2	1	4	3	2	2	4	5	3	3	3	3	5	2	3																
Lo 23	3	3	4	1	2	5	1	2	5	4	3	3	5	6	4	4	4	4	6	3	4	1															
Lo 24	3	3	4	5	4	5	5	4	1	4	3	5	5	*	4	4	4	4	6	5	2	5	6														
Lo 25	3	3	4	5	4	5	5	4	1	4	3	5	5	2	4	4	4	2	6	5	2	5	6	2													
Lo 26	2	2	3	2	1	4	2	1	4	3	2	2	4	4	3	3	3	3	5	2	3	2	3	4	5												
Lo 27	1	1	2	3	2	3	3	2	3	2	1	3	3	2	2	2	2	2	4	3	2	3	4	2	4	2											
Lo 28	1	1	2	3	2	3	3	2	3	2	1	3	3	4	2	2	2	2	4	3	2	3	4	4	4	3	2										
Lo 29	5	5	6	7	6	7	7	6	3	6	5	7	7	4	4	6	4	6	8	5	4	7	8	4	4	7	6	4									
PRB	2	2	3	2	1	4	2	1	4	3	2	2	4	5	3	3	3	3	5	2	3	0	1	5	5	2	3	3	7								
IRB	1	1	2	3	2	3	3	2	3	2	1	3	3	4	0	2	2	2	4	3	2	3	4	4	4	3	2	2	4	3							
FRB	3	3	4	5	4	5	5	4	1	4	3	5	5	0	4	4	4	4	6	5	2	5	6	0	2	4	2	4	4	5	4						
GRB	5	5	6	7	6	7	7	6	3	6	5	7	7	2	4	6	6	6	8	7	4	7	8	2	4	6	4	6	4	7	4	2					
CRB	2	2	3	4	3	4	4	3	2	3	2	4	4	1	3	3	3	3	5	4	1	4	5	1	3	3	1	3	5	4	3	1	3				
BRB	1	1	2	3	2	3	3	2	1	2	1	3	3	2	2	2	2	2	4	3	0	3	4	2	2	3	2	2	4	3	2	2	4	1			
DRB	5	5	6	7	6	7	7	6	5	4	5	7	7	6	6	6	6	6	8	7	6	7	8	6	6	7	6	6	8	7	6	6	8	7	6		
ARB	2	2	3	4	3	4	4	3	4	3	2	4	4	5	3	3	3	3	5	4	3	4	5	5	5	4	3	3	7	4	3	5	7	4	3	3	

* Igualdad entre haplotipos debida a la reducción del tamaño de la secuencia para fines comparativos.

Apéndice II. Matriz del número de diferencias totales (incluyendo indels) entre los distintos haplotipos de ADN mitocondrial de *Lepidochelys olivacea* registrados por López-Castro y Rocha-Olivares (2005) y los encontrados en este estudio; los números representan diferencias entre cada uno de éstos y los cuadros en color gris oscuro indican igualdad entre los haplotipos.

	Lo1	Lo2	Lo3	Lo4	Lo5	Lo6	Lo7	Lo8	Lo9	Lo10	Lo11	Lo12	Lo13	Lo14	Lo15	Lo16	Lo17	Lo18	Lo19	Lo20	Lo21	Lo22	Lo23	Lo24	Lo25	Lo26	Lo27	Lo28	Lo29	LAY	OAY	NAY	VAY	UAY	
Lo1																																			
Lo2	1																																		
Lo3	1	2																																	
Lo4	3	2	4																																
Lo5	1	2	2	2																															
Lo6	3	2	4	4	4																														
Lo7	2	3	3	1	1	5																													
Lo8	2	1	3	1	1	3	2																												
Lo9	2	3	3	5	3	5	4	4																											
Lo10	1	2	2	4	2	4	3	3	3																										
Lo11	1	2	2	4	2	4	3	3	3	2																									
Lo12	2	3	3	3	1	5	2	2	4	3	3																								
Lo13	2	3	3	5	3	1	4	4	4	3	3	4																							
Lo14	3	4	4	6	4	6	5	5	1	4	4	5	5																						
Lo15	1	2	2	4	2	4	3	3	3	2	2	3	3	4																					
Lo16	1	2	2	4	2	4	3	3	3	2	2	3	3	4	2																				
Lo17	1	2	2	4	2	4	3	3	3	2	2	3	3	4	2	2																			
Lo18	1	2	2	4	2	4	3	3	3	2	2	3	3	4	2	2	2																		
Lo19	3	4	4	6	4	2	5	5	5	4	4	5	1	6	4	4	4	4																	
Lo20	2	3	3	3	1	5	2	2	4	3	3	2	4	5	3	3	1	3	5																
Lo21	1	2	2	4	2	4	3	3	1	2	2	3	3	2	2	2	2	2	4	3															
Lo22	2	3	3	3	1	5	2	2	4	3	3	2	4	5	3	3	3	3	5	2	3														
Lo23	3	4	4	2	2	6	1	3	5	4	4	3	5	6	4	4	4	4	6	3	4	1													
Lo24	4	5	5	7	5	7	6	6	2	5	3	6	6	1	5	5	5	5	7	6	3	6	7												
Lo25	3	4	4	6	4	6	5	5	1	4	4	5	5	2	4	4	4	2	6	5	2	5	6	3											
Lo26	2	3	3	3	1	5	2	2	4	3	3	2	4	4	3	3	3	3	5	2	3	2	3	5	5										
Lo27	1	2	2	4	2	4	3	3	3	2	2	3	3	2	2	2	2	2	4	3	2	3	4	3	4	2									
Lo28	1	2	2	4	2	4	3	3	3	2	2	3	3	4	2	2	2	2	4	3	2	3	4	5	4	3	2								
Lo29	5	6	6	8	6	8	7	7	3	6	6	7	7	4	4	6	4	6	8	5	4	7	8	5	4	7	6	4							
LAY	2	3	3	5	3	5	4	4	0	3	3	4	4	1	3	3	3	3	5	4	1	4	5	2	1	4	3	3	3						
OAY	1	2	2	2	0	4	1	1	3	2	2	1	3	4	2	2	2	2	4	1	2	1	2	5	4	1	2	2	6	3					
NAY	0	1	1	3	1	3	2	2	2	1	1	2	2	3	1	1	1	1	3	2	1	2	3	4	3	2	1	1	5	2	1				
VAY	2	3	3	1	1	5	0	2	4	3	3	2	4	5	3	3	3	3	5	2	3	2	1	6	5	2	3	3	7	4	1	2			
UAY	2	3	3	5	3	1	4	4	4	3	3	4	0	5	3	3	3	3	1	4	3	4	5	6	5	4	3	3	7	4	3	2	4		