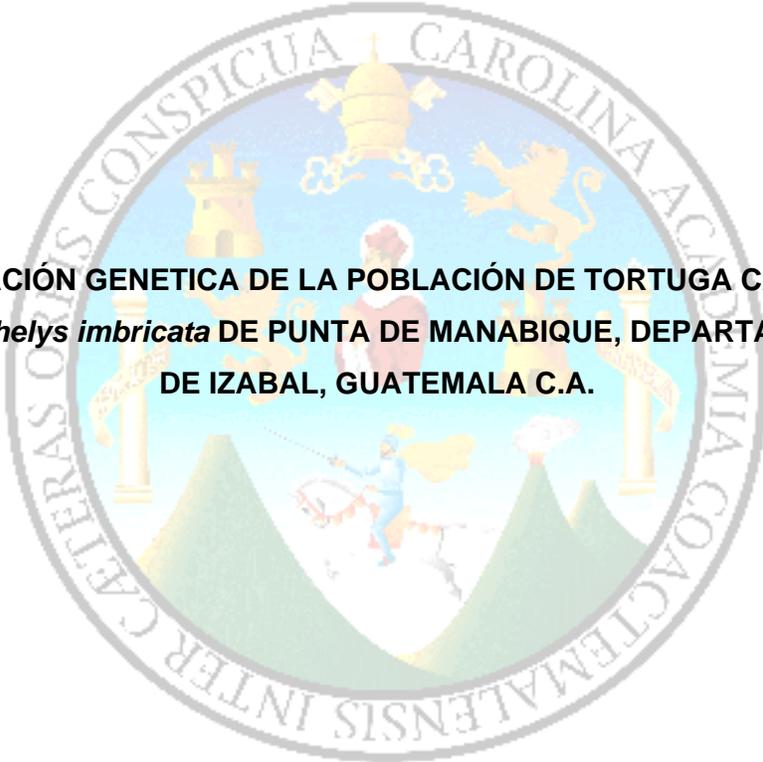


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**VARIACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE TORTUGA CAREY  
*Eretmochelys imbricata* DE PUNTA DE MANABIQUE, DEPARTAMENTO  
DE IZABAL, GUATEMALA C.A.**

**LUIS EDUARDO GIRON ARANA**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE 2006**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**VARIACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE TORTUGA CAREY  
*Eretmochelys imbricata* DE PUNTA DE MANABIQUE, DEPARTAMENTO  
DE IZABAL, GUATEMALA C.A.**

**TESIS**

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD  
DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN  
CARLOS DE GUATEMALA**

**POR**

**LUIS EDUARDO GIRON ARANA**

**AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MÉDICO VETERINARIO**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE 2006**

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

<b>DECANO:</b>	<b>Lic. Zoot. Marco Vinicio de la Rosa</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Dr. MV. Marco Vinicio García Urbina</b>
<b>VOCAL PRIMERO:</b>	<b>Dr. MV. Yeri Edgardo Veliz Porras</b>
<b>VOCAL SEGUNDO:</b>	<b>Dr. MV. MSc. Fredy González</b>
<b>VOCAL TERCERO:</b>	<b>Dr. MV. Edgar Bailey</b>
<b>VOCAL CUARTO:</b>	<b>Br. Yadyra Roció Pérez Flores</b>
<b>VOCAL QUINTO:</b>	<b>Br. José Abraham Chang Ramírez</b>

**ASESORES:**

**Dr. Mv. Carlos Efraín Alfaro**  
**Msc. Bd. Mario Roberto Jolón Morales**  
**Dr. MV Gustavo Taracena**

**HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR**

**En cumplimiento con lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a consideración de ustedes el presente trabajo de tesis titulado**

**VARIACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE TORTUGA CAREY  
*Eretmochelys imbricata* DE PUNTA DE MANABIQUE, DEPARTAMENTO  
DE IZABAL, GUATEMALA C.A.**

**COMO REQUISITO PREVIO A OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**MÉDICO VETERINARIO**

**TESIS QUE DEDICO**

**A DIOS TODO PODEROSO Y ETERNO**

**A GUATEMALA**

**A MIS PADRES: Arnoldo Giron y Rosario Arana de Giron por el apoyo, comprensión y amor que me han dado en cada momento de mi vida.**

**A HELEN YESENIA RUANO RECINOS: por ser la luz de mi vida**

**A LUIS, Ma. ALEJANDRA y Ma. FERNANDA: por todo lo que significan para mi.**

**A MIS HERMANAS: Eda Mariela, Luby Zulina, Luz Cecilia y Maria del Rosario**

**A MIS TIOS: Alejandro, Liseth, Miguel, Antonieta, Alfredo y Rosario, por su apoyo incondicional en todo momento.**

**A MIS SOBRINOS: Silvana, Byron, Aura, Diego, Andrés y Sofía**

**A MIS PRIMOS: Alejandro, Miguel, Gabriel, Roció, David, Rene y Valesca**

**A TODA MI FAMILIA**

**A MIS AMIGOS: Especialmente**

**ACTO QUE DEDICO**

**A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**A EL CENTRO DE ACCION LEGAL AMBIENTAL Y SOCIAL DE  
GUATEMALA**

**A EL INSTITUTO DE CIENCIAS PARA EL AMBIENTE Y EL DESARROLLO  
SUSTENTABLE**

**A LA ASOCIACIÓN DE PROFESIONALES EN BIODIVERSIDAD**

**AGRADECIMIENTO**

**A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.**

**A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.**

**A LA ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA.**

**A LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

**A EL CENTRO MULTIDICIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA**

**A LA MUNICIPALIDAD DE LA LIBERTAD, PETEN**

**A el Proyecto F15/2003 del FONACON**

**A el Proyecto FD 16-03 del SENACYT**

**A MIS ASESORES:**

**Dr. Mv. Carlos Efraín Alfaro**

**M. Sc. Bd. Mario Roberto Jolon Morales**

**Dr. MV Gustavo Taracena**

**A MI TUTOR**

**Dr. BM. Omar Chassin Noria**

**A MI REVISOR DE TESIS:**

**Dr. MV Dennis Guerra**

**A MIS AMIGOS:**

**Dr. Yuri Melini**

**Lic. Nicolás Pelico**

**Licda. Regina Sánchez**

## ÍNDICE

<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	3
<b>III</b>	<b>OBJETIVOS</b>	4
	3.1 General	4
	3.2 Específicos	4
<b>IV</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	5
	4.1 Antecedentes del uso de la Tortuga Carey	5
	4.2 Estado de los Conocimientos sobre la Especie	5
	4.3 Descripción General de la Especie <i>E. imbricata</i> .	7
	4.3.1 Historia Natural General	7
	4.3.2 Hibridación	9
	4.4 Estudios Genéticos de la Tortuga Carey	10
	4.5 Variación Genética	16
	4.6 Aspectos relevantes de la variación biológica y la transmisión de información por generaciones	16
	4.7 Herramientas para la determinación de secuencias moleculares	17
	4.7.1 Marcadores Moleculares	17
	4.7.2 La PCR	18
	4.8 Características del ADN mitocondrial	18
	4.9 Secuenciación del ADN	19
	4.10 Secuenciación nucleotídica del ADN.	21
	4.11 Glosario de términos Genéticos	22
<b>V</b>	<b>MATERIALES Y METÒDOS</b>	23
	5.1 Materiales	23
	5.1.1 Recursos Humanos	23
	5.1.2 De Laboratorio	23
	5.1.3 De Campo	25
	5.1.4 De Tipo Biológico	25
	5.1.5 Centros de referencia	25
	5.2 Métodos	26

5.2.1	Colecta de Muestras	26
5.2.2	Preservación de muestras	26
5.2.3	Extracción del DNA	26
5.2.3.1	Para tejido epidérmico preservado en NaCl.	26
5.2.3.2	Para tejido epidérmico preservado en Etanol al 70 %	27
5.2.3.3	Para tejido epidérmico preservado en DMSO	27
5.2.3.4	Para tejido sanguíneo preservado en Buffer de extracción.	27
5.2.4	Gel de agarosa	27
5.2.5	Electroforesis en placas de agarosa	27
5.2.6	PCR	28
5.2.6.1	Concentración de reactivos	28
5.2.6.2	Concentraciones a utilizar	28
5.2.6.3	Calculo de concentración	28
5.2.6.4	Termociclador	29
5.2.6.5	Electroforesis en Gel de Agarosa (1%)	29
5.2.7	Purificación del DNA (producto de Amplificación) con QIAquick	29
5.2.8	Reacción de secuenciación	30
5.2.9	Purificación del DNA (Producto de secuenciación) con Etanol	31
5.2.10	Secuenciación o electroforesis capilar	31
5.2.11	Análisis estadístico de secuencias	32
<b>VI</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
6.1	Resultados de Secuencias Nucleotidicas (haplotipos)	33
6.2	Resultados de Dendogramas	36
6.3	Dendograma Filogenético 1	38
6.4	Dendograma Filogenético 2	39
6.5	Discusión	40
<b>VII</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>VIII</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>43</b>

<b>IX</b>	<b>RESUMEN</b>	44
<b>X</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	45
<b>XI</b>	<b>ANEXOS</b>	52

### ÌNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.	Estimación de las contribuciones de diferentes poblaciones anidadoras de tortugas carey ( <i>Eretmochelys imbricata</i> ) a dos agrupamientos no reproductivos del Caribe, basada en haplotipos de ADNmt.	11
Cuadro 2.	Contribución porcentual estimada de poblaciones Anidadoras cubanas, mexicanas, portorriqueñas y desconocidas a los agrupamientos de tortugas carey ( <i>Eretmochelys imbricata</i> ) en zonas no reproductivas en aguas de Cuba, México y Puerto Rico, según se deduce de la composición haplotípica del ADNmt.	13
Cuadro 3.	Meses de anidación de la tortuga carey en el mar Caribe.	56
Figura 1.	Sitios conocidos de anidación de la tortuga carey en el Caribe.	55
Figura 2.	Mapa de las fronteras marítimas en el Caribe	55
Figura 3.	Clave para la identificación de la tortuga carey en Centroamérica	57
Figura 4.	Ciclo de vida genético para la tortuga carey, basado en Miller (1997) y Cachón (2002)	57
Figura 5.	Rutas de migración establecidas por transmisiones satelitales.	58
Figura 6.	Datos de anidaciones en Guatemala	58

## I INTRODUCCIÓN

Las tortugas carey (*Eretmochelys imbricata*) son reptiles marinos muy complejos y especializados. Para madurar, llegar a la edad adulta, reproducirse y completar el ciclo vital, necesitan una diversidad de medios, en particular playas terrestres, el mar abierto, aguas costeras y estuarinas. Durante un ciclo vital normal, las tortugas se dispersan y emigran; recorren largas distancias, a menudo miles de kilómetros, desplazándose habitualmente hacia alta mar, así como hacia las aguas territoriales de diferentes países.

En Guatemala históricamente el uso de los productos y sub productos de las tortugas carey (*E. Imbricata*) se documenta desde los tiempos de los conquistadores españoles. Sus cronistas relataron que los nativos de la región utilizaban la caparazón con fines ornamentales, además el consumo de su carne y huevos como fuente de proteína animal (Díaz del Castillo B,1632).

Meylan (1999) sugirió que anteriormente no se había reconocido la verdadera magnitud de este efecto, y que en nuestra percepción actual sobre el estado de la población de esta especie ha influido el síndrome de referencia variable (Pauly, 1995; Sheppard, 1995; Jackson, 1997). Este síndrome indica la tendencia de las personas a medir el cambio por comparación con lo que consideran una condición inicial o de referencia, en general el momento de su vida en que han observado por primera vez ese fenómeno. Por lo tanto, las referencias se reajustan constantemente (e inconscientemente), por lo que se pierde la perspectiva histórica.

En la actualidad en nuestro país no existen registros ni estimaciones de la población de esta especie que visita nuestras playas en el caribe.

Desde el punto de vista legal en Guatemala existen regulaciones de uso a nivel interno y de convenios internacionales ratificados por el estado, para la protección y conservación de esta especie, de tal manera que se ha elaborado una estrategia nacional para la protección y conservación de las tortugas marinas y en este marco se hace necesario tener un fundamento técnico y científico confiable para la toma de decisiones, con la esperanza de tener un mayor éxito en este esfuerzo de conservación de una especie emblemática.

Las tortugas de carey están circuntropicalmente distribuidas en aguas costeras; se encuentran en las aguas y en las playas de 82 unidades geopolíticas, y pueden darse en otras 26 (Baillie y Groombridge, 1996). La anidación tiene lugar en playas de por lo menos 60 países, si bien gran parte de ella es de baja densidad (Groombridge y Luxmoore, 1989). No se han documentado importantes criaderos al este del océano Atlántico; a lo largo de la costa del Pacífico de América del Norte, Central y del Sur, ni en el Pacífico central (Groombridge y Luxmoore, 1989; Eckert, 1993; Limpus, 1995).

En la presente tesis se establece la variación genética de la población de tortugas carey de punta de manabique, por medio de una comparación entre la población muestreada (stock) en este trabajo y la población reportada en el GenBank para esta especie. A través de un dendograma filogenético. Con esta estimación se establecieron los países con los cuales compartimos esta especie.

## II. HIPÓTESIS

La población anidadora de *E. imbricata* de punta de manabí que no presenta variación genética (haplotipos nuevos) en comparación con los reportados en genbank para la región del gran caribe.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Generar conocimiento genético que pueda ser utilizado como herramienta para la conservación de la población de *E. Imbricata* en punta de Manabique.

#### 3.2 Específicos

Determinar la variación genética mediante la comparación de los nucleótidos presentes en los diferentes haplotipos y la frecuencia con la que aparecen.

Evaluación de los potenciales sitios de origen de la población de *E imbricata* de punta de Manabique por alineamiento y comparación de secuencias moleculares.

Realizar un dendograma filogenético de la *E. imbricata* que anida en Punta de Manabique, Guatemala.

## IV REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Antecedentes del uso de la Tortuga Carey

La tortuga carey, *Eretmochelys imbricata*, es un caso único entre las tortugas vivas por tener *escamas* superpuestas en el caparazón. Como ocurre con otras especies de tortugas marinas, los huevos, la carne y el aceite de la tortuga carey son productos buscados desde hace miles de años, pero son las escamas superpuestas del caparazón lo que hacen que este animal sea tan codiciado comercialmente. Llamadas "bekko", "carey", o "concha de tortuga", esas espesas placas que recubren el caparazón están compuestas de queratina, la misma sustancia que forma parte de las uñas, el cabello y el "cuerno" del rinoceronte. El carey es un material ricamente coloreado, que en manos de artesanos experimentados se puede soldar, modelar, cortar y convertir en infinidad de productos. Fue el primer material plástico utilizado por el ser humano, y ya antes de la era cristiana se comercializaba y usaba en el comercio internacional. Los precios actuales de algunos productos de carey hacen de este material uno de los productos de origen animal más valiosos; el caparazón bruto, no trabajado, puede venderse en miles de dólares el kg.

### 4.2 Estado de los Conocimientos sobre la Especie

Desde hace miles de años las tortugas marinas son objeto de la curiosidad y el interés del ser humano. Hay vestigios de estos reptiles asociados a las actividades humanas prehistóricas en el mundo entero, a menudo acompañando enterramientos humanos. Se encuentran antiguas representaciones de las tortugas marinas en pinturas, estatuillas, tallas, cerámicas, monedas, jeroglíficos, poemas, leyendas y mitos. Hoy, esas creaciones se denominan "artísticas" a falta de una explicación de lo que motivó su diseño y fabricación. Independientemente de lo que haya inspirado la creación de esas manifestaciones de la industria humana, está claro que los seres humanos ya se esforzaban por entender el fenómeno de las tortugas marinas antes de que existieran civilizaciones.

La información "científica", al menos en el ámbito de la ciencia occidental (Nader, 1996), se remonta al siglo XIV (Brongersma, 1972), pero el grueso del conocimiento científico occidental se acumuló durante el siglo XX.

En particular para la tortuga carey (Witzell, 1993; Rhodin y Pritchard, 1999) incluyen estudios concretos. Por ejemplo, Dobbs y col. (1999) determinaron que la falta de patrones universales para las mediciones corporales hacía necesario presentar datos estadísticos, y correlaciones, sobre tres métodos diferentes de medir la longitud del caparazón de las tortugas carey, decisión que redundó, desde luego, en mayores inversiones de tiempo y esfuerzos, tanto sobre el terreno como en laboratorio. A causa de la dificultad y el elevado costo de realizar estudios amplios e intensivos año tras año, Kerr y col. (1999) evaluaron la factibilidad de elaborar estadísticas para optimizar los esfuerzos de investigación planificando cuidadosamente periodos de seguimiento sensiblemente reducidos.

No obstante, nuestros conocimientos de la biología básica de las tortugas carey son incompletos, especialmente en lo referente a los aspectos ecológicos, inclusive las cuestiones más sencillas. Dado que los medios en que viven estos reptiles marinos son por naturaleza dinámicos e impredecibles, tanto en el tiempo como en el espacio, la tarea de establecer una base de conocimientos suficientes para entender las complejas interrelaciones y hacer previsiones valiosas, es enorme.

En consecuencia, es difícil, y a veces imposible, comparar e interpretar los resultados correspondientes a distintos períodos de tiempo y lugares.

Sólo se dispone de gran cantidad de información –parte de ella fundamental para adoptar decisiones sobre iniciativas tanto científicas como de conservación- en los informes elaborados por ciertas oficinas estatales, reuniones y departamentos universitarios. La producción de esta clase de publicaciones, de interés directo para el estudio de las tortugas carey, ha sido especialmente intensa en el último decenio del siglo XX. En algunos casos,

voluminosos registros conservados con una finalidad concreta, se han rehabilitado y reevaluado para investigar temas complejos, como los efectos de la explotación en las poblaciones de tortugas carey (Carrillo y col., 1999).

A causa de estos diversos factores, los científicos y los ecologistas se ven obligados a utilizar "fragmentos" del conocimiento en sus intentos de comprensión y ordenación. Si los temas que nos ocupan fueran simples y predecibles, no se plantearía entonces ningún problema grave. Pero las tortugas marinas, en particular las tortugas carey, no siempre hacen lo que se espera según los parámetros humanos de la lógica o la eficacia (Meylan, 1999).

#### 4.3 Descripción General de la Especie *E. imbricata*.

##### 4.3.1 Historia Natural General

Las tortugas carey, al igual que otras tortugas marinas, tienen un ciclo vital complejo. El resumen siguiente puede ayudar a establecer un marco de referencia general. No obstante, es importante saber que los detalles de cada zona, temporada e individuo pueden variar enormemente. (Frazier, en prensa). Cada hembra abandona el mar, se arrastra hasta una playa arenosa y localiza un lugar para anidar por encima del nivel de la marea alta. Habitualmente, las tortugas carey anidan entre la vegetación terrestre o bajo ella. Una hembra puede hacer más de un intento de excavar un nido antes de desovar con éxito en una cámara situada por lo menos a 10 centímetros por debajo de la superficie de la arena y de hasta 90 centímetros de profundidad. Cada huevo pesa 25 gr o más, y la nidada promedio tiene unos 140 huevos (pero a veces llega a haber hasta 250).

Después de cubrir el nido, la tortuga regresa al mar. A intervalos de aproximadamente 15 días, la misma hembra retorna, generalmente a la misma franja de playa, para anidar otra vez. Este proceso se repetirá hasta que acabe de anidar esa temporada, cuando habrá dejado por lo menos dos, y quizá hasta seis o incluso siete u ocho nidadas (Lohman y col., 1997).

El tiempo que tarda la incubación depende principalmente de la temperatura, y puede variar entre siete y diez semanas. La temperatura de incubación también determina el sexo de los embriones (Lohman y col., 1997).

Después de la eclosión, a las tortugas recién nacidas ("crías") puede llevarles varios días desenterrarse y emerger del nido, lo que habitualmente ocurre durante la noche. Una vez en la superficie de la playa, se arrastran hasta el mar y nadan aguas adentro alejándose de la costa.

El rumbo magnético que eligen tras haberse adentrado bastante en el mar está evidentemente influido por la dirección que toman cuando dejan el nido y nadan hacia el mar, orientándose por estímulos luminosos y/o las olas (Lohman y col., 1997). Una vez en alta mar y en medio de las corrientes oceánicas, las crías pueden refugiarse en masas de restos flotantes en el mar (Bjorndal, 1997).

Está claro que las tortugas pasan en alta mar varios años, tiempo durante el cual al menos algunas especies de tortugas marinas se dispersan por las cuencas marinas, circulando en los giros oceánicos. Sin embargo, casi nada se sabe acerca de esta fase del ciclo vital de la tortuga carey. Cuando su caparazón ha alcanzado unos 20 centímetros de longitud, al menos en la región del Caribe, las tortugas carey inmaduras comienzan a aparecer en zonas de arrecifes de coral, a las que se denomina "hábitats de cría". Las tortugas pasan a residir allí, estableciendo claramente un área de residencia en la que se alimentan, duermen y encuentran refugio.

El pasaje de las aguas pelágicas a las bentónicas implica un cambio espectacular de los hábitos, especialmente la dieta. Las tortugas carey tienen un pico como el del halcón, que utilizan para morder y extraer invertebrados blandos de los arrecifes. En muchos lugares, su dieta consiste en determinadas esponjas, y supone la ingesta sistemática de toxinas potentes así como de espículas vítreas (Meylan, 1998). Excepto varios peces muy especializados de

los arrecifes de coral, no se conoce ningún otro vertebrado capaz de tolerar una dieta nociva como ésta. En algunas regiones, particularmente el Océano Índico, la carne de tortuga carey es considerada venenosa para el ser humano, debido a las toxinas y especulas vítreas que contienen las esponjas que incluye en su dieta.

Como la mayoría de las demás especies de tortugas marinas, se piensa que las carey pasan por varios hábitat de cría o de desarrollo, aunque residiendo siempre en arrecifes de coral o cerca de ellos. Tras alcanzar la madurez sexual, las tortugas emigran de las zonas de alimentación a las de anidación. A veces, esto supone desplazamientos de miles de kilómetros en una dirección determinada, que acaban con el retorno de al menos las hembras a las mismas playas o la misma zona donde nacieron para anidar en ellas. Una vez hechas todas las puestas de la temporada, la hembra vuelve a emigrar hacia su zona de alimentación. Continuará migrando entre las zonas de alimentación y de reproducción cada pocos años, durante toda su vida, que puede durar varios decenios (Meylan, 1998).

En resumen, cada tortuga carey depende de una serie de medios, desde las playas altas terrestres hasta los arrecifes bentónicos, pasando por las aguas oceánicas pelágicas. Mucho antes de alcanzar la madurez sexual, estos animales se dispersan en vastas áreas marinas. En potencia, son aptos para vivir y reproducirse durante decenios (Meylan, 1998).

#### 4.3.2 Hibridación

Las tortugas carey están presentes en muchos de los casos de hibridación conocidos entre especies de tortugas marinas. Se han señalado híbridos de tortuga carey y *Caretta caretta* en Bahía (Brasil), donde hay indicaciones de que los híbridos eran al menos de segunda generación (Conceição y col., 1990; Bass y col., 1996; Bass, 1999; Marcovaldi y col., 1999).

En Florida (Estados Unidos), se señaló la presencia de un híbrido de tortuga carey macho y *Caretta caretta* hembra, y un huevo recogido en Surinam produjo un híbrido que se determinó procedía de una carey macho y una tortuga verde (*Chelonia mydas*) hembra; se estimó que era de segunda generación (o anterior) (Karr y col., 1995).

A causa de la antigüedad de las unidades taxonómicas en cuestión, Bowen y Karl (1997:36) dijeron de estos híbridos de tortugas marinas que eran "los bastardos más antiguos conocidos por la ciencia".

Si los híbridos originales de carey–*Caretta caretta* y/o carey–*Chelonia mydas* fueron fértiles, el hecho plantea una serie de interesantes –y complejas– cuestiones que alimentarán el debate interminable sobre cómo definir una especie biológica.

#### 4.4 Estudios Genéticos de la Tortuga Carey

Bass (1999) examinó los primeros resultados (Bass y col., 1996) de las investigaciones de muestras de ADN mitocondrial (ADNmt) de tortugas carey de ocho áreas de anidación y dos áreas de alimentación.

Este investigador llegó a la conclusión de que las poblaciones anidadoras del Caribe son genéticamente distinguibles, debido a las bajísimas tasas de flujo génico entre las poblaciones anidadoras, lo que resulta en unidades de población aisladas desde el punto de vista genético. Por ende, cada población anidadora existe independientemente de las demás, cualquiera sea la distancia geográfica entre ellas, y es muy poco probable que el tamaño y la composición de una población se vean influidos por la inmigración de tortugas de otras poblaciones. En otras palabras, si una población anidadora es diezmada, son escasas las posibilidades de recolonización a partir de otras poblaciones, y es probable que ello sólo ocurra después de un largo periodo.

Esto es coherente con lo que se sabía acerca de las tortugas carey de la región del Índico y el Pacífico (Broderick y col., 1994). Al mismo tiempo, estudios genéticos de tortugas carey encontradas en zonas de alimentación en Cuba y Puerto Rico indican que en ambos casos la "población" que se alimenta está compuesta de agrupamientos de individuos procedentes de al menos seis zonas de anidación diferentes (Cuadro 1). Bass concluyó que si bien los resultados publicados sólo habían incluido esos dos sitios, el hallazgo de poblaciones mezcladas en las zonas de alimentación podía extrapolarse a otros lugares.

Cuadro 1. Estimación de las contribuciones de diferentes poblaciones anidadoras de tortugas carey (*Eretmochelys imbricata*) a dos agrupamientos no reproductivos del Caribe, basada en haplotipos de ADNmt. Los valores presentados NO deben entenderse como valores precisos, sino como estimaciones cualitativas de la composición de las poblaciones en las zonas de alimentación (tomado de Bass, 1999: Cuadros 1 y 2).

Presunta población anidadora	Zona de alimentación			
	Cuba (n = 55)		Puerto Rico (n = 133)	
	Contribución	Desviación estándar	Contribución	Desviación estándar
Antigua	0,05	0,05	0,04	0,03
Barbados	0	0	0	0
Belice	0,08	0,07	0,03	0,03
Brasil	0	0	0	0
Cuba	0,67	0,09	0,24	0,05
México	0,05	0,03	0,14	0,03
Puerto Rico	0,06	0,03	0,14	0,04
Islas Vírgenes de los EE.UU.	0,09	0,09	0,42	0,06

Nota: Cuando las desviaciones estándar son relativamente grandes (próximas al valor de la contribución o mayores) el valor de la contribución no es fiable (Bass, 1999).

Díaz–Fernández y col. (1999) analizaron muestras de zonas de anidación y alimentación de Cuba, México y Puerto Rico.

Utilizando para el análisis secuencias más grandes de ADNmt, pudieron subdividir dos de los haplotipos descritos por Bass y col. (1996) en dos y tres haplotipos, respectivamente.

Además, Díaz–Fernández y col. (1999) estudiaron muestras de las que no disponían Bass y col. (1996), procedentes de un número mayor y más diversificado geográficamente de tortugas carey.

Aunque hay diferencias en los resultados de los dos estudios, Díaz–Fernández y col. (1999) confirmaron las mismas conclusiones generales:

Cada población anidadora tiene haplotipos distintos, y cada zona no reproductiva tiene una mezcla de haplotipos que son propios de zonas de anidación diferentes (Cuadro 2). Al igual que Bass y col. (1996), señalaron que la mayor contribución de haplotipos en las zonas de alimentación de Puerto Rico correspondía a los provenientes de zonas de anidación distantes, mientras que los haplotipos de anidación cubanos constituían la mayor contribución en las zonas no reproductivas de Cuba. Se han señalado notables diferencias en el mismo lugar de alimentación según las temporadas (Díaz–Fernández y col., 1999). Por ejemplo, la contribución de haplotipos de la población anidadora cubana en la zona no reproductiva alrededor de la Isla de Pinos pasó del 33% en primavera al 53% en otoño. También se señaló una gran variación entre diferentes años: la contribución porcentual de haplotipos de playas de anidación cubanas en las muestras de la zona de alimentación de Doce Leguas descendió del 83% en 1994 al 54% en 1996.

Los valores también variaban entre diferentes lugares no reproductivos (esto es, zonas de pesca) de un mismo país (Cuadro 2).

Cuadro 2. Contribución porcentual estimada de poblaciones Anidadoras cubanas, mexicanas, portorriqueñas y desconocidas a los agrupamientos de tortugas carey (*Eretmochelys imbricata*) en zonas no reproductivas en aguas de Cuba, México y Puerto Rico, según se deduce de la composición haplotípica del ADNmt (tomado de Díaz-Fernández y col., 1999: Cuadro 4).

MUESTRA DE ZONA	MUESTRA TAMAÑO (n)	CONTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS DE PLAYAS DE ANIDACIÓN (%)			
		Cuba	México	Puerto Rico	Desconocida
CUBA					
Sureste	44	70	7	12	11
Doce Leguas-94	23	83	4	4	9
Doce Leguas-96	13	54	15	8	23
Santa Cruz	8	63	0	38	0
Suroeste	115	46	10	30	14
Isla de Pinos-primavera	40	33	15	40	12
Isla de Pinos-otoño	75	53	7	25	15
Noreste	59	42	14	31	13
Nuevitas	17	41	12	29	18
Las Tunas	15	33	7	33	27
Cayo Romano	9	34	33	33	0
Otros	18	56	11	28	5
MÉXICO Ría Lagartos	21	0	71	5	24
PUERTO RICO Isla Mona	106	29	10	41	20

La muestra cubana se divide en tres zonas de pesca, que, a su vez, se subdividen en lugares y/o temporadas concretos; las cifras en negrilla representan resultados agrupados correspondientes a cada zona de pesca o país fuera de Cuba.

Bass (1999) advirtió de que los valores de la contribución porcentual derivados de los análisis estadísticos actuales de los estudios genéticos de la tortuga carey del Caribe debían interpretarse como indicaciones cualitativas y no como estimaciones precisas de la composición genética. Sólo se podrá llegar a conclusiones más precisas después de que se haga un inventario regional de haplotipos, se descubra la identidad hasta ahora desconocida de las poblaciones fuente de algunos de los haplotipos observados (véase el Cuadro 2), y se comprenda mejor cómo, dónde y qué poblaciones se mezclan y se separan en el tiempo y en el espacio.

Broderick y col. (1994) realizaron estudios genéticos sobre las tortugas carey de Australia, y revelaron que en las zonas no reproductivas aparecían juntas poblaciones mixtas. Okayama y col. (1999) señalaron que muestras de tortugas carey de tres áreas no reproductivas (Cuba, Puerto Rico y las Islas Yaeyama del Japón) presentaban toda una diversidad genética mucho mayor que las de cualquier zona de anidación de Indonesia o el Japón. También observaron que si bien cada población anidadora tenía haplotipos específicos, el principal haplotipo característico de la población anidadora de Puerto Rico se detectó en un individuo que fue encontrado anidando en Cuba. Esto los condujo a pensar que las hembras anidadoras tal vez no están fijas a una zona de anidación determinada, y que las poblaciones anidadoras pueden tener haplotipos de diferentes orígenes.

El análisis genético de las tortugas carey ha hecho aparecer diferencias en las estimaciones de las contribuciones de haplotipos, no sólo entre los estudios sino también respecto de años o temporadas diferentes en el mismo estudio, lo que indica que la complejidad de la composición genética de algunos agrupamientos no reproductivos de estas tortugas puede verse acrecentada

por factores tanto espaciales como temporales. Evidentemente, esos estudios "sólo recientemente han sobrepasado las etapas preliminares", y es preciso estudiar muestras más grandes, representativas de una mayor diversidad geográfica y que abarquen periodos de tiempo más extensos (Bass, 1999). Sin embargo, la comprobación general de la mezcla de poblaciones en las zonas de alimentación se repite en todos los estudios. A excepción de un animal anómalo del que informan Okayama y col. (1999), los resultados de los diferentes estudios también coinciden en que cada población anidadora tiene por lo menos un haplotipo de ADNmt distintivo.

Los resultados de los estudios genéticos son coherentes con varias otras líneas de investigación, particularmente los estudios sobre recuperaciones de animales marcados y migración. En su conjunto, muestran que cada población anidadora se debe tratar como una unidad de gestión distinta, pese al hecho de que los individuos se dispersan, migran y viven en territorios soberanos diferentes. Sin embargo, los agrupamientos de tortugas carey no reproductoras que se encuentran en una zona de alimentación determinada no constituyen unidades de gestión propiamente dichas porque están constituidos por animales procedentes de diversas poblaciones anidadoras.

La contribución de las diferentes poblaciones anidadoras presentes en una zona de alimentación determinada es susceptible de cambio según las temporadas y los años, y también hay grandes diferencias entre distintas zonas de alimentación en cuanto a la composición genética de las tortugas.

Si bien en cierto sentido esto puede ser una revelación por lo que respecta a las tortugas carey, el fenómeno general de poblaciones mixtas que habitan en la misma zona de alimentación se conoce en otras especies de tortugas marinas desde hace muchos años (Carr, 1975; Pritchard, 1976) y es también común en muchas otras especies marinas (Musick, en prensa).

#### 4.5 Variación Genética

La variación genética de una especie es la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de organismos, esta puede originarse por mutación, recombinación o flujo genético. La mutación es la fuente fundamental de diversidad en los seres vivos y es requisito necesario para que las especies evolucionen. La recombinación permite la formación de nuevos arreglos genéticos y el flujo génico que se produce por el cruzamiento de individuos procedentes de poblaciones distintas, introduce genes a las poblaciones (McNaughton y Wolf, 1984)

#### 4.6 Aspectos relevantes de la variación biológica y la transmisión de información por generaciones

Se transmite principalmente por la herencia. A partir de una secuencia de ADN se originan dos y así sucesivamente, estableciéndose un sistema generacional de transmisión vertical ilimitada de la información.

Por la expresión funcional o traducción de esa información desde el lenguaje del material genético (ADN o ARN como fuentes) al lenguaje de las proteínas (elementos versátiles que interaccionan con el medio), permitiendo un flujo horizontal de esa información que es unidireccional debido a la distinta naturaleza de los elementos que participan en la transmisión (Cerezo & Madrid, 1995). (<http://www.monografias.com/trabajos20/biologia-molecular/biologia-molecular.shtml>)

El flujo de información puede sufrir alteraciones en el sentido vertical, no puede perder la unidireccionalidad impuesta por el transcurso del tiempo pero puede sufrir mutaciones y otros cambios que representan el progreso de la evolución.

En el sentido horizontal, su expresión puede verse alterada aunque ello no suele tener repercusión en la herencia; pero sí repercuten en la herencia los cambios mencionados antes y que implican, muchas veces, el intercambio de información entre entidades que evolucionan independientemente (especies distintas).

La autoorganización y/o la selección natural imponen restricciones a la transmisión de información anárquicamente alterada mediante sistemas de control, reparación o filtrado (Cerezo & Madrid, 1995). (<http://www.monografias.com/trabajos20/biologia-molecular/biologia-molecular.shtml>)

#### 4.7 Herramientas para la Determinación de Secuencias Moleculares

##### 4.7.1 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el DNA (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables). Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariable. (<http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>)

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades, y poblaciones de distinto origen geográfico (Cerezo & Madrid, 1995), (<http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>)

Pero esta técnica tenía una limitación muy importante: no era capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra. Los avances de la tecnología del DNA

recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el DNA, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades.

#### 4.7.2 La PCR

Una PCR (reacción en cadena de la polimerasa), descrita en 1988. La PCR es una de las técnicas esenciales para la preparación de huellas dactilares, si bien no vale para elaborar marcadores por sí sola. La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del DNA molde para separar las cadenas.

Continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con su DNA molde, y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo DNA entre los dos oligonucleótidos. De aquí se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo. Hoy en día todo el proceso está completamente automatizado en un aparato llamado termociclador, y existe una batería de enzimas y condiciones que permiten polimerizar hasta 35 kpb sin errores, aunque las condiciones normales amplifican sin problemas fragmentos de 3 a 6 kpb de longitud.

#### 4.8 Características del ADNmt

También llamado cromosoma mitocondrial, es una molécula circular de DNA (gráfica No.1) de un tamaño de 16569 pares de bases (pb) (8000 veces menor que el cromosoma medio). Este tamaño de 16569 pb corresponde al primer ADN secuenciado (secuencia Cambridge) aunque existen otras variantes con un número de pares de bases que oscila entre 16559 y 16570.

En cada mitocondria existen varias copias de este ADN, de modo que el número de cromosomas mitocondriales en cada célula puede ser de varios miles.

Cuatro o cinco cromosomas mitocondriales se agrupan formando los llamados nucleoides.

El ADN mitocondrial es muy parecido al del los cromosomas bacterianos, estando formado por dos cadenas complementarias, cada una con 16569 pares de bases, pero con un peso molecular diferente: la cadena pesada H (Hevor) (peso molecular, 5.168.726 daltons) contiene muchas más Guanina que la cadena ligera L (Levor) (peso molecular, 5.060.609 daltons).

La mayor parte de la cadena H constituye el molde para la transcripción de la mayor parte de los genes, mientras que la cadena L es la cadena codificadora.

El genoma mitocondrial contiene un total de 37 genes de los cuales 13 genes que codifican para ARNs mensajeros, y por lo tanto para 13 proteínas.

Los 22 genes que codifican para 22 tARNs (ARNs de transferencia, que se representan simbólicamente como hojas de trébol) y 2 genes que codifican para dos rRNAs mitocondriales (RNAs ribosómicos).

Además de las proteínas que la mitocondria puede sintetizar por si misma, necesita importar algunas otras sintetizadas en el núcleo. De igual forma, los lípidos que forman las membranas externa e interna de la mitocondria son importados.

Las mitocondrias son organelos con forma ovalada que están presentes en el interior de las células, en número variable. Las mitocondrias son descendientes de un procarionte "independiente", sus principales características:

Compuesto por 16.6 kilo bases en vertebrados, se hereda por vía materna, no sufre recombinación, presenta múltiples copias por célula y cuenta con una alta variación entre individuos.

#### 4.9 Secuenciación del ADN

Además de identificar la localización exacta que ocupan los genes en los cromosomas, es de extrema importancia conocer cual es el orden en que se

disponen las bases (Adenina, Timina, Guanina y Citosina) en el gen. La secuenciación del ADN constituye el máximo nivel de precisión del diagnóstico directo. Se han desarrollado diferentes métodos para obtener la secuencia de nucleótidos del ADN, siendo actualmente los más utilizados el método enzimático de terminación de cadena de Sanger y, sobre todo, el método automático de secuenciación. Básicamente, para realizar la secuenciación de un segmento de ADN (que debe estar presente en gran cantidad y en forma de hélice sencilla), se realizan cuatro mezclas de reacción en tubos diferentes.

Cada mezcla contiene, además del ADN que se desea secuenciar, los 4 nucleótidos trifosfato, ADNpolimerasa, un cebador y un nucleótido didesoxi, que es el que competirá con su homólogo para incorporarse a la cadena que se está sintetizando, produciendo la terminación de esta síntesis en el momento y lugar en que se incorpore.

Por tanto, se obtienen en cada mezcla fragmentos de ADN de nueva síntesis, que son separados mediante electroforesis en geles muy finos que permiten distinguir fragmentos de ADN que se diferencian en un solo nucleótido.

A diferencia de otros métodos que utilizan marcadores radioactivos, en el método de secuenciación automática se utilizan nucleótidos marcados con fluorocromos distintos en cada mezcla. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que es posible leer al mismo tiempo los ADN de nueva síntesis producto de las cuatro mezclas de reacción.

La detección del tipo de fluorescencia correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que los fragmentos de menor tamaño que ya han sido detectados se dejan escapar del gel, aumentando por tanto el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada electroforesis y en cada secuenciación.



un gen, deducir la secuencia de aminoácidos para la síntesis de una proteína y la formación de sus [estructuras](#) secundarias (Cerezo & Madrid, 1995). (<http://www.monografias.com/trabajos20/biologia-molecular/biologia-molecular.shtml>)

#### 4.11 Glosario de Términos Genéticos

- ***ADNmt***: El ADN mitocondrial se transfiere de la madre a sus crías, y de sus crías hembras a la próxima generación. Las variantes son llamadas típicamente haplotipos, y cuando varios haplotipos están presentes entre las poblaciones, se revela la información sobre la estructura del linaje de las hembras.
- ***ADNn***: *El ADN nuclear* se hereda de ambos padres. Así, los estudios que usan los marcadores nucleares, proporcionan la información sobre el flujo de genes entre las poblaciones influenciado por hembras y machos.
- ***AscDNA***: *Las copias* nucleares únicas anónimas. Éstas son regiones de ADN nuclear únicas (es decir, transcripciones singulares) que pueden utilizarse como marcadores genéticos en las tortugas marinas debido a que los eventos de mutación han generado múltiples alelos (Karl *et al.*, 1992).
- ***Microsatélite loci***: *Son* regiones de ADN nuclear definidas por la presencia de un segmento o unidad repetitiva de ADN, cada unidad puede tener una longitud de 1-6 pares de base. Estas regiones tienen una tasa de mutación alta y generan alelos de longitudes diferentes. Pueden utilizarse como marcadores genéticos para una resolución de poblaciones a escala fina y en estudios de genealogía.
- ***Polimorfismo***: Es la digestión de un segmento de ADN (o el genoma completo del ADNmt) por enzimas de restricción que producen fragmentos de una longitud particular, dependiendo de la colocación del sitio de restricción (p. ej., la enzima *MseI* corta todos los sitios 'TTAA'). Una mutación a un sitio de restricción, impediría la digestión de la enzima y de esta manera se generarían fragmentos de longitud diferente.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Recursos Humanos

Cantidad	Descripción
10	Colectores de muestras
4	Investigadores

#### 5.1.2 De Laboratorio

Cantidad	Descripción
1	Cámara de Electroforesis EPS 301, Amersham Biociences
1	Secuenciador Molecular ABI PRISM, 310 Genetic Analyzer
2	Termociclador Gene Amp, PCR System 2700, Applied Biosystems
1	Centrífuga de vacío, Centrivap concentrator, LABCONCO.
1	Extractor, GE Motors, Industrial Systems, Mod. 5KH36KN90HX
2	Trasilluminator, FBTIV-816, Fisher Scientific.
1	EAGLE EYE II, Stratagene.
1	Video copy processor, Mitsubishi
1	Incubadora, Thermolyne, Dri-Bath, mod no.DB 28125
1	Termómetro, Serial No. 3423
1	Eppendorf Thermomixer
1	Vortex, Thermolyne, Maxi Mix Plus. Modelo No. M63215
1	Centrífuga, Eppendorf Centrifuge, 5415D
1	Balanza, Scout. OHAUS, cap. 600 x .19, Item No.sc6010
1	Horno de microondas
1	Mezclador, Vari-Mix, Thermolyne. Mod. M48725
1 c/u	Pipetas de 10, 20, 100, 200, 1000 Microlitros, RAININ
500 c/u	Puntas de 10, 20, 100, 200, 1000 Microlitros.
500 c/u	Viales de .5 y 1.5 ml.

2	Gradillas plásticas
250 gr	Agarose, Invitrogen, Cat. No. 15510-019
10 ml	Bromuro de ethidium, 10mg/ml Invitrogen, Cat. No. 15585-011
500 ml	Solución TBE 0.5X
500 ml	Solución GTE
10 ml	Solución de lisis (Biorad)
10 ml	Proteinaza K (20 Mg/ml)
10 ml	Proteinaza K (Biorad)
50 ml	Proteína de precipitación (Biorad)
10 lbs	Hielo
1000 ml	Agua destilada
500 ml	Isopropanol
250 ml	Glicógeno
500 ml	Etanol al 70%
500 ml	Etanol al 95%
20 ml	Colorante Azul
25 ml	Marcador de pares de bases
25 ml	Marcador de 100 pares de bases
10 ml	DNTP'S 10 milimolar
10 ml	HDCM1 20 milimolar
10 ml	LTCM1 20 milimolar
20 ml	Buffer 10X
15 ml	TAQ 1 U/Microlitro
20 ml	MgCl 50 Milimolar
1	QIAGEN, QIAquick, Gel Extraction Kit (250), Cat. No. 28760
1	BIO-RAD, AquaPure Genomic DNA Isolation Kit, Cat. 732-6340
10 ml	LTCM1 (6 picomoles)
15 ml	Solucion RR (Applied Biosistem), B.D.3.1
15 ml	Buffer 5X (Applied Biosistem), B.D.3.1

### 5.1.3 De Campo

Cantidad	Descripción
5 caja	Bisturí
10	Pinzas
500	Bolsas para muestras
10 gal.	Etanol al 70%
100 ml	Solucion Amortiguada Iónica
100 ml	DMSO
50 gr	NaCl
1	Moto 4x4
10	Encendedor
10	Linterna
10	Capa

### 5.1.4 De Tipo Biológico

11 biopsias de 2gr. cada una, del tejido epidérmico de 11 diferentes individuos de Tortuga Carey (*Eretmochelys Imbricata*).

### 5.1.5 Centros de Referencia

#### **Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CEMEB)**

Ubicado en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. (FMVZ- UMSNH).

Es un centro especializado en estudios de biotecnología, que realiza investigaciones desde los análisis de PCR hasta la Clonación. Esta integrado por investigadores expertos que realizan su trabajo a criterio personal bajo la política general del centro.

**Laboratorio de Análisis Geonómico, Dr. Omar Chassin N.**

Ubicado en el CMEB, realiza secuenciaciones moleculares y análisis geonómico para todo el centro, aquí se obtiene los haplotipos y resultados en archivos electrónicos. El Dr. Omar chassin es el encargado del laboratorio y de los análisis que allí se realizan.

**5.2 Métodos****5.2.1 Colecta de Muestras**

**Las muestras de tejido fueron colectadas en el parque nacional punta de Manabique durante un mes, se realizaron caminatas nocturnas durante las cuales al avistamiento de un espécimen se procedio a la toma de la biopsia.**

**5.2.2 Preservación de Muestras**

**Para su preservación se utilizaron:**

- 1. Solución DMSO, para biopsias epidérmicas**
- 2. NaCl, para biopsias epidérmicas**
- 3. Etanol al 70%, para biopsias epidérmicas**
- 4. Buffer de Extracción, para tejido sanguíneo**
- 5. Bolsas plásticas y viales de 2.5 ml. Para transportar el tejido y su medio de preservación.**

**5.2.3 Extracción del DNA****5.2.3.1 Para tejido epidérmico preservado en NaCl.**

Se tomo una porción de aproximadamente 2 milímetros de la muestra preservada y se subdividió en trozos mas pequeños, se transfirió a un vial de 1.5 ml y se le adicionaron 500 microlitros de agua destilada.

- Centrifuga a 13,000 rpm., por un minuto

- Decantar sobrenadante y repetir.

Con la muestra ya lavada se procedió al Protocolo de extracción 1 (Ver anexo)

#### **5.2.3.2 Para tejido epidérmico preservado en Etanol al 70 %**

Se tomo una porción de aproximadamente 2 milímetros de la muestra preservada y se subdividió en trozos mas pequeños, se transfirió a un vial de 1.5 ml y se le adiciono 500 microlitros de solución GTE.

- Centrifuga a 13,000 rpm., por un minuto
- Decantar sobrenadante y repetir.

Con la muestra ya lavada se procedió al Protocolo de extracción 1.(Ver anexo)

#### **5.2.3.3 Para tejido epidérmico preservado en DMSO**

Se tomo una porción de aproximadamente 2 milímetros de la muestra preservada y se subdividió en trozos mas pequeños, se transfirió a un vial de 1.5 ml y se procedió al protocolo de extracción 1.(Ver anexo)

#### **5.2.3.4 Para tejido sanguíneo en Buffer de extracción.**

Se tomaron 5 microlitos de sangre o 20 microlitros de sangre en solución amortiguadora, se transfirió un vial de 1.5 ml y se procedio al protocolo de extracción 1.(Ver anexo)

#### **5.2.4 Gel de agarosa**

Se colocaron 99 ml de solución TBE 0.5X + 3 microlitros de bromuro de ethidium + 1gr. de agarosa dentro de un beaker.

Se calentó en un horno de microondas hasta su disolución, se coloco en la cámara con los moldes para pozos y se dejo enfriar a temperatura ambiente.

#### **5.2.5 Electroforesis en placas de agarosa**

Se coloco 1 microgramo de colorante + 1 microgramo de marcador de pares de base en el primer pozo.

En los demás pozos se colocó 1 microgramo de colorante + 8 microgramos de DNA. Se calibró la cámara a 110 voltios. Por 45 minutos.

Se observó en un trasiluminador (cámara de luz UV).

### 5.2.6 PCR

#### 5.2.6.1 Concentración de reactivos:

DNTP'S	10 Milimolar
HDCM1	20 Milimolar
LTCM1	20 Milimolar
BUFFER	10X
TAQ	1 U/ microlitro
MgCl	50 Milimolar

#### 5.2.6.2 Concentraciones a utilizar:

DNTP'S	200 Micromolar
HDCM1	1 Micromolar
LTCM1	1 Micromolar
BUFFER	1 X
TAQ	2 U
MgCl	2 Micromolar
Reacción en:	25 Micromolar

#### 5.2.6.3 Cálculo de concentración:

Con la fórmula:  $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$

**En donde:**

**$C_i$  es la concentración inicial**

**$C_f$  es la concentración final**

**Vi es el volumen inicial**

**Vf es el volumen final**

**(Performing Cycle Sequencing, AB, Big Dye, Tv3.0)**

**5.2.6.4 Termociclador:**

**Para amplificación de la región control (Primer)**

Programa Alin 45. (GeneAmp, PCR System, 2700.Dr. Chassin, CMEB)

<b>Proceso</b>		<b>Características</b>
Desnaturalización Inicial		94°C por 5 minutos
45 ciclos	Desnaturalización	94°C por 30 segundos
	Alineación	45°C por 30 segundos
	Extensión	72°C por 1 minuto
Extensión Final		72°C por 7 minutos
Preservación		4°C por tiempo indefinido

**5.2.6.5 Electroforesis en Gel de Agarosa (1%)**

**Se coloco en el primer pozo 1 microlitro de colorante + 4 microlitros de marcador de 100 pares de bases moleculares.**

En los pozos siguientes se coloco 1 microlitro de colorante + 15 microlitros de DNA (producto de PCR) amplificado de su región control.

Se programo la cámara a 110 vol. Por 45 minutos.

Se observo en una cámara de trasiluminacion (cámara de luz U.V)

Se documento en el EAGLE EYE II y se guardo la imagen en formato electrónico.

**5.2.7 Purificación del DNA (producto de Amplificación) con QIAquick**

- Se secciono del gel de agarosa la porción luminiscente en el trasiluminador de luz ultravioleta, se coloco en un vial de 1.5 ml y se peso en una balanza.

- Se colocó en el vial una relación 1:3, una parte de gel para tres partes de QG.
- Se incubó a 55°C por 10 minutos/ vortex.
- En el mismo vial se colocó una relación de 1:1, una parte del peso inicial del gel para una parte de Isopropanol y se mezcló.
- Se colocó el producto del vial en una columna (Qiagen) y se centrifugó a 13,000 rpm. por 1 minuto y luego se descartó el líquido extraído.
- Se agregó a la columna 500 microlitos de QG, se centrifugó a 13,000 rpm. por 1 minuto y luego se descartó el líquido extraído.
- Se agregaron 750 microlitos de Buffer P.E., se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto y luego se descartó el líquido extraído y se centrifugará a 13,000 rpm. por 1 minuto.
- Se colocó la columna en un vial de 1.5 ml (estéril)
- Se agregaron 50 microlitos de EB, se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto y se agregaron 30 microlitos de EB., se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto y luego se descartó la columna y el producto extraído se conservó en refrigeración.
- Para su verificación se corrieron 15 microlitos del producto en una electroforesis de gel.

### **5.2.8 Reacción de secuenciación**

Reacción de secuenciación (performing Cycle Sequencing, AB, Big Dye, Tv3.0)

Calculo de concentración:

El primero se recomienda a 6 picomoles y que se encuentre a 2 milimolar, por esto se colocaron 4 microlitros de solución RR(AB) + 2 microlitros de 5X(AB) + 3 microlitros del primer + Aproximadamente 30 Ng. del DNA para obtener una Solución total en 20 microlitros.

Se colocaron en el termociclador, en el programa (Ab), BigDie 3.1

<b>Proceso</b>		<b>Características</b>
Desnaturalización Inicial		95°C por 5 minutos
25 ciclos	Desnaturalización	94°C por 30 segundos
	Alineación	50°C por 30 segundos
	Extensión	60°C por 4 minutos
Extensión Final		72°C por 1 minutos
Preservación		8°C por tiempo indefinido

### 5.2.9 Purificación del DNA (Producto de secuenciación) con Etanol

#### Se colocaron en un vial de 1.5 ml:

20 microlitros de DNA (producto de PCR, secuenciado)

16 microlitros de Agua estéril

64 microlitros de Etanol al 95%

Se mezclaron con el Vortex y se dejaron a temperatura ambiente por 15 minutos.

Se centrifugaron por 20 minutos a 13,000 rpm.

Se retiro el sobrenadante con pipeta.

Se agregaron 250 microlitros de etanol al 70% y se mezclaron con el vortex.

Se centrifugo por 10 minutos a 13,000 rpm.

Se retiro el sobrenadante con pipeta.

Se colocará en la centrífuga de vacío (Spedd Vac.) por 10 minutos

Se resuspendió en 25 microlitros de TSR

Se llevo a 95° C. por 2 minutos y se coloco en hielo

### 5.2.10 Secuenciación o electroforesis capilar

Se coloco el producto de la purificación de DNA (25 microlitros) en un vial nuevo para secuenciación, se traslado y coloco en el secuenciador ABI 310 y se programa con SeqScape versión 1.1 fc4 (Applied Biosistem), este programa

determinará el haplotipo de la muestra en una grafica de frecuencia para los cuatro pares de bases moleculares (A, G, C, T.)

#### 5.2.11 Análisis estadístico de secuencias

El análisis estadístico para este trabajo se realizo comparando datos idénticos o frecuencias idénticas de bases moleculares y luego estableciendo su similitud con otros datos o frecuencias de otro grupo de datos o frecuencias que inmediatamente se alinean y grafican en un dendograma en el que se visualizan sus diferencias.

Para la realización de la alineación de secuencias moleculares se utilizo el programa **CLUSTAL**, este es un programa de computación que utiliza algoritmos para establecer similitudes entre datos que luego ordena colocándoles valores referenciales, a los que les asigna nuevamente valores por medio de formulas algorítmicas.

De esta manera determina distancias de similitud que luego ordena en un cuadro referencial en el que se pueden asignar colores a las variable, datos o frecuencias y con estos datos realizar un dendograma en el que se visualizan las distancias entre datos o sea que tan similares o distintos son los datos analizados.

Luego estos datos fueron ingresados a otro programa de computación llamado **TreeView**, este programa grafica en diferentes modalidades los datos a manera que sean fácilmente visibles las distancias entre ellos.

En este programa se ingresan los datos de diferentes investigaciones (Genbank) para realizar análisis mas extensivos de los datos a analizar y poder establecer el parentesco de las tortugas muestreadas en punta de Manabique con las reportadas en otras investigaciones publicadas y reportadas en Genbank.

## VI RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1 Resultados de Secuencias Nucleotidicas (haplotipos)

Se extrajeron 8 secuencias de las 11 muestras procesadas y través del programa chromas se graficaron e identificaron por su numero de muestra, la especie, el país y los apellidos de los investigadores. Presentadas en formato FASTA, identificado cada nucleótido por su inicial de la siguiente forma:

**A** adenina, **G** guanina, **C** citosina, **T** timina.

>116\_Ei\_Guatemala\_Giron\_Chassin

```
GGGGGGGGGACGGAAGGGATGAATAATTTAATGTATAGACTCATTGATCA
GAGGCCTTAAAAAAGAGATGAATTACCTTTACCAATTCGATGTGCCTGA
AAAAACAACCAGAGGCCAGAATAGATCAGTTATGTACGCCATAAATTAATG
GGAGTGAACTGGTAATGTTGTATCTTACTAACAAGGGTTGCTTATTTCTC
GTGATGAGCTGAACTAAGAAATAACCCATTACTGTGACAATATTCATGTTTG
AGAATAATTACTTAATATTATGTCCTATAACCATTTTCATTCTTATT
ACCTGTATAATAGTCATGTAGTTTAAACAGTTTATGTGAAACCAATAATTTTA
TGTTTTAGGTCAGATTAATCAGCAGTACTACCGGTCATATGCTAGCGGTAA
ATAAGTAGATGTACAATAATACATAGGTAAGTGTTGCGGATATTGGTCTGC
TGGGCACGGTAGAGGATATAGGTAAGTTTATGTGTTGGCGCTTATTCTGCG
TCAAGGGATAGTTTAATTATAGGATTCCGGTTTTGGGGACCGA
```

>117\_Ei\_Guatemala\_Giron\_Chassin

```
GAGGGGGGGGGGAGGTAAATTATGTATAGAACTCATTTAATCAGAGGCCA
AAAAAAAAAAGAGATGAATTTACCTTTACCAATTCAAAAGTGCCTGAAAAA
CAACCAGAGGCCAGAATAGATCAGTTATGTACGCCATAGATTAATGGGCCT
GAACTGGTAATGTTGTATCTTACTAACAAGGATTGCTTATTTCTCGTGATG
AGCTGAACTAAGAAATAACCCATTACTGTGACGATATTCATGTTTGAGAATA
ATTACTTAATATTATGTCCTATAACCATTTTCATTCTTATTACCT
GTATAATAGTCATGTAGTTTAAACAGTTTATGTAAAACCAATAATTTTATGTT
TTAGGTCAGATTAATCAGCAGTACTACTGGTCATATGCTAGTGGTAAATAA
GTAGATGGACAATAGTACATAGGTAAGTGTTGCGGATATTGGTCTGCTGG
```

GCACGGTAGAGGATATAGGTAAGTTTATGTGTTGGCGCTTATTCTGCGTCA  
AGGGATAGTTTAATTATAGGATTCCGGTTTTGGGGACCGGACG

>118\_Ei\_Guatemala\_Giron\_Chassin

CTGGGGGGGGGGGGCGGAGGTTATAGAATTTAATGTATAGAACTCATGGG  
TCAGAGGCATAAAAAAAAAAGAGATGAATGCACTTTACCAATAAAAAATGTGC  
CTGAAAAACAACCAGAGGCCAGAATAGATCAGCTATGTACGCCATAAATT  
AATGGGCCTGAACTGGTAATGTTGTATCTTACTAACAAGGGTTGCTTATTT  
CTCGTGATGAGCTGAACTAAGAAATAACCCATTACTGTGACAATATTCATGT  
TTGAGAATAACTTAAATATTATGTCCTATACCATTTCACTTATTACCTG  
TATAATAGTCATGTTTTTAAACAGTTTATGTGAAACCAATAATTTTATGTTT  
TAGGTCAGATTAATCAGCAGTACTACCGGTCATATGCTAGCGGTAAATAAG  
TAGATGTACAATAACATAGGTAAGTGTGCGGATATTGGTCTGCTGGGC  
ACGGTAGAGGATATAGGTAAGTTTATGTGTTGGCGCTTATTCTGCGTCAAG  
GGATAGTTTAATTTATGGATCCGGTTTTGGGACTCTCTTTTGAAAAAGATT  
AGA

>119\_Ei\_Guatemala\_Giron\_Chassin

GGAAATTTAAATCGTATAGAACTCATGATCAGAGGACAAGAAAAAAAAAGA  
GATGAATGCAACTTTACCAAGAAAAAAAAATGTGCCTGAAAAACAACCAGA  
GGCCAGAATAGATCAGTTATGTACGCCATAAATTAATGGGCCTGAACTGG  
TAATGTTGTATCTTACTAACAAGGGTTGCTTATTTCTCGTGATGAGCTGAAC  
TAAGAAATAACCCATTACTGTGACAATATTCATGTTTGAGAATAACTTAA  
TATTATGTCCTATACCATTTCACTTATTACCCGTATAATA  
GTCATGTTGTTTAAACAGTTTATGTGAAACCAATAATTTTATGTTTTAGGTCA  
GATTAATCAGCAGTACTACCGGTCATATACTAGCGGTAAATAAGTAGATGA  
GCAATAACATAGGTAAGTGTGCGGATATTGGTCTGCTGGGCACGGTA  
GAGGATATAGGTAAGTTTATGTGTTGGCGCTTATTCTGCGTCAAGGGATAG  
TTTAATTATAGGATTCCGGTTTTGGGGACTC

>120\_Ei\_Guatemala\_Giron\_Chassin

AAAGAAAAATAAATTTAAAGTATAGAACTCATTTAATCAGAGGCCAAAAAA  
AAAAAGAGATGAATTTACCTTTACCAATTCGATGTGCCTGAAAAACAACCA  
GAGGCCAGAATAGATCAGTTATGTACGCCATAAATTAATGGGCCTGAACT  
GGTAATGTTGTATCTTACTAACAAGGGTTGCTTATTTCTCGTGATGAGCTGA  
ACTAAGAAATAACCCATTACTGTGACAATATTCATGTTTGAGAATAATTACT  
TAATATTATGTCCTATACCATTTATTCTTATTACCCGTATAATAGTCATGTA  
GTTTTAACAGTTTATGTGAAACCAATAATTTTATGTTTTAGGTCAGATTAATC  
AGCAGTACTACCGGTCATATGCTAGCGGTAATAAATAGATGTACAATAAT  
ACATAGGTAAGTGTTGCGGATATTGGTCTGCTGGGCACGGTAGAGGATAT  
AGGTAAGTTTATGTGTTGGCGCTTATTCTGCGTCAAGGGATAGTTTATTTAA  
GGATTCCGGATGTGGGGACCGTACCTGCAAAAA

>123\_Ei\_Guatemala\_Giron\_Chassin

AAATAAATAAAAAAAGTAAAAGAACTCATTCATCAAGGCCAAAAAAAAGAG  
GAACGAATTTACGTTATTATTTGTATAGTGCCTGAAAAGACAACCAGAGGC  
CAGAATAGATCAGGTTATGTACGCTATAAACTAAATGGGCCTGAACTGGT  
AATGTTGTATCTTACTAACAAGGGTTGCTTATTTCTCGTGAATAGCTGCTTA  
AGAAATAACCAATTACTGTGACGATATTCATGGTTGAGTATAATGGTTTAAT  
TTTATGTCCTATATCATTTCACTTTTAATCCTCTGCTTAATA  
TTCATGTTATCAAAATATTTATGTGGATTCAATAATTTTCATGTTTAGGGCCA  
AATCAACTGTTAACATTACTGGTCATATGCTAGTGGTAAATAAGTAAATGTA  
CAATAATACATAGATAGGTATTGTGGGTATTGTTCTGTTGGGCACGGCAGA  
GAATTTAGGTAGTTAGTTTGTGCGTGGACACTTTTCCTGTGTCAAAGGATA  
GTTTAATTATAAGATTTCGCGGTTTTGGGACCG

>124\_Ei\_Guatemala\_Giron\_Chassin

AGAAAGGGGGAAGGTAAAATAAACGATAGAACTCATATCAGAGGAAAAAA  
AAAAAAGAGATGATTGCATTTTACCAAAAAGAAAAAGTGCCTGAAAAAC  
AACCAGAGGCCAGAATAGATTAGTCCCTGTACGCCATAGATTAATGGGCCT  
GAACTGGTAATGTTGTATCTTACTAACAAGGATTGCTTATTTCTCGTGA

TGAGCTGAACTAAGAAATAACCCATTACTGTGACGATATTCATGTTTGAGAA  
 TAATTACTTAATATTATGTCCTATAACCATTTTCGTTCTTATTACCTGTATAATA  
 GTCATGTTTTTTTTACAGTTTATGTAAAACCAATAATTTTATGTTTTAGGTCA  
 GATTAATCAGCAGTACTACTGGTCATATGCTAGTGGTAAATAAGTAGATGT  
 ACAATAGTACATAGGTAAGTGTTGCGGATATTGGTCTGCTGGGCACGATAG  
 AGGATATAGGTAAGTTTATGTGTTGGCGTTATTCTGCGTCAGGGATAGTAG  
 ATTTATAGAGATTCCCGG

>125\_Ei\_Guatemala\_Giron\_Chassin

GGGGGGGAGAATAAATTAATGTATAGAACTCATATCAGAGGAAAAAAAAAA  
 AAAGAGATGAATGCACTTTACCAATTCAATGTGCCTGAAAAACAACCAGA  
 GGCCAGAATAGATCAGTTATGTACGCCATAGATTAATGGGCCTGAACTGG  
 TAATGTTGTATCTTACTAACAAGGATTGCTTATTTCTCGTGATGAGCTGAAC  
 TAAGAAATAACCCATTACTGTGACGATATTCATGTTTGAGAATAATTA  
 ATATTATGTCCTATAACCATTTCACTTATTACCTGTATAATA  
 GTCATGATTTTTAAACAGTTTATGTAAAACCAATAATTTTATGTTTTAGGTCA  
 GATTAATCAGCAGTACAGCTGGTCATATGCTAGTGGTAAATAAGTAGATGT  
 ACAATAGTACATAGGTAAGTGTTGCGGATATTGGTCTGCTGGGCACGGTA  
 GAGGATATAGGTAAGTTTATGTGTTGGCGCTTATTCTGCGTCAAGGGATAG  
 TTTAATTATAGGATTCAGGTTTTGGGGACCGA

## 6.2 Resultados de Dendograma

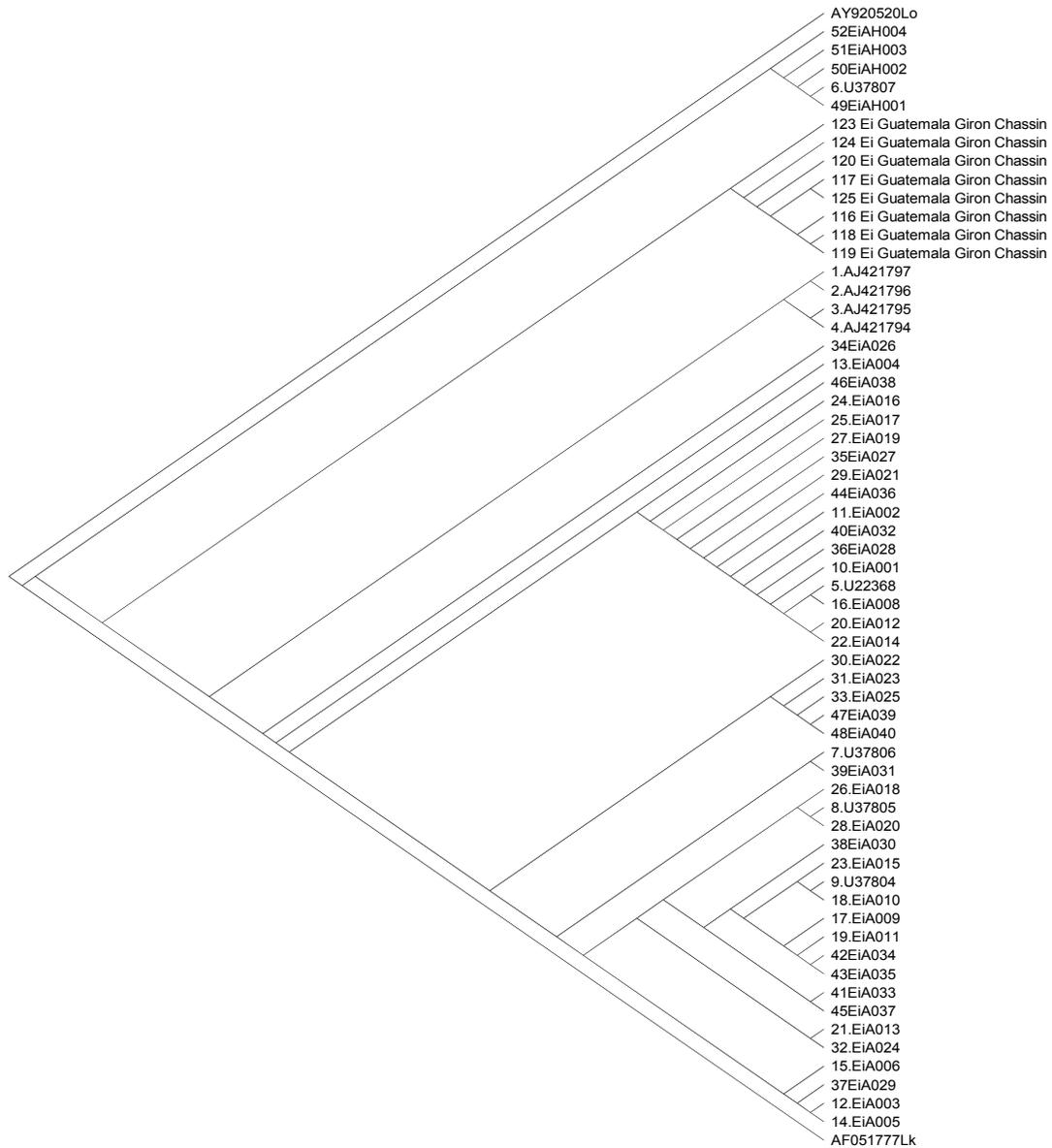
Distancias medidas por similitudes de nucleótidos en alineación resaltando en  
 negrillas el grupo control Identificados como AF051777Lk para *Lepidochelis*  
*Kempii* y AY920520Lo para *Lepidochelis olivacea*

(((('13.EiA004':0.00269,('34EiA026':0.01204,(((**AF051777Lk**:0.02606,**AY9205**  
**20Lo**:0.03264):0.03418,('52EiAH004':0.00208,('51EiAH003':0.00381,('50EiAH0  
 02':0.00248,('6.U37807':0,'49EiAH001':0):0.00013):0.0014):0.00313):0.02306):0  
 .02912,('123 Ei Guatemala Giron Chassin':0.13132,('124 Ei Guatemala Giron  
 Chassin':0.04814,('120 Ei Guatemala Giron Chassin':0.03442,('116 Ei Guate  
 mala Giron Chassin':0.03248,('118 Ei Guatemala Giron Chassin':0.02275,'119  
 Ei Guatemala Giron Chassin':0.02576):0.00226):0.00552,('117 Ei Guatemala  
 Giron Chassin':0.01084,'125 Ei Guatemala Giron

Chassin':0.01523):0.01228) :0.0042):0.0142):0.0346):0.71367):0.02908, (('1.AJ421797':0.00258,'2.AJ421796':0.0007):0.00537,('3.AJ421795':0.00358,'4.AJ421794':0.00506):0.00075):0.03511):0.01386):0.00453):0.00202,('46EiA038':0.003,('24.EiA016':0.00046,('25.EiA017':0.0009,('27.EiA019':0.00141,('35EiA027':0,('29.EiA021':0.00186,('44EiA036':0.00196,('11.EiA002':0.00196,('40EiA032':0.00196,('36EiA028':0.00195,('10.EiA001':0,('5.U22368':0,'16.EiA008':0.00261):0.00047,('20.EiA012':0,'22.EiA014':0.00341):0.00215):0.00029):0.00027):0):0):0.00011):0.00201):0.00446):0.00172):0.00216):0.00077):0.00161):0.00064,('30.EiA022':0.00161,('31.EiA023':0,('33.EiA025':0,('47EiA039':0.00031,'48EiA040':0.01162):0.00084):0.00052):0.00036):0.00121):0.00031,('7.U37806':0,'39EiA031':0.00298):0.00059):0,((('26.EiA018':0.00105,('8.U37805':0.00026,'28.EiA020':0):0.00125):0.00144,('38EiA030':0.00248,('23.EiA015':0.00236,('9.U37804':0,'18.EiA010':0.00067):0.00026):0.00053,('17.EiA009':0.00186,('19.EiA011':0,('42EiA034':0.00189,'43EiA035':0.00403):0.00014):0.00012):0.00088):0.00026):0.00054,('41EiA033':0.00102,'45EiA037':0.00095):0.00149):0.00013):0.00053,('21.EiA013':0.00208,'32.EiA024':0):0.00029):0.00021,('15.EiA006':0.00188,('37EiA029':0.00105,('12.EiA003':0,'14.EiA005':0.00289):0.00125):0.00091):0.00071);

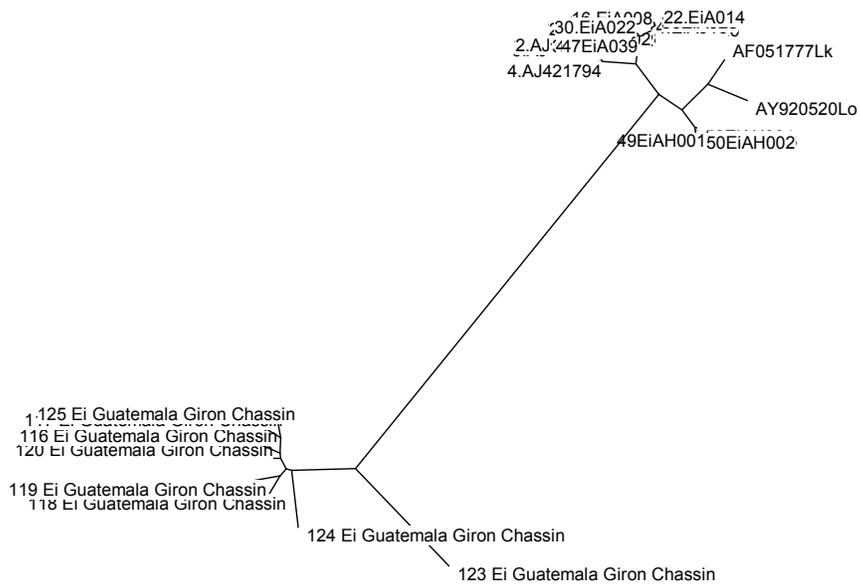
### 6.3 Dendograma Filogenético 1

En este se observa la distancia que existe entre la población de tortugas carey en Guatemala y el resto de las poblaciones publicadas.



### 6.5 Dendograma Filogenético 2

Donde se observa la relación que existe entre la población guatemalteca y las otras poblaciones publicadas, teniendo en cuenta que se muestra una relación más cercana con las reportadas para California y el golfo de México.



0.1

## 6.5 Discusión

En la interpretación de la distribución de variación genética, se usa esencialmente el análisis de una sola vía; es decir, esto se realizó mediante la comparación de los nucleótidos presentes en los diferentes haplotipos y la frecuencia con que aparecen.

Así, se observa una divergencia significativa entre la población anidadora reportada para Guatemala y las publicadas; entonces podemos inferir que el flujo de genes es bajo y que las cohortes de anidación constituyen poblaciones reproductoras aisladas. Sin embargo, la conclusión inversa no se sostiene invariablemente. Si las frecuencias de los genotipos no son significativamente diferentes entre dos áreas de anidación, entonces no podemos estar seguros que estos sitios de muestreo están unidos en una sola población reproductora distribuida al azar. Este podría ser el caso, sin embargo hay tres razones por las que no puede ser:

Primera: podría ser que a la prueba le faltó poder estadístico debido al pequeño tamaño de la muestra (Baverstock y Moritz, 1996).

Segunda: podría ser que las poblaciones sólo han divergido recientemente y las diferencias genéticas todavía no se han compilado.

Tercera: relativamente pocos migrantes (p. ej., 10 por generación o menos) son suficientes para homogeneizar las frecuencias alélicas, todavía 10 migrantes por generación tendrían un impacto insignificante sobre los procesos demográficos en la mayoría de las poblaciones anidadoras. Consecuentemente, las colonias reproductoras que son genéticamente homogéneas, todavía podrían tener la capacidad de ser demográficamente independientes.

En el dendograma realizado como resultado de esta investigación podemos observar una diferencia significativa en donde  $P = 0.0013$  nucleótidos entre las otras poblaciones y la población guatemalteca.

Así, podemos establecer que existe una relación filogenética entre las poblaciones estudiadas; entonces estas se relacionan directamente entre si, es decir las reportadas para Florida y el Golfo de México; y las de este estudio (guatemaltecas), pero evidentemente poseen independencia demográfica.

## VII CONCLUSIONES

1. Se determinó que la población de hembras anidadoras de Tortugas Carey *E. imbricata* de Guatemala pertenecen a una unidad reproductiva parcialmente aislada al resto de las poblaciones reportadas y publicadas
2. La población anidadora de Tortugas Carey *E. imbricata* de punta de manabíque presenta variación genética (haplotipos nuevos) en comparación con los reportados en GenBank para la región del gran caribe.
3. Se generó conocimiento genético que puede ser utilizado como herramienta para la conservación de la población de *E. Imbricata* en punta de Manabique.
4. Se determinó la variación genética mediante la comparación de los nucleótidos presentes en los diferentes haplotipos y la frecuencia con la que aparecen.
5. Los potenciales sitios de origen de la población de *E imbricata* de punta de Manabique por alineamiento y comparación de secuencias moleculares serían Florida y el Golfo de México.

## VIII RECOMENDACIONES

1. Continuar con las investigaciones para confirmar que la población de hembras anidadoras de Tortugas Carey *E. imbricata* de Guatemala pertenecen a una unidad reproductiva aislada al resto de las poblaciones reportadas y publicadas
2. Realizar nuevas extracciones de secuencias moleculares para confirmar la variación genética (haplotipos nuevos) en comparación con los reportados en genbank para la región del gran caribe.
3. Utilizar el nuevo conocimiento genético como herramienta para la conservación de la población de *E. Imbricata* en punta de Manabique.
4. Ampliar las investigaciones para la determinación de la variación genética mediante la comparación de los nucleótidos presentes en los nuevos haplotipos y la frecuencia con la que aparecerán en las próximas investigaciones.
5. Continuar los trabajos de investigación para confirmar los potenciales sitios de origen de la población de *E imbricata* de punta de Manabique por alineamiento y comparación de secuencias moleculares.
6. Continuar realizando dendogramas filogenéticos de la *E. imbricata* que anida en Punta de Manabique, Guatemala y comprarlos con las nuevas secuencias publicadas.

## IX RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se muestran los primeros resultados del análisis genético de la población de tortugas carey *Eretmochelys imbricata* de Guatemala, específicamente de la población que anida en punta de Manabique.

Se colectaron once muestras de tejido epidérmico de once hembras anidadoras de las cuales se obtuvieron ocho secuencias del DNA mitocondrial de la región D-Loop, estos resultados se obtuvieron de secuencias directas de PCR con el oligonucleotido Allard 1994 LTCM1 y HDCM1 que produjo fragmentos de 550 pares de bases moleculares.

Las secuencias fueron alineadas con el software de Clustal para identificar posiciones polimórficas que fueron confirmadas con el reanálisis de muestras con la ayuda de este programa, con estos haplotipos se determinó la composición de las hembras que anidan en la bahía de punta de Manabique en Guatemala con relación a las secuencias ya publicadas y se realizó el análisis de los resultados; y de esta forma se demuestra el tamaño eficaz histórico de la población basado en los valores genéticos de la diversidad.

Estos resultados se grafican en el dendograma realizado por el programa tree de esta forma se observa visualmente la distancia que existe entre las secuencias publicadas y las secuencias guatemaltecas, de esta manera práctica se determina que la población guatemalteca recibe poco flujo génico de las otras poblaciones cercanas como es el caso de Florida y el Golfo de México; y no se encuentran distancias relacionadas para Centroamérica, de esta forma se establece que la población de tortugas carey de punta de Manabique, es una unidad parcialmente aislada al resto de las poblaciones reportadas pero con ancestros comunes.

De la misma manera se establece que existe suficiente variación genética para que la población se mantenga reproductivamente activa.

## X BIBLIOGRAFÍA

- Allard MW., Miyamoto MM., Bjorndal KA., Bolten AB. Bowen BW., 1994. Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. *Copeia* 1994:34-41.
- Bass AL., Good DA., Bjorndal KA., Richardson JL., Hillis ZM., Horrocks JA., and B. W. Bowen. 1996. Testing models of female reproductive migratory behavior and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with DNAm. sequences. *Molecular Ecology*. 5: 321-328.
- Bass AL. 1999. Genetic analysis to elucidate the natural history and behavior of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Wider Caribbean: A review and re-analysis. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 195-199.
- Baverstock PR., Moritz C. 1996. Project design, p.17-27. In: D. M. Hillis, C. Moritz, y B. K. Mable (Editores), *Molecular Systematics*, Segunda Edición. Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts.
- Bjorndal KA. and Zug GR., 1995 (reprinted). Growth and age of sea turtles. In: K. A. Bjorndal (ed.). *The Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C. pp. 599-600.
- Boulon RHJr., 1994. Growth rates of wild juvenile hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata*, in St. Thomas, United States Virgin Islands. *Copeia*. 194: 811-814.
- Bowen BW. and Karl SA., 1997. Population genetics, phylogeography, and molecular evolution. In: P. L. Lutz and J. A. Musick (eds.). *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press; New York. pp. 29-50.
- Bowen BW., Avise JC., 1995. Conservation genetics of marine turtles, p.190-237. In: Avise JC., Hamrick JL. (Editores), *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York.
- Bowen BW., Kamezaki N., Limpus CJ., Hughes GR., Meylan AB., Avise JC.. 1994. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution* 48: 1820-1828.
- Broderick D., Moritz C. 1996. Hawksbill breeding and foraging populations in the Indo-Pacific region, p.119-128. In: B. W. Bowen W. N. Witzell (Editores), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NO AA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U.S. Department of Commerce.

Broderick D., Moritz C., Miller JD., Guinea M., Prince RL., Limpus CJ. 1994. Genetic studies of the hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata*: Evidence for multiple stocks in Australian waters. *Conservation Biology*. 1: 123-131.

Byles RA., Swimmer YB. 1994. Post-nesting migration of *Eretmochelys imbricata* in the Yucatán Península. In: Bjorndal KA., Bolten AB., Johnson DA., Eliazar PJ. (compilers). 1994. *Proceedings of the Fourteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. U.S. Department of Commerce; National Oceanographic and Atmospheric Administration; National Marine Fisheries Service; Southeast Fisheries Center, Miami, Florida. NMFS-SEFSC-351. p. 202.

Carr AF. 1975. The Ascension Island green turtle colony. *Copeia*. 5471975. (3). 1975 (3): 547-555.

Carrillo E., Webb GJ., Manolis SC. 1999. Hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in Cuba: An assessment of the historical harvest and its impacts. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 264-280.

Chacón D. 2004. *La tortuga carey del Caribe – Introducción a su biología y estado de conservación*. WWF -Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica.

Chaloupka MY., Limpus CJ. 1997. Robust statistical modelling of hawksbill sea turtle growth rates (southern Great Barrier Reef). *Marine Ecology Progress Series*. 146: 1-8.

Chan EH., Liew HC. 1999. Hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata*, nesting on Redang Island, Malaysia, from 1993-1997. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 326-329.

Claros Díaz, MG. 2006. Marcadores Moleculares: Que son como se obtienen y para que valen, Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la universidad de Málaga, España. (en línea) consultado 17 abril 2006. Disponible en <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>

Conceição MB., Levy JA., Marins LF., Marcovaldi MA. 1990. Electrophoretic characterization of a hybrid between *Eretmochelys imbricata* and *Caretta caretta* (Cheloniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*. B 97: 275-278. (cited in Marcovaldi et al., 1999).

Crouse DT. 1999. Population modelling and implications for Caribbean hawksbill sea turtle management. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 185-188.

Díaz del Castillo B. 1632. Historia verdadera de la conquista de la nueva España, España.

Díaz Fernández R., Okayama R., Uchiyama T., Carrillo E., Espinosa G., Márquez R., Diez C., Koiki H. 1999. Genetic sourcing for the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in the northern Caribbean region. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 296-300.

Diez CE., Van Dam RP. 1998. Mona and Monito island in the water hawksbill studies. Research report for 1997. Technical report submitted to U.S. National Marine Fishery Service and Japan Bekko Association. 22 pp. (cited in León and Diez, 1999).

Dobbs KA., Miller JD., Limpus CJ., Landry AMJr., 1999. Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, nesting at Milman Island, Northern Great Barrier Reef, Australia. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 344-361.

Dutton P. 1996. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies, p.17 -24. In: B.W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U.S. Dept. Commerce

*Eckert KL, Bjomdal KA, Abreu Grobois FA., Donnelly M. 2000. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas, UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación No. 4, 2000 (Traducción al español)*

Fitz Simmons NN., Goldizen AR., Norman JA., Moritz C., Miller JD., Limpus C. 1997. Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 94: 8912-8917.

Fitz Simmons NN., Moritz C., Moore SS. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 2:432-440.

Frazier J. 1993. Una evaluación del manejo de nidos de tortugas marinas en la Península de Yucatán. In: J. Frazier (principal ed.) *Memorias del IV Taller Regional Sobre Programas de Conservación de Tortugas Marinas en la Península de Yucatán*. Universidad Autónoma de Yucatán; Mérida. pp. 37-76.

Garduño Andrade M. 1999. Nesting of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, at Río Lagartos, Yucatán, Mexico, 1990-1997. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 281-285.

\_\_\_\_\_ : Guzmán V.; Miranda E.; Briceño Dueñas V.; Abreu Grobois FA. Increases in hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nestings in the Yucatán Peninsula, Mexico, 1977-1996: Data in support of successful conservation *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 286-295.

Giron Arana L. E., Alfaro Argueta C. E., Hernández T. R. 2004 Situación Actual de las Acciones de Conservación e Investigación en el Pacífico Guatemalteco, Guatemala, 2004. ICADS-FONACON.

Hartl DL., Clark AG. 1997. Principles of Population Genetics, Tercera Edición. Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts.

Heppell SS., Crowder LB. Priddy J. 1995. Evaluation of a fisheries model for hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) harvest in Cuba. U.S. Department of Commerce; National Oceanographic and Atmospheric Administration; National Marine Fisheries Service; Office of Protected Resources, Silver Spring, MD, NOAA Technical Memorandum, NMFS-OPR-5 48 pp.

Hillis DM., Moritz C., Mable BK. 1996. Molecular Systematics, Segunda Edición. Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts.

Hirth HF. Abdel Latif EM. 1980. A nesting colony of the hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* on Seil Ada Kebir Island, Suakin Archipelago, Sudan. *Biological Conservation* 17: 125-130.

Horrocks JA. Scott NM. 1991. Nest site location and nest success in the hawksbill *Eretmochelys imbricata* in Barbados, West Indies. *Marine Ecology Progress Series*. 69: 1-8.

Horrocks JA., Vermeer LA., Krueger B., Coyne M., Schroeder BA., Balazs GH. in press. Migration routes and destination characteristics of post-nesting hawksbill turtles satellite-tracked from Barbados, West Indies. *Chelonian Conservation and Biology*.

Instituto Químico Biológico. 2006. Diccionario ilustrado de términos médicos. (en línea) consultado 17 abril 2006. Disponible en <http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha027.htm>

Kalb H. Wibbels T. 2000. *Proceedings of the 19<sup>th</sup> Annual Symposium Sea Turtle Biology and Conservation*. U.S. Department of Commerce; National Oceanographic and Atmospheric Administration; National Marine Fisheries Service; Southeast Fisheries Center, Miami, Florida, NOAA Technical Memorandum, NMFS-SEFSC-443. xviii + 291 pp.

- Karl SA. 1996. Hybridization and taxonomy of marine turtles: anonymous nuclear DNA sequence analyses, p.99-108. *In*: B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U.S. Dept. Commerce.
- Kerr R., Richardson JI., Richardson TH. 1999. Estimating the annual size of hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) nesting populations from mark-recapture studies: the use of long-term data to provide statistics for optimizing survey effort. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 251-256.
- León YM., Diez CE. 1999. Population structure of hawksbill turtles on a foraging ground in the Dominican Republic. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 230-236.
- Limpus CJ. 1992. The hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in Queensland: Population structure within a southern Great Barrier Reef feeding ground. *Wildlife Research*. 19: 489-506.
- Lutz PL., Musick JA. 1997. *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, New York. 432 pp.
- Marcovaldi MA., Filippini A. 1991. Transatlantic movement by a juvenile hawksbill turtle. *Marine Turtle Newsletter*. 52: 3.
- Marcovaldi MA., Vieitas CF., Godfrey MH. 1999. Nesting and conservation management of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in northern Bahia, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 301-307.
- Meylan AB. 1988. Spongivory in hawksbill turtles: a diet of glass. *Science*. 249: 393-395.
- Meylan AB. 1999. International movements of immature and adult hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean region. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 189-194.
- Meylan AB. 1999. Status of the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean region. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 177-184.
- Meylan AB. Donnelly M. 1999. Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as Critically Endangered on the 1996 *IUCN Red List of Threatened Animals*. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 200-224.
- Miller JD., Dobbs KA., Limpus CJ., Mattocks N., Landry AM. 1998. Long-distance migrations by the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, from north-eastern Australia. *Wildlife Research*. 25: 89-95.

- Moncada F., Carrillo E., Saenz A., Nodarse G. 1999. Reproduction and nesting of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in the Cuban Archipelago. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 257-263.
- Mortimer JA. 2000. Conservation of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Republic of Seychelles. In: N. Pilcher and G. Ismail (eds.) *Sea Turtles of the Indo-Pacific: Research, Conservation and Management*. ASEAN Academic Press; London. pp. 176-185.
- Mortimer JA., Bresson R. 1999. Temporal distribution and periodicity in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting at Cousin Island, Republic of Seychelles, 1971-1997. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 318-325.
- Norman JA., Moritz C. Limpus CJ. 1994. Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Molecular Ecology* 3:363-373.
- Okayama T., Díaz Fernández R., Baba Y., Halim M., Abe O., Azeno N., Koike H. 1999. Genetic diversity of the hawksbill turtle in the Indo-Pacific and Caribbean regions. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 362-367.
- Parmenter CJ. 1983. Reproductive migrations in the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Copeia*. 1983: 271-273.
- Pilcher NJ. 1999. The hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in the Arabian Gulf. *Conservation and Biology*. 3 (2): 312-317.
- Pilcher NJ. Ali L. 1999. Reproductive biology of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in Sabah, Malaysia. *Conservation and Biology*. 3 (2): 30-336.
- Rhodin A. GJ., Pritchard PC. The hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*. *Chelonian Conservation and Biology*. (Special Issue). 3 (2): 169-386.
- Richardson JI., Bell R., Richardson TH. Population ecology and demographic implications drawn from an 11-year study of nesting hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata*, at Jumbay Bay, Long Island, Antigua, West Indies. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 244-250.
- Sanches TM., Bellini C. 1999. Juvenile *Eretmochelys imbricata* and *Chelonia mydas* in the Archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 308-311.
- Stancyk SE. 1982. Non-human predators of sea turtles and their control. In: K. A. Bjorndal (ed.). *The Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C. (reprinted in 1995). pp. 139-152.

Starbird CH., Hillis Starr Z., Harvey JT., Eckert SA. 1999. Internesting movements and behavior of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) around Buck Island Reef National Monument, St. Croix, U. S. Virgin Islands. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 237-243.

Suganuma H., Yusuf A., Tanaka S., Kamezaki N. 2000. Serious declines of nesting populations of the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Java Sea, Indonesia. In: N. Pilcher and G. Ismail (eds.) *Sea Turtles of the Indo-Pacific: Research, Conservation and Management*. ASEAN Academic Press; London. pp. 116-118.

Suganuma H., Kamezaki N., Yusuf A. 1999. Current status of nesting populations of the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Java Sea, Indonesia. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 337-343.

Thurston J. 1976. Observations on the ecology of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, on Mona Island, Puerto Rico. In: *Proceedings of the Association of Island Marine Laboratories, Caribbean Eleventh Meeting, 2-5 May 1975, St. Croix, U.S.V.I.* p. 30. (cited in Starbird et al., 1999).

Van Dam RP. 1997. Ecology of hawksbill turtles on feeding grounds at Mona and Monito Islands, Puerto Rico. Ph.D. dissertation submitted to the University of Amsterdam; Amsterdam, Netherlands.

Van Dam RP., Diez CE. 1998. Home range of immature hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) at two Caribbean islands. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 220: 14-24.

Van Dam RP., Diez CE.. 1999. Differential tag retention in Caribbean hawksbill turtles. *Chelonian Conservation and Biology*. 3 (2): 225-229.

Witzell W. 1980. Growth of captive hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata*, in Western Samoa. *Bulletin of Marine Science*. 30(4): 909-912.

Witzell WN. 1983. Synopsis of biological data on the hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766). FAO Fisheries Synopsis 137: 1-78.

## **XI ANEXOS**

## Protocolo General para Haplotipos

### 1. Extracción del DNA

- 1.1
  - a.) Lavado
  - b.) Incubar
  - c.) Extracción
  - d.) Rehidratación del DNA
- 1.2 Gel de agarosa al 1%
- 1.3 Electroforéisi en Gel.

### 2. PCR. (amplificación)

- 2.1 Cálculo de concentraciones
- 2.2 Termociclado (alin 45)
- 1.3 Electroforéisi en Gel.

### 3. Purificación de productos de PCR.

- 3.1 Cálculo de concentraciones
- 3.2
  - a.) Ligar
  - b.) Lavar
  - c.) Diluir
- 3.3 Electroforesis en Gel

### 4. Reacción de Secuencia

- 4.1 Cálculo de concentraciones
- 4.2 Termociclado (big Die 3.1)
- 4.3 Purificación con etanol
- 4.4 Electroforésis en capilar.

## Protocolo 1

### Extracción de DNA (Dr. Chassin O.)

1. 300 microlitros de Buffer de extracción + 10 microlitros de Proteinasa K (10mg/ml)
2. Incubar a 60° C. por una hora
3. Adicionar 150 microlitros de acetato de amonio 7.5 molar
4. Refrigerar a -70° C. por 20 minutos
5. Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos
  
6. ----- Transferir sobrenadante a un vial nuevo de 1.5 ml.-----
  
7. Adicionar 1ml. De etanol frío al 95%
8. Refrigerar a -70° C. por 20 minutos
9. Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos
  
10. Decantar
11. agregar 600 microlitros de etanol frío al 70%
12. Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos
  
13. Decantar
14. Secar en speed vac. a 60° C. por 10 minutos
15. Resuspender en 50 microlitros de agua destilada

## Protocolo 2

### Extracción de DNA (Dr. Chassin/Biorad.)

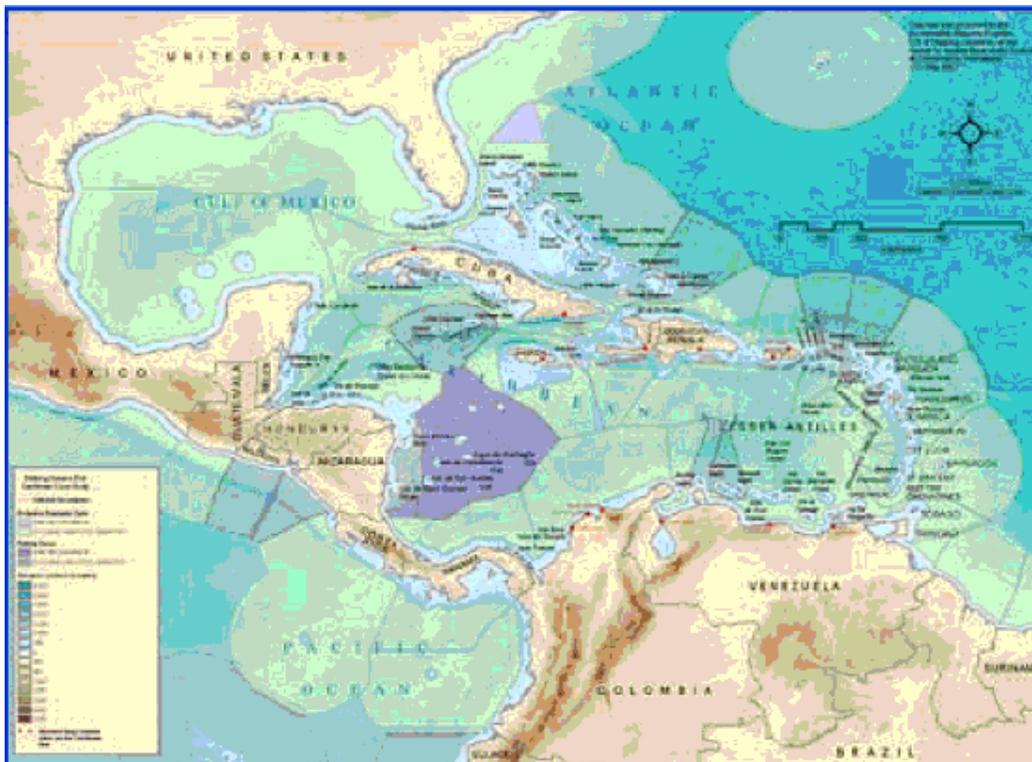
1. 300 microlitros de solución de lisis (Biorad)
2. 5 microlitros de Proteinasa K
3. Incubar por 12 horas a 55° C
  
4. Adicionar 100 microlitros de proteína de precipitación (Biorad)
5. Mezclar (Vortex) por 20 segundos.
6. Colocar en hielo por 5 minutos
7. Centrifugar a 13,000 rpm. por 5 minutos
  
8. -----Pasar sobrenadante a nuevo vial.-----
  
9. Adicionar 300 microlitros de Isopropanol
10. Adicionar 1.5 microlitros de Glicógeno
11. Mezclar (invirtiendo el vial) 50 veces
12. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto
  
13. Decantar
14. Adicionar 300 microlitros de etanol al 70% frío
15. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto
  
16. Decantar
17. Secar en speed vac. a 60° C. por 10 minutos
18. Resuspender en 75 microlitros de solución hidratante. (Biorad)

**Figura 1.** Sitios conocidos de anidación de la tortuga carey en el Caribe.



Fuente: Chacón, D. 2004. *La tortuga carey del Caribe – Introducción a su biología y estado de conservación*. WWF -Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica.

**Figura 2.** Mapa de las fronteras marítimas en el Caribe.



Fuente: Chacón, D. 2004. *La tortuga carey del Caribe – Introducción a su biología y estado de conservación*. WWF -Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica.

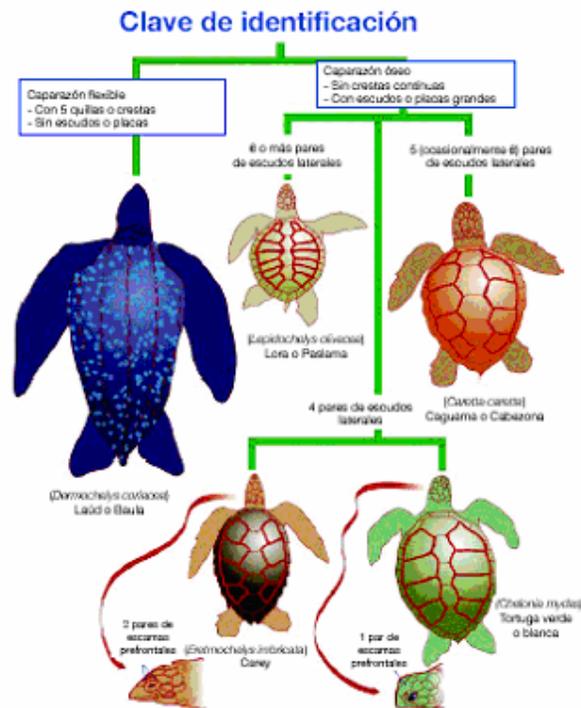
**Cuadro 3.** Meses de anidación de la tortuga carey en el mar Caribe.

<b>Países/Meses</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>J</b>	<b>J</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>O</b>	<b>N</b>	<b>D</b>
Anguila												
Antigua y Barbuda												
Aruba												
Bahamas												
Barbados												
Belize												
Bermuda												
Bonaire												
Caimán												
Colombia												
Costa Rica												
Cuba												
Dominica												
Estados Unidos												
Guadalupe												
Guatemala												
Haití												
Honduras												
Islas Vírgenes (UK)												
Islas Vírgenes (US)												
Jamaica												
Martinica												
México												
Montserrat												
Nicaragua												
Países Bajos												
Panamá												
Puerto Rico												
Reino Unido												
República Dominicana												
San Kitts y Nevis												
San Vicente y las Granadinas												
Santa Lucía												
Surinam												
Trinidad y Tobago												
Turks y Caicos												
Venezuela												

\* Este cuadro se construyó con la información aportada por: I. Alvéndas, W. Kratz, M. Aronne, C. Ordóñez, Y. León, C. Lagoeux, C. Campbell, W. McCoy, H. Guada, M. Garduño, V. Guzmán, J. Gumbis, J. Horrocks, P. Mason y E. Delroix. Además de Godley et al (2004).

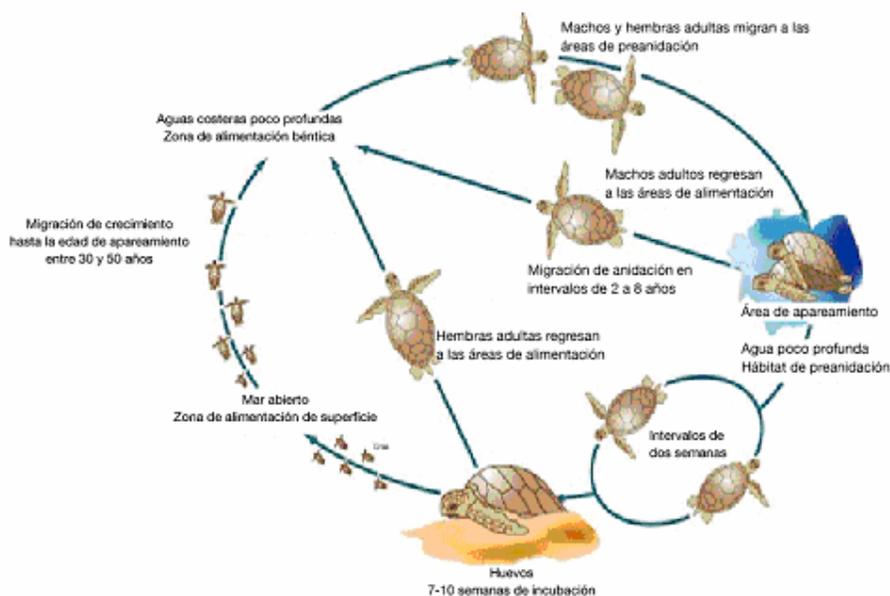
Fuente: Chacón, D. 2004. *La tortuga carey del Caribe – Introducción a su biología y estado de conservación*. WWF -Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica.

**Figura 3.** Clave para la identificación de la tortuga carey en Centroamérica



Fuente: Chacón, D. 2004. *La tortuga carey del Caribe – Introducción a su biología y estado de conservación*. WWF -Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica.

**Figura 4.** Ciclo de vida genético para la tortuga carey, basado en Miller (1997) y Cachón (2002)



Fuente: Chacón, D. 2004. *La tortuga carey del Caribe – Introducción a su biología y estado de conservación*. WWF -Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica.

**Figura 5.** Rutas de migración establecidas por transmisiones satelitales.



Fuente: Chacón, D. 2004. *La tortuga carey del Caribe – Introducción a su biología y estado de conservación*. WWF -Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica.

**Figura 6.** Datos de anidaciones en Guatemala.

**Guatemala.** Los reconocimientos efectuados durante doce semanas del año 2000 en los 10 km de playas de anidación en la península Manabique, cerca de Jalca, permitieron documentar 34 nidos. En 2001 se ampliaron los reconocimientos a 12 km y 14 semanas y se registraron 22 nidos (Meylan, 2001).

---

Fuente: Chacón, D. 2004. *La tortuga carey del Caribe – Introducción a su biología y estado de conservación*. WWF -Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica.

-----  
**Br. LUIS EDUARDO GIRON ARANA**  
Tesista

-----  
**Dr. M.V. CARLOS EFRAIN ALFARO ARGUETA**  
Asesor de Tesis

-----  
**Biol. Msc. MARIO ROBERTO JOLON MORALES**  
Asesor de Tesis

-----  
**Dr. MV. GUSTAVO TARACENA**  
Asesor de Tesis

**IMPRIMASE**

-----  
**Lic. Zoot. MARCO VINICIO DE LA ROSA**  
Decano