



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE BIOLOGÍA



---

---

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**Frecuencia de paternidad múltiple y efecto paterno en  
*Lepidochelys olivacea* de Maruata, Michoacán.**

**Tesis que presenta**

BIOL. DAISY JANET PALACIOS MARTÍNEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción en

ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN

Tutor

D. en C. OMAR CHASSIN-NORIA

MORELIA, MICHOACÁN, MARZO DE 2012.





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
*Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas*

---

DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES  
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "FRECUENCIA DE PATERNIDAD MÚLTIPLE Y EFECTO PATERNO EN *Lepidochelys olivácea* DE MARUATA, MICHOACÁN" presentado por la BIOL. DAISY JANET PALACIOS MARTINEZ, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Morelia, Michoacán, a 16 de enero de 2012

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Omar Chassin Noria

Dr. Horacio Cano Camacho

Dr. Luis Felipe Mendoza Cuenca

Dra. Deneb García Ávila

Dr. Ulises Aguilera Reyes

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACyT por el apoyo económico N. de becario 226624.

A CONACyT ciencia básica por el apoyo al proyecto ECOLOGÍA MOLECULAR DE TORTUGAS MARINAS: SISTEMA DE APAREAMIENTO Y GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN, 79857CB-2007-01.

Al Dr. Omar Chassin-Noria por confiar en mí y guiarme en este proceso. Sus enseñanzas permitieron mi crecimiento académico y personal.

A los Drs. Horacio Cano-Camacho, Deneb García Ávila, Luis Felipe Mendoza Cuenca y Ulises Aguilera Reyes por sus valiosos comentarios que enriquecieron este escrito y por su comprensión y apoyo académico y moral en este proceso.

A la comunidad de MARUATA, por permitirme trabajar, aprender y convivir con gente linda y honesta.

A los profesores que en algún momento compartieron su conocimiento conmigo.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, el tiempo fue más amable gracias a su compañía.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
CAPÍTULO 1.....	5
FRECUENCIA DE PATERNIDAD MÚLTIPLE Y ADECUACIÓN EN CRÍAS DE <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Clasificación y descripción de <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	5
1.2 Sistema de apareamiento de <i>Lepidochelys olivacea</i> .....	8
1.3 Anatomía del sistema genitourinario de la hembra.....	8
1.4 Análisis moleculares de Paternidad Múltiple.....	10
1.5 Estimadores de adecuación.....	13
2. HIPÓTESIS.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODO.....	16
4.1 Colecta de muestras.....	16
4.2 Estimadores de adecuación de las crías.....	17
4.3 Extracción de ADN y amplificación de 4 <i>loci</i> de microsatélites.....	18
4.4 Frecuencias alélicas de hembras y crías.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1 Extracción de ADN y PCR de 4 <i>loci</i> de microsatélite.....	21
5.2 Distribución de las frecuencias alélicas en hembras.....	22
5.3 Estimadores de adecuación.....	26
5.3.1 Estimadores de adecuación de hembras.....	26
5.3.2 Estimadores de adecuación de crías.....	27
6. DISCUSIÓN.....	32
6.1 Patrón de fertilización y paternidad múltiple.....	32

6.2 Estimadores de adecuación en hembras.....	35
6.3 Estimadores de adecuación en crías.....	35
7. CONCLUSIONES.....	37
8. REFERENCIAS.....	38
9. ANEXO I.....	43
 CAPÍTULO II.....	 51
 ANÁLISIS DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA EN CRÍAS DE	
<i>Lepidochelys olivacea</i> .....	51
1. INTRODUCCIÓN.....	51
1.1 Escudos supernumerarios.....	51
1.2 Morfometría geométrica.....	53
2. HIPÓTESIS.....	54
3. OBJETIVOS.....	54
4. MATERIALES Y MÉTODO.....	55
4.1 Trabajo de campo.....	55
4.2 Escudos supernumerarios.....	56
4.3 Morfometría geométrica.....	57
5. RESULTADOS.....	60
5.1 Escudos supernumerarios.....	60
5.2 Morfometría geométrica.....	60
6. DISCUSIÓN.....	64
6.1 Escudos supernumerarios.....	64
6.2 Morfometría geométrica.....	65
7. CONCLUSIONES.....	67
8. REFERENCIAS.....	68

## RESUMEN

Los análisis de paternidad múltiple describen un parámetro de la biología reproductiva y la conducta sexual de las especies, y son particularmente importantes en las que se encuentran en peligro de extinción, como es el caso de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

Se ha descrito que el sistema de apareamiento genético de las tortugas marinas es poliándrico, es decir, una hembra se aparea con más de un macho durante una temporada de apareamiento. Se ha sugerido que esta característica puede afectar directamente la adecuación promedio de los individuos. Es decir, que en una población con un sistema de apareamiento monándrico los valores de adecuación de los individuos serían menores que los de individuos con un sistema de apareamiento polígamo.

En este estudio se realizó un análisis de la frecuencia de paternidad múltiple y su relación con características relacionadas con la adecuación de las hembras y crías. Se analizó la paternidad de 329 crías de ocho nidos con cuatro *loci* de microsatélites: Or1, Or2, Or7 y Or8. Se obtuvo una probabilidad de exclusión de 0.99. Se encontró que en seis de los nidos la paternidad se atribuyó a tres padres distintos, en uno a dos padres y otro a cuatro padres. Se encontraron efectos negativos del incremento de la paternidad en algunos de los estimadores indirectos de adecuación de las crías, como son el peso, vigor y la relación entre peso/número de crías por nido.

Respecto a la adecuación de las hembras en relación con la frecuencia de paternidad múltiple, se encontró una relación positiva entre el porcentaje de eclosión y la LCC (Longitud curva del caparazón) de la hembra con el número de machos que fertilizan un nido.

El análisis de morfometría geométrica del caparazón de las crías de 15 nidos de *Lepidochelys olivacea*, indicó que si existen diferencias significativas en la forma del caparazón de las crías entre nidos. El modelo de gradilla de deformación mostró que ocurre una deformación del caparazón de las crías es en forma de una constricción alrededor de la región media que podría estar afectando la sobrevivencia y reproducción de los individuos. Así mismo se encontró asociación entre la morfometría del caparazón de las crías con un genotipo paterno en particular.

## SUMMARY

The analyses of multiple paternity describe to a parameter of reproductive biology and the sexual conduct of the species, and are particularly important in which they are in extinction danger, as it is the case of the marine turtle *Lepidochelys olivacea*. It has been described that the system of genetic mating of the marine turtles is poliándrico, that is to say, a female mates with more of a male during one season of mating. This characteristic has been suggested can affect directly the adjustment average of the individuals. That is to say, that in a population with a system of monandrico mating the values of adjustment of the individuals would be minors who those of individuals with a mating system polígamo. In this study it was realised an analysis of the frequency of multiple paternity and their relation with characteristics related to the adjustment of the females and young.

The paternity of 329 young of eight nests with four was analyzed *loci* of microsatellites: Or1, Or2, Or7 and Or8. A probability of 0.99 exclusion was obtained. One was that in six of the nests the paternity was attributed to three different parents, in one to two parents and another one to four parents. Were negative effects of the increase of the paternity in some of the indirect estimators of adjustment of the young, as they are the weight, vigor and the relation enters weight/number of young by nest. With respect to the adjustment of the females in relation to the frequency of multiple paternity, was a positive relation between the percentage of appearance and the leaded chip carrier (curved length of the shell) of the female with the number of males who fertilize a nest.

The analysis of geometric morfometría of the shell of the young of 15 nests of *Lepidochelys olivacea*, indicated that if exists significant differences in the form of the shell of the young between nests. The model of gradilla of deformation showed that it happens a deformation of the shell of the young is in the form of a constriction around the average region that could be affecting the survival and reproduction of the individuals. Also was association between the morfometría of the shell of the young with a paternal genotype in particular.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Existen siete especies de tortugas marinas agrupadas en dos familias y seis géneros: 1) la familia Dermochelyidae (de caparazón blando con textura de cuero), representada sólo por la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) habita hacia aguas frías, incluso polares; 2) la familia Cheloniidae (de caparazón duro), representada por seis especies; la tortuga aplanada o franca oriental (*Natator depressus*) endémica de Australia, la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) concentrada principalmente en el Golfo de México y la costa oriental de Estados Unidos, la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), la tortuga verde (*Chelonia mydas*), la tortuga caguama (*Caretta caretta*) y la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*) que presenta una distribución tropical. Se ha reportado que seis especies de tortugas marinas: *Lepidochelys olivacea*, *L. kempii*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Dermochelys coriacea* y *Caretta caretta*, son consideradas como especies amenazadas o en peligro de extinción (NOM-059-ECOL-2010, CITES 2008).

Para hacer planes de conservación efectivos, es importante considerar la diversidad en sus tres niveles jerárquicos: genes, especies y ecosistemas. Particularmente, cuando se trata de especies en peligro de extinción como es el caso de las tortugas marinas, es importante considerar tanto parámetros demográficos como aspectos de biología reproductiva que afectan la diversidad genética, como la frecuencia de paternidad múltiple (PM).

El presente proyecto se divide en dos capítulos, en el primero se analizó la frecuencia de PM en la población de *L. olivacea* de Maruata, Municipio de Aquila en la Costa Michoacana en donde se presenta la anidación de hembras en solitario (Proceso de anidación en el que una baja concentración de hembras desovan en un periodo espacial y temporal corto). Se evaluó: 1) El impacto de la paternidad múltiple sobre la adecuación de las hembras (tamaño de la nidada, porcentaje de sobrevivencia y eclosión), 2) El impacto de la paternidad múltiple sobre estimadores indirectos de adecuación de las crías (peso, vigor y simetría), de hermanos completos y medios hermanos, 3) El patrón de fertilización de los nidos en los que se conservó el orden de postura.

El segundo capítulo comprende los análisis de: 1) Morfometría geométrica del caparazón de las crías como estimador indirecto de su adecuación y 2) Frecuencia de simetría y asimetría de los escudos supernumerarios de las crías y de las hembras.

## CAPÍTULO 1

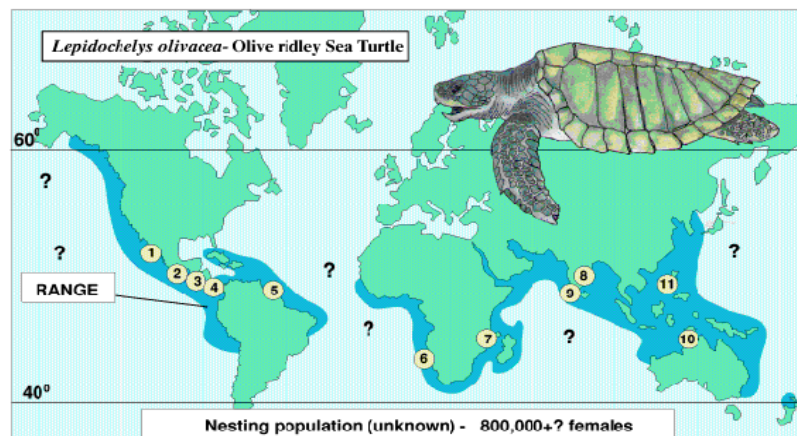
### FRECUENCIA DE PATERNIDAD MÚLTIPLE Y ADECUACIÓN EN CRÍAS DE

#### *Lepidochelys olivacea*.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Clasificación y descripción de *Lepidochelys olivacea*

De las siete especies de tortugas marinas, seis anidan en las costas mexicanas, en la costa del estado de Michoacán anidan la tortuga verde (*Chelonia mydas*), la tortuga golfina (*L. olivacea*) (Figura 1) y la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*). La especie del presente estudio pertenece al Reino Animalia; Phylum Chordata; Subphylum Vertebrata; Clase Reptilia; Subclase Anápsida; Orden Testudinata; Suborden Cryptodira; Superfamilia Chelonioidea; Familia Cheloniidae; Subfamilia Carettinae; Género *Lepidochelys*; Especie *Lepidochelys olivacea*. Se conocen diversos nombres comunes de esta especie como: golfina, frijolilla, carpintera, parlama, mulato, oliva, manila y olive ridley.



**Figura 1.** Distribución y sitios de anidación de baja y alta densidad de *Lepidochelys olivacea* (www.euroturtle.org). Los círculos numerados representan las playas de anidación. Se desconoce el flujo genético entre las poblaciones más lejanas (representado por los signos de interrogación).

Se ha descrito, en un patrón general, la migración de las áreas de forrajeo a las de apareamiento. Se sabe que después del apareamiento los machos regresan a las zonas de forrajeo y las hembras se dirigen a los sitios de anidación. Después de ovopositar las hembras retornan hacia las áreas de forrajeo para el siguiente periodo reproductivo (Figura 2). Como consecuencia de sus requerimientos alimenticios se distribuyen a través de la región circumtropical y subtropical (Lutz y Musick 1997).

Se ha descrito que la edad promedio en la cual desovan por primera vez es entre los 11 y 16 años. Esto se comprobó con estudios de laparoscopia donde se observó la maduración en los ovarios y los cambios en oviducto de las hembras y la maduración en los testículos y el epidídimo de los machos. Los sitios y las condiciones en las que anidan (profundidad de la costa y mareas altas) son muy similares en las siete especies. Predominantemente desovan durante los meses más cálidos aunque existen sitios en los que ocurre durante todo el año (Lutz y Musick 1997).

*L. olivacea* es la especie de tortuga marina más pequeña que existe actualmente, se distribuye en el Océano Pacífico y en el Atlántico sur (Figura 2). Las crías al eclosionar son de color marrón-grisáceo y los individuos adultos son de color gris oscuro. Los adultos pesan entre 38 y 100 kg., miden de 51 a 70 cm LRC (Largo Recto del Caparazón) con un promedio de 67 cm. Las crías presentan una longitud promedio de 42 mm y pesan de 16 a 19 gr. (Wyneken 2004).

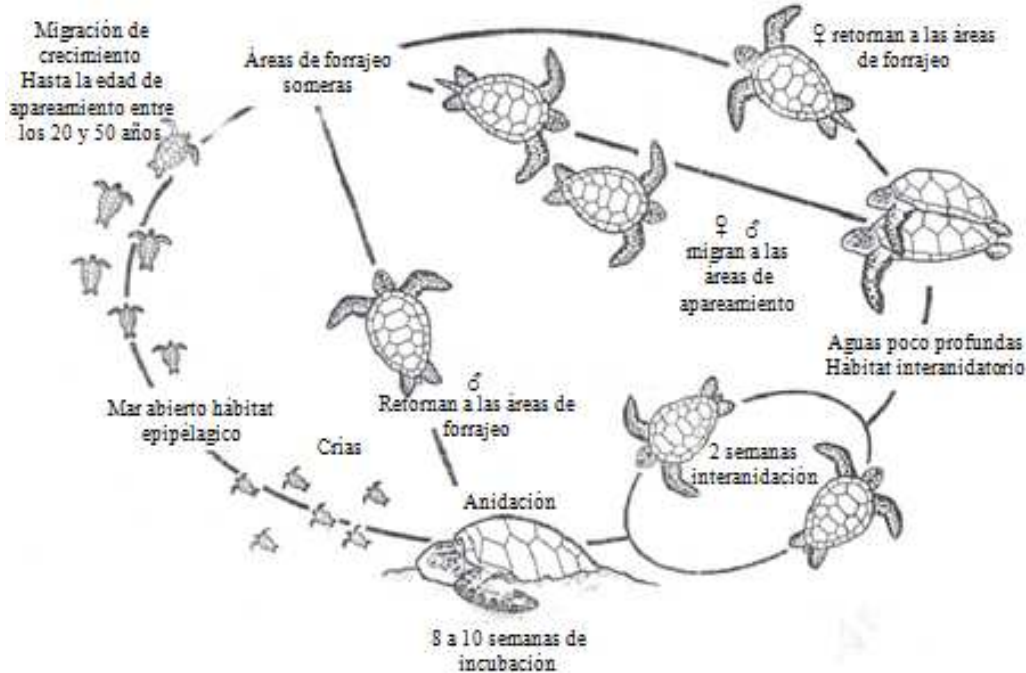


Figura 2. Ciclo de vida de *Lepidochelys olivacea* (tomado de Lutz y Musick 1997).

El caparazón en los adultos es de color verde olivo, cuando son crías la coloración dorsal y ventral es de color gris oscuro. A medida que los individuos crecen y los escudos marginales se ensanchan, el caparazón llega a parecer casi redondo. Típicamente presentan más de seis pares de escudos laterales o costales normalmente alineados, seis o más escudos vertebrales de igual forma alineados y presentan numerosos escudos marginales (Wyneken 2004).

Depositán de 40 a 130 huevos por nido. El tiempo de incubación es de 45 a 55 días. En las diferentes etapas del desarrollo presentan una tasa de mortalidad alta (Marquez 1996). El periodo interanidatorio es de dos semanas aproximadamente en hembras con anidación en solitario y para las de anidación en arribada es de 17 a 45 días en promedio. Las hembras pueden ovopositar hasta en tres ocasiones durante una temporada de apareamiento dependiendo de la modalidad de anidación. En solitario el promedio es de dos nidos por temporada y de 2.2 nidos de hembras con anidación en arribada (Lutz y Musick 1997).

## 1.2 Sistema de apareamiento de *Lepidochelys olivacea*

Se ha reportado que en las siete especies de tortugas marinas: *Lepidochelys olivacea*, *Lepidochelys kempii*, *Chelonia mydas*, *Dermochelys coriacea*, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata* (Joseph y Shaw 2011) y *Natator depressus* se presenta un sistema de apareamiento poliándrico (la hembra copula con más de un macho en un temporada de apareamiento) (Karl 2008). En este sistema los machos no defienden un territorio y carecen de cuidado parental. Para las hembras este sistema se asocia con algunos costos, como daño físico por parte de los machos durante la época de apareamiento, incremento en el riesgo de la adquisición de enfermedades o parásitos de transmisión sexual, interrupción del forrajeo, inversión de tiempo y energía que aumenta el riesgo de depredación (Jensen *et al.* 2006).

Aunque se ha reportado la existencia de poliandria en la fase de cortejo y apareamiento de *L. olivacea* y que esto puede suponer la existencia de algún sistema de almacenamiento de semen en el oviducto (Gist y Congdon 1998) lo cual facilitaría la existencia de PM. Conductualmente se ha observado que en algunas especies de tortuga marina a pesar de presentar poliandria, al realizar análisis genéticos el sistema de fertilización es monogámico. Esto es consistente con lo reportado por FitzSimmons (1998) describió que a pesar de observar un comportamiento etológico poliándrico en *Chelonia mydas*, solo en 2 de 22 nidos se presentó PM.

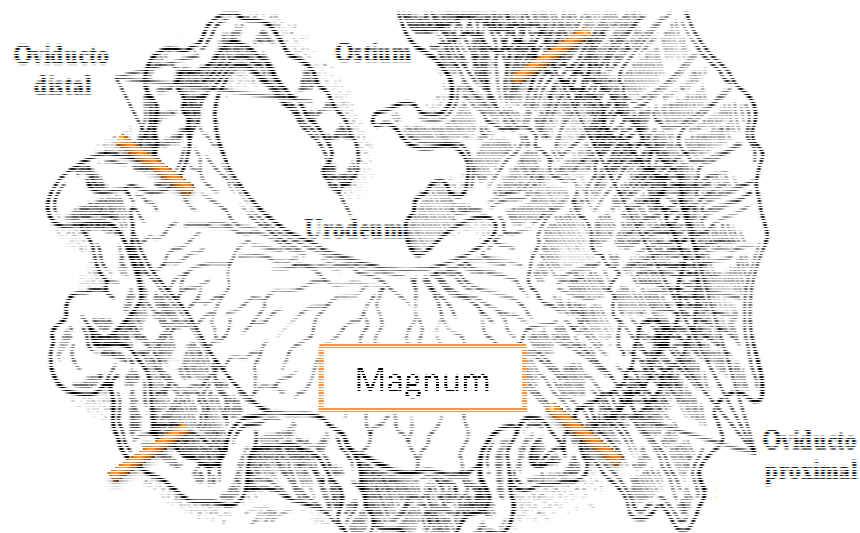
## 1.3 Anatomía del sistema genitourinario de la hembra

El oviducto de las tortugas marinas es un tubo de paredes delgadas. A medida que las hembras maduran las paredes se vuelven más gruesas y el lumen aumenta su diámetro. El oviducto se puede describir funcionalmente (pero no estructuralmente), en 5 regiones (Figura 3): ostium ó infundíbulo, segmento no glandular, mágnun, glándula de calcificación y vagina. El ostium tiene paredes delgadas a lo largo de la vida del organismo, pero crece en tamaño. El oviducto de las hembras maduras es musculoso y móvil (Wyneken 2004).

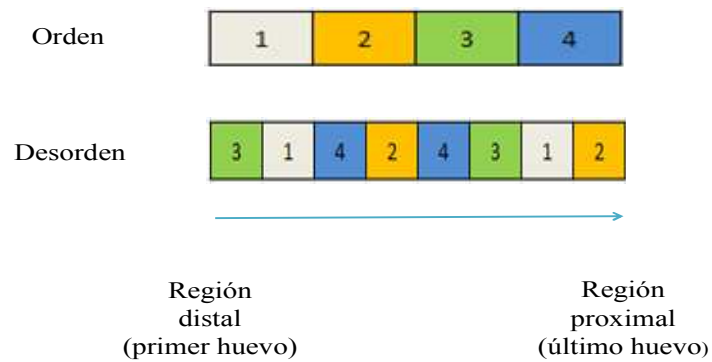
Previo a la anidación, un grupo de óvulos que constituirán a un nido completo madura y son ovulados en conjunto. El ostium migra a lo largo de la superficie del ovario, colectando folículos ovulados. Los óvulos maduros migran al mágnun, en esta región se

lleva a cabo la fecundación. Después de tres días aproximadamente los folículos pasan a la glándula de calcificación donde se secreta la capa de proteína y carbohidratos de la cáscara, este proceso de calcificación dura entre seis y siete días. Finalmente, los huevos se almacenan en la vagina hasta su deposición varios días más tarde (desove). Durante la deposición, el oviducto posterior deja pasar los huevos a la cloaca y luego a través de la abertura cloacal hacia adentro del nido (Wyneken 2004) (Figura 3).

En este trabajo se plantea que, cuando intervienen dos o más machos en la copula la fertilización puede presentarse dos escenarios: a) Fertilización en orden, que el proceso ocurra en el orden en el que cada que macho copuló con la hembra y b) Fertilización en desorden, en donde el orden del proceso sea independiente del orden en el que cada macho tuvo acceso a la hembra (Figura 4).



**Figura 3.** Esquema del oviducto maduro de una hembra (tomado de Wyneken 2004).



**Figura 4.** Escenarios de fertilización cuando dos o más machos han tenido acceso a la hembra. a) Fertilización en orden y b) Fertilización en desorden.

#### 1.4 Análisis moleculares de Paternidad Múltiple

Los microsatélites o “short-sequence tandem repeat” (SSRT, por sus siglas en inglés) (Aranguren-Méndez *et al.* 2001). Son segmentos cortos de ADN de dos a seis pares de bases (pb), se repiten en tándem y están flanqueados por secuencias conservadas, tienen un número variable de copias que oscilan entre 20 y 300 pb (Tautz 1989 y Morera *et al.* 1999). Son marcadores altamente polimórficos en organismos eucariontes. Son marcadores abundantes dentro del genoma, codominantes, de fácil detección y se presentan en regiones del genoma selectivamente neutrales (Aggarwall *et al.* 2004) y que permiten identificar la contribución de más de un macho en una progenie con un nivel de certidumbre mayor al 99% (Chassin 2004).

En tortugas marinas existen más de 20 *loci* de microsatélites altamente polimórficos reportados en la literatura (FitzSimmons 1995, Kichler *et al.* 1999; Crim *et al.* 2002 y Aggarwal *et al.* 2004 y Aggarwal *et al.* 2008), diseñados para analizar específicamente la frecuencia de PM (Paternidad Múltiple) en *L. olivacea*. Se sabe que existen *loci* de microsatélites que se han conservado en las tortugas marinas durante más de 300 millones de años de evolución (FitzSimmons *et al.* 1995).

El uso de técnicas moleculares como los microsatélites han revelado la existencia de PM, es decir, progenie con medios hermanos en una gran diversidad de grupos incluyendo tortugas marinas (Jensen *et al.* 2006). La frecuencia de PM está influenciada por dos tipos de procesos: a) Procesos precopulatorios tales como la proporción sexual operacional que depende de condiciones ecológicas (FitzSimmons 1996 y Jensen *et al.* 2006), y b) Procesos postcopulatorios que incluyen almacén de semen, elección críptica y competencia espermática (Pearse y Avise 2001). Existe evidencia de que ambos procesos generan variación importante en la frecuencia de PM dentro y entre especies y poblaciones (Jennions y Petrie 2000, Lee y Hays 2004).

Se ha propuesto que la proporción sexual operacional puede variar en relación con los dos patrones de anidación observados en el género *Lepidochelys*: a) “Arribada”: se presenta la concentración de una gran cantidad de hembras anidadoras (más de 500) en una escala espacial y temporal corta (e.g. Ixtapilla Michoacán anidan 14 mil hembras en 72 horas en una playa de 800 metros, Albavera *com. pers.* 2008). b) “Anidación en solitario” hay baja concentración de hembras anidadoras en escala espacial y temporal prolongada (e.g. Maruata Michoacán de 2.8 km anidan máximo 10 tortugas por noche durante la temporada de anidación entre agosto y noviembre de cada año).

En este sentido, Jensen *et al.* (2006) reportó que la PM en *L. olivacea* depende de las condiciones ecológicas (i.e proporción sexual operacional), es decir, en poblaciones numerosas con una cantidad absoluta mayor de machos y con anidación en arribada se presenta mayor frecuencia de PM con un porcentaje de 92%. Mientras que en poblaciones con anidación en solitario de menor tamaño y con menos machos, la frecuencia de PM es menor, 30%. Esto es consistente con lo descrito por Hoekert *et al.* (2002), quienes reportaron que la frecuencia de PM de *L. olivacea* en un sitio de anidación en solitario fue de 20%. En la tortuga lora, *L. kempii* en un sitio de anidación en arribada la frecuencia de PM fue de 57.7% (Kichler *et al.* 1999). En Oaxaca se realizó un estudio similar en *Lepidochelys olivacea* en una playa con anidación en arribada en el que se describe que la frecuencia de paternidad múltiple fue del 100% (Cortés 2006) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Análisis de PM realizados en las diferentes especies de tortugas marinas, con microsátélites.

Especie	% PM y Nidos	Localidad	Autor
<i>Lepidochelys olivacea</i>	20% (10)	Galibi, Suriname	Hoekert <i>et al.</i> 2002
	100% (4)	Oaxaca, México	Cortés 2006
	92% (13) y 30% (13)	Ostional y Playa Hermosa, Costa Rica	Jensen <i>et al.</i> 2006
	<b>100 % (8)</b>	<b>Michoacán, México</b>	<b>Este trabajo</b>
<i>Lepidochelys kempii</i>	56% (35)	Tamaulipas, México	Kichler <i>et al.</i> 1999
<i>Caretta caretta</i>	33% (45)	Queensland, Australia	Harry y Briscoe 1988
	33% (3)	Florida, USA	Bollmer <i>et al.</i> 1999
	31% (70)	Florida, USA	Moore y Ball 2002
	93% (15)	Zakynthos, Grecia	Zbinden <i>et al.</i> 2007
<i>Natator depressus</i>	67% (9)	Queensland, Australia	Theissinger <i>et al.</i> 2009
<i>Chelonia mydas</i>	3% (22)	Queensland, Australia	FitzSimmons 1998
	100% (3)	Isla Ascención, Reino Unido	Ireland <i>et al.</i> 2003
	75% (16)	Michoacán, México	Chassin 2004
	60% (18)	Isla Ascención, Reino Unido	Lee y Hays 2004
	100% (2)	Michoacán, México	Lara-De La Cruz <i>et al.</i> 2010
	100% (5)	Michoacán, México	Nieto-Ortiz 2010
	83% (6)	Michoacán, México	Lara-De La Cruz 2011
	<i>Dermochelys coriacea</i>	0% (4)	St. Croix, USA
0% (2)		Guanacaste, Costa Rica	Rieder <i>et al.</i> 1998
10% (50)		Playa Grande, Costa Rica	Crim <i>et al.</i> 2002

Con respecto a los procesos postcopulatorios relacionados con la poliandria, en tortugas marinas, se ha propuesto que el almacén de semen, la elección críptica y la competencia espermática representan beneficios para la hembra tales como: a) Garantizar la fecundación de sus huevos, en caso de no tener acceso a nuevos machos después de la primera cópula, b) Incrementar la diversidad genética de la progenie al usar el semen de varios machos para fertilizar una progenie, c) Disminuir el riesgo de mala elección de un solo genotipo paterno y aumentar las oportunidades de “buenos” genes para la progenie (Uller y Olson 2008).

Se ha encontrado evidencia de almacén de semen dentro del tracto reproductivo de tortuga verde (*C. mydas*), lora (*L. kempii*) y golfinia (*L. olivacea*) (Pearse y Avise 2001,

Chassin 2004; Uller y Olsson 2008), específicamente en la región denominada mágnium y zonas glandulares en la porción inicial del oviducto, donde se lleva a cabo la fecundación. En el género *Chelonia* la capacidad para almacenar semen está limitada a una misma temporada de anidación y no entre temporadas reproductivas (Chassin 2004). Esta capacidad de almacén de semen posibilita la existencia de procesos de elección críptica por parte de la hembra (Lara-de la Cruz 2011) y competencia espermática (interacción en el tracto reproductivo de la hembra del esperma de dos o más machos que compiten por el acceso a los óvulos, Sivinski 1984).

### **1.5 Estimadores de adecuación**

Diversos estudios describen que existe una correlación positiva entre la simetría individual y la adecuación (sobrevivencia, fecundidad, crecimiento y apareamiento) (Davis y Grosse 2008). Dufour y Weatherhead (1998) realizaron un trabajo con aves y sugieren que la simetría podría ser un indicador confiable de la calidad fenotípica, y que podría ser un aspecto importante a considerar en la selección sexual.

La existencia o ausencia de PM tiene implicaciones importantes para la conservación de las tortugas marinas ya que podría afectar los niveles de diversidad genética de cada nidada; a mayor frecuencia de paternidad múltiple, mayor será la diversidad genética, es decir, la diversidad de alelos y genotipos presentes en la progenie, población, especie o grupos de especies. Se ha planteado que la diversidad genética, guarda una relación positiva con la adecuación promedio de las poblaciones (Frankel y Soulé 1992, Frankham *et al.* 2003).

En tortugas dulceacuícolas se ha reportado que el tiempo de incorporación (tiempo en el que un individuo se voltea iniciando con el caparazón en el suelo y terminando sobre su plastrón), es un carácter de las crías que puede estar relacionado con su sobrevivencia, debido a que puede incrementar considerablemente su exposición a los depredadores o a la deshidratación (Delmas *et al.* 2007). En este sentido se realizó un estudio con *Chrysemys picta* en el que se demostró que el número de machos implicados en la generación de la progenie no presentó una relación con el tamaño de la nidada y el porcentaje de eclosión (Pearse *et al.* 2002).

Se ha descrito que la paternidad múltiple presenta un bajo impacto sobre el éxito de anidación y que podría presentar una relación positiva con los estimadores de adecuación de las crías. En *Chelonia mydas* se describió que no existe relación entre el número de padres implicados en la progenie y la sobrevivencia de la misma, así como la relación nula entre el macho que generó mayor descendencia y la sobrevivencia de las crías (Lee y Hays 2004).

## 2. HIPÓTESIS

1. Si la frecuencia de paternidad múltiple tiene efecto sobre la capacidad reproductiva de las hembras, se espera una relación positiva entre esta y sus características reproductivas.
2. Existirá una relación positiva entre la frecuencia de paternidad múltiple y los valores de los estimadores de adecuación de las crías.
3. De presentarse un patrón ordenado en la fertilización se podría sugerir la presencia de un mecanismo fisiológico que posibilite procesos de elección críptica al controlar el orden y cantidad de progenie que fertiliza cada macho.

## 3. OBJETIVOS

### General

Determinar la frecuencia de paternidad múltiple en los nidos de *Lepidochelys olivacea* y el efecto paterno sobre los estimadores de adecuación de hembra y crías.

### Particulares

1. Evaluar la frecuencia de paternidad múltiple de *Lepidochelys olivacea* y su impacto sobre la adecuación de las hembras.
2. Establecer la relación entre la frecuencia de paternidad múltiple y los estimadores de adecuación de la progenie, como peso, vigor y morfometría.
3. Describir el patrón en el que se presenta la fertilización de los huevos en los nidos con paternidad múltiple.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Colecta de muestras

La localidad de colecta fue la playa de Maruata perteneciente al municipio de Aquila, Michoacán. Localizada a los 18°16' 0" de latitud Norte y 103° 20' 0" de longitud Oeste; limita al oeste con el río Maruata y al este por el acantilado "Rincón Chiquero". El proyecto comprendió el análisis de muestras de una temporada de anidación. La colecta se realizó durante los meses de septiembre a noviembre de 2008, se contó con un permiso de colecta científica expedido por la Dirección General De Vida Silvestre INE SEMARNAT el día 06 de agosto de 2008 (Oficio Núm. SGPA / DGVS / 05134/08).

Para conocer la distribución de las frecuencias alélicas de la población se tomaron muestras de sangre de 47 hembras anidadoras siguiendo el protocolo descrito por Owens y Ruiz (1980) el cual no compromete la salud de los individuos. De estos ejemplares se colectaron entre 500 y 1000 µl de sangre empleando una jeringa estéril de 5 ml con aguja de 18-2 2x 38mm. La sangre fue colocada en viales de plástico de 1.5 ml y suspendida en una solución amortiguadora lítica (100 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM EDTA (pH8), 10 mM NaCl, 2% SDS; Dutton 1997), la cual permite el almacén de las muestras para sus posterior análisis.

De las hembras se obtuvieron datos de LCC (Longitud Curva del Caparazón), tamaño de nidada y porcentaje de eclosión de cada nido, para analizar si existe relación entre el número de machos que fertilizan un nido y la capacidad reproductiva de las hembras.

En cuanto a la estimación de frecuencias de PM se colectaron 8 nidos completos, en los cuales se conservó el orden de postura (los huevos se fueron tomando conforme el orden de ovoposición) hasta la eclosión, considerando las recomendaciones descritas por Mortimer (2000). Los huevos se depositaron en mallas plásticas (redes) en las que se les separó y numeró de manera consecutiva siempre conservando el orden de postura. Conservar el orden de postura permite inferir la existencia de orden en el proceso de fertilización, es decir, que el primer cuarto de la progenie sea fertilizada por un macho, y los subsecuentes por diferentes machos o que el proceso se presente de manera desordenada

(Figura 4). Para ello se dividió en partes iguales el total de la camada de cada nido y se realizó un análisis estadístico para saber si la fecundación de los huevos se limitaba a un macho por cada segmento o existía progenie de los diferentes machos en todos los segmentos del nido.

La colecta de muestras y la siembra de nidos se realizaron durante 15 días entre el 27 de septiembre y el 10 de octubre. Las progenies eclosionaron aproximadamente 45 días posteriores a la siembra, entre el 11 y el 26 de noviembre de 2008. De las progenies completas de los 8 nidos sometidos a análisis se obtuvo: tamaño del nido, número de huevos fertilizados, porcentaje de eclosión y sobrevivencia.

Las crías de cada nido fueron numeradas en el orden con la toma de muestra para análisis genético, de cada cría se tomaron de 5 a 20  $\mu$ l de sangre. Se colocó cada cría en posición vertical con la región anterior hacia abajo sosteniendo su cuello con los dedos pulgar e índice y con ayuda de una jeringa de 1 ml se obtuvo la muestra. De los ejemplares que en el momento de la eclosión estaban muertos, se colectaron fragmentos de tejido (piel o músculo) de aproximadamente 0.5 g y se preservaron en una solución saturada sal-DMSO (contiene sulfuro como solvente) en un volumen que cubriera toda la muestra (Dutton y Davis 1998).

#### **4.2 Estimadores de adecuación de las crías**

De las crías de los nidos colectados se obtuvieron datos que representan estimadores indirectos de adecuación. El peso de las crías se obtuvo con ayuda de una balanza granataria Scout Pro OHAUS® (precisión 0.01g). Se les aplicó una prueba de vigor que consistió en colocar la cría sobre su caparazón (región dorsal) y tomar el tiempo que tardaban en incorporarse sobre el plastrón (región ventral), con un cronometro. Las crías se colocaron sobre una hoja de papel milimétrico y se tomó una foto con una cámara Sony® de 7.2 megapíxeles colocada sobre un tripie.

Las fotografías fueron procesadas a partir de marcas anatómicas conspicuas y reproducibles del caparazón, denominadas Semi-landmarks. Estas marcas se realizaron con el programa MakeFan6 de la serie IMP (Integrated Morphometrics Package). Posteriormente se colocaron tres puntos de referencia; en la escama nual, en la unión de la

tercera y cuarta escama ventral y la tercer marca en la unión de las últimas dos escamas marginales de la región posterior. A partir de estas marcas se generaron dos ejes que formaron un plano cartesiano, de las cuales se generó un abanico con 10 radios que cubrió todo el caparazón. En la intersección de cada radio con el margen del caparazón se colocó un semi-landmark con el programa TPS-Dig (Rohlf 2005), sumando en total 14 semi-landmarks y dos marcas extras como escala de referencia en el papel milimétrico.

#### **4.3 Extracción de ADN y amplificación de 4 loci de microsatélites.**

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de extracción de FitzSimmons *et al.* (1995). Se colocaron 30µl de muestra de sangre (conservada en solución amortiguadora lítica) con 300µl de solución de extracción (0.2 ml de EDTA 0.5 M, 1 ml de TRIS 1 M, 0.33 ml de NaCl 3 M y 0.5 ml de SDS 20%) y 5 µl Proteinasa K (10mg/ml) se incubó a 60°C en un termoblock Labnet® (Digital Dry Bath, Labnet International) durante 10 horas ó toda la noche. Se adicionaron 150 µl de Acetato de Amonio 7.5 M y se refrigeraron a -70°C durante 20 minutos en un ultracongelador Nuaire® (Utalow Freezer). Se centrifugó durante 20 minutos a 13,000 rpm en una centrifuga Eppendorf® (Centrifuge 5424), se transfirió el sobrenadante a un vial estéril. Se colocó 1 ml de etanol frío al 95% y se refrigeró a -70°C durante 20 minutos. Se centrifugó durante 20 minutos a 13,000 rpm. Se eliminó el etanol por decantación y se adicionó etanol frío al 70%. Se centrifugó de nuevo y se eliminó el etanol por decantación. Se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió la pastilla de ADN en 60 µl de agua inyectable PiSA®. Se tomaron 8 µl del producto de extracción y se corrió en un minigel de agarosa al 1.5 % (1.5 gr de agarosa y 98.5 ml de TBE 0.5 X) teñido con SYBR® Safe (Invitrogen) 2 µl por cada 50 ml de agarosa, se visualizó en un transiluminador Gel Logic 200® (Imaging System).

Se realizó la amplificación de cuatro *loci* de microsatélite reportados por Aggarwal *et al.* (2004). Los oligonucleótidos utilizados fueron: Or1, Or2, Or7 y Or8 diseñados para *Lepidochelys olivacea* (Tabla 2). Las temperaturas y tiempos del programa para la amplificación de los microsatélites por medio de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que consta de 5 pasos: temperatura inicial de desnaturalización de 94°C

1 minuto, seguida de: 1. Desnaturalización 94°C 30 segundos, 2. Alineamiento: gradiente de temperaturas de 45°C a 65°C 30 segundos, 3. Extensión 72°C 30seg, con una temperatura de extensión final de 72°C 1 minuto. El número de ciclos fue de 35 en todos los casos. Las reacciones de amplificación tuvieron un volumen final de 25 µl y se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 ® (Applied Biosystems). Las concentraciones de los reactivos utilizados fueron: Buffer 10X, dntp's 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 10 mM, taq 1 µl, BSA (Albumina bovina) 1.25 mg/ml.

Para evaluar la eficiencia de la amplificación se corrieron 8 µl del producto de PCR en minigeles de agarosa al 1.5% teñidos con SYBR safe ® y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen ®) para referenciar el tamaño de los fragmentos amplificados.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados en la amplificación de microsatélites.

<i>Locus</i>	Tamaño (pb)	Secuencia (5'-3')	Secuencia repetida	Fluoróforo
<b>Or1</b>	148-190	CCCCTTgTgTTCTgAAATCCTATgA CAggCATAgggAAAAATCAgAggTA	(CAAA) <sub>16</sub>	FAM (Azul)
<b>Or2</b>	153-189	gCTCCTgCATCACTATTTCCCTgTT TgCTgCCCCCCACCCCTCTg	(GT) <sub>8</sub> GCC(GT) <sub>5</sub>	FAM (Azul)
<b>Or7</b>	185-219	gggTTAgATATAggAggTgCTTgATgT TCaggATTAgCCAACAAGAgCAAAA	(GT) <sub>6</sub> (GA) <sub>7</sub>	PET (Rojo)
<b>Or8</b>	140-170	gCACTggTgggAAAATATTgTTgT gCTgggCTAATAAAATgTTgTgCA	(TC) <sub>23</sub>	NED (Negro)

La electroforesis capilar de los fragmentos amplificados se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer®), utilizando el software 310 Data Collection 3.1.0 (Applied Biosystems). En cada reacción se usaron LIZ -500 como marcador estándar, formamida Hi-Di (solución para la desnaturalización del ADN) y de 3 a 4 µl del producto de amplificación. Cabe mencionar que en cada reacción se incluyeron los productos de PCR de 2 *loci*. Se analizaron con electroferogramas obtenidos con el software Peak Scanner® (Applied Biosystems).

#### 4.4 Frecuencias alélicas de hembras y crías

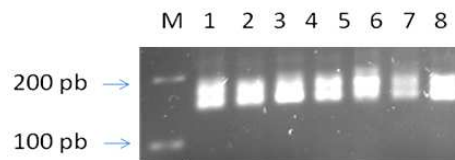
En los electroferogramas se identificaron los picos que representan cada uno de los alelos (de un individuo diploide) de cada *locus*. Se generó la distribución de las frecuencias alélicas de cada *locus* de las hembras. Se empleó el programa Gerud 2.0 (Jones 2005) que genera varias hipótesis de genotipos paternos (los reconstruye a partir de la distribución de las frecuencias alélicas) y jerarquiza la de mayor verosimilitud. Con ayuda de este programa también se obtuvieron los índices de: detección de paternidad múltiple de cada *locus* ( $d$ ) y con más de 2 *loci* ( $D$ ).

A partir de la distribución de las frecuencias alélicas se calculó la Heterocigosis esperada y observada ( $H_e$  y  $H_o$ ) de las hembras y de cada nido. Se realizó una prueba del equilibrio Hardy-Weinberg, a partir de los valores de  $H_e$  y  $H_o$  de las frecuencias alélicas de las hembras. Se graficaron los porcentajes de paternidad de cada nido, así como el porcentaje de crías analizadas y el índice de dominancia de cada nido, propuesto por Sivinsky (1984).

## 5. RESULTADOS

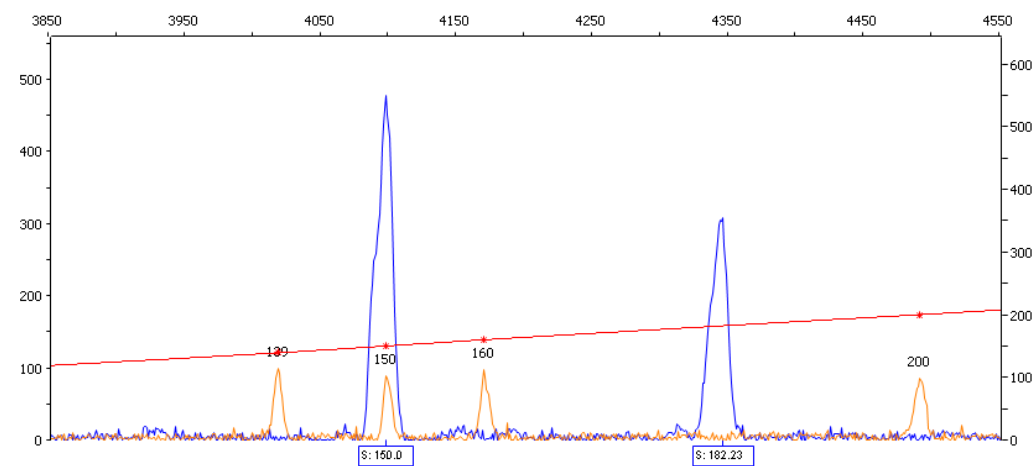
### 5.1 Extracción de ADN y PCR de 4 *loci* de microsatélite

Se realizó la extracción de ADN total de 47 hembras anidadoras y de 329 crías de 8 nidos. De las cuales se obtuvieron los genotipos con 4 *loci* para 41 crías en promedio por nido con un rango de 36 a 47 individuos. La amplificación de los fragmentos de microsatélite se verificó en mini geles de agarosa (1.5%) se corrieron 8  $\mu$ l del producto de la PCR (Figura 5).



**Figura 5.** Gel de agarosa 1.5%, M representa el marcador de peso molecular, 1-8 muestras de fragmentos amplificados del microsatélite Or8.

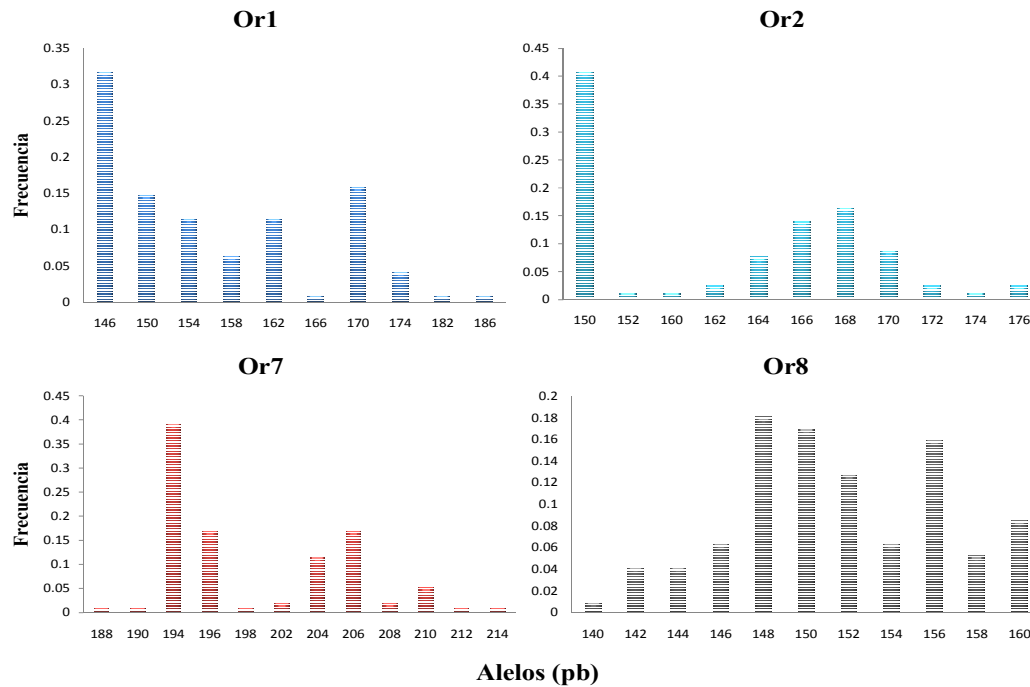
Se seleccionaron 4 *loci* de microsatélites: Or1, Or2, Or7 y Or8 (Figura 5) que amplificaron en las 47 muestras de las hembras. Los productos de PCR se analizaron en un secuenciador y se obtuvieron electroferogramas de los *loci* de microsatelites (Figura 6).



**Figura 6.** Electroferograma obtenido utilizando el software Peak Scanner. En color naranja se observa el marcador molecular (LIZ -500) y en azul los 2 alelos (150-182.23) del microsatélite Or1.

## 5.2 Distribución de las frecuencias alélicas en hembras

Se analizaron 4 *loci* de microsatélite altamente polimórficos para esta población (Tabla 2). Para el *locus* Or1 se encontraron 10 alelos, para el Or2: 11, en Or7: 12 y para el Or8: 11 alelos (Figura 7).



**Figura 7.** Frecuencias alélicas de 47 hembras adultas para 4 microsatélites de *Lepidochelys olivacea*. El número de individuos muestreados por *locus* fue: n = 47 de cada oligonucleótido (Or1, Or2, Or7 y Or8).

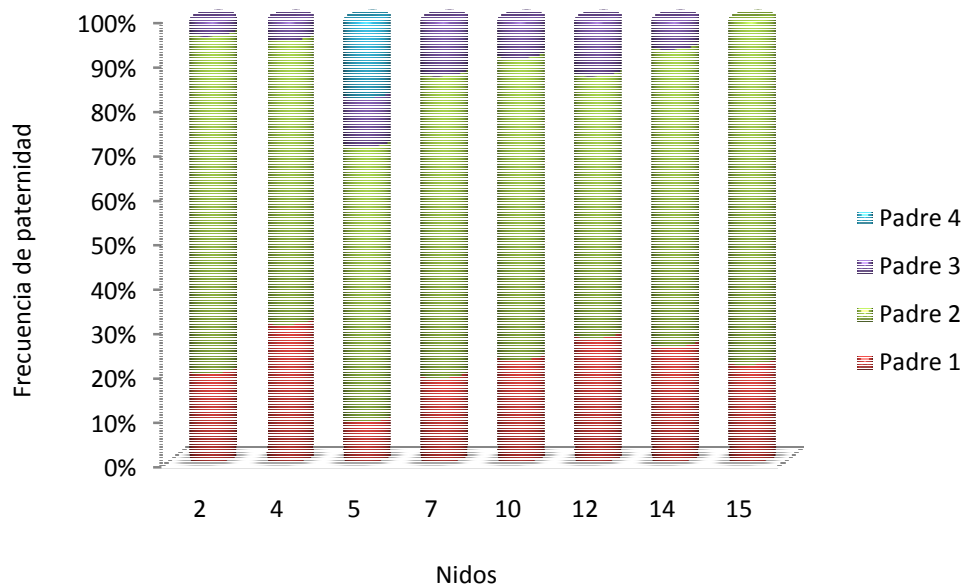
Los valores de Heterocigocis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) se muestran en la Tabla 3. La probabilidad de exclusión de cada *locus* ( $d$ ) y de los 4 *loci* ( $D$ ) se muestra en la (Tabla 4).

**Tabla 3.** Alelos encontrados de 4 *loci* de microsatélite y valores de Heterocigocis observada (Ho) y esperada (He).

<i>Locus</i>	Alelos	Rango	Ho	He
Or1	10	146-186	0.87	0.82
Or2	11	150-176	0.74	0.77
Or7	12	188-214	0.79	0.77
Or8	11	140-160	0.98	0.88
Promedio	11		<b>0.84</b>	<b>0.81</b>

**Tabla 4.** Probabilidad de exclusión de cada *locus* (*d*) y de los 4 *loci* (*D*).

<i>Locus</i>	Alelos	Probabilidad de exclusión
Or1	10	0.65
Or2	11	0.58
Or7	12	0.58
Or8	11	0.75
<i>Loci</i>		<b>D = 0.99</b>

**Figura 8.** Nidos analizados de *L. olivacea*, en donde se observa el porcentaje de la progenie correspondiente a cada macho. No se encontraron genotipos paternos compartidos entre nidos.

El análisis de los datos de los 4 microsátélites mostraron que 3 de estos presentaron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg (Or1:  $p=0.27$ ; Or2:  $p=0.001$ ; Or7:  $p=0.03$  y Or8:  $p=0.02$ ). A partir de las distribuciones de las frecuencias alélicas de las hembras y con los alelos de cada progenie el programa Gerud 2.0 realizó la reconstrucción de genotipos paternos aunado con la hipótesis de mayor verosimilitud en relación a los patrones de herencia mendeliana y a la distribución de las frecuencias alélicas de la población anidadora, este resultado fue asignado en las progenes (Figura 8). Los genotipos de las madres y los padres con su respectiva progenie (número de crías de cada padre en cada nido) se presenta en la tabla 5 (Ver Anexo I, Tablas 8-15). Cabe destacar que no existen genotipos paternos compartidos entre los nidos. También se realizó un análisis de dominancia de acuerdo con la fórmula descrita por Sivinsky (1984), es decir, el porcentaje de crías de cada padre en cada nido (Tabla 6).

**Tabla 5.** Genotipos parentales inferidos a partir de la distribución de las frecuencias alélicas. Se presenta el número de machos involucrados en la fertilización de los nidos (el número asignado a cada macho es independiente en cada nido) así como su respectivo número de crías.

Nido	Progenitores	Genotipo				N. Crías
		Or1	Or2	Or7	Or8	
2	♀	158/174	150/162	194/194	148/152	
	♂1	158/146	168/162	194/194	158/148	9
	♂2	174/146	168/170	194/196	144/158	35
	♂3	146/146	168/170	194/196	152/152	2
4	♀	146/150	150/170	196/206	150/158	
	♂1	146/150	150/172	196/196	150/140	11
	♂2	162/170	150/170	196/212	150/140	23
	♂3	162/170	150/170	206/206	158/140	2
5	♀	154/170	164/170	196/212	148/150	
	♂1	154/154	168/164	202/206	150/150	4
	♂2	154/150	168/164	196/208	150/160	28
	♂3	154/150	150/162	196/208	150/160	5
	♂4	154/170	168/164	196/208	160/152	8
7	♀	158/162	150/166	196/210	148/152	
	♂1	150/162	168/168	210/194	148/160	7
	♂2	150/162	166/150	196/194	152/160	25
	♂3	158/170	168/166	196/194	152/160	5
10	♀	146/146	150/150	194/196	150/156	
	♂1	150/162	150/160	194/206	150/148	11
	♂2	150/162	170/170	196/206	150/148	32
	♂3	162/146	150/170	194/194	148/148	4
12	♀	150/170	150/166	194/194	152/156	
	♂1	150/154	150/166	210/204	148/152	11
	♂2	150/170	162/166	204/194	148/156	5
	♂3	154/154	162/166	204/194	148/148	23
14	♀	158/166	150/150	190/210	150/156	
	♂1	158/158	150/166	210/206	148/148	3
	♂2	158/150	168/170	210/206	150/148	28
	♂3	166/150	170/170	190/190	148/156	11
15	♀	154/170	164/164	204/206	144/152	
	♂1	146/154	150/150	194/194	160/150	29
	♂2	146/170	150/150	204/194	160/144	8

**Tabla 6.** Datos de los nidos con análisis de paternidad múltiple (PM), con porcentajes del número de crías analizadas por nido, porcentaje de paternidad del macho dominante e índice de dominancia =  $n^{\circ}$  de crías del padre más común +  $n^{\circ}$  de crías del segundo padre más común / total de crías del nido (Sivinski 1984).

Nido	Total crías (N. crías total de PM) % analizado del nido	N. Machos	% Crías Macho dominante (N. crías)	Índice de dominancia (%)
2	143 (46) 33%	3	76 (35)	96
4	80 (36) 45%	3	64 (23)	94
5	124 (45) 33%	4	62 (28)	80
7	67 (37) 56%	3	68 (25)	86
10	114 (47) 41%	3	68 (32)	91
12	86 (39) 45%	3	59 (23)	87
14	89 (42) 47%	3	67 (28)	93
15	128 (37) 29%	2	78 (29)	100

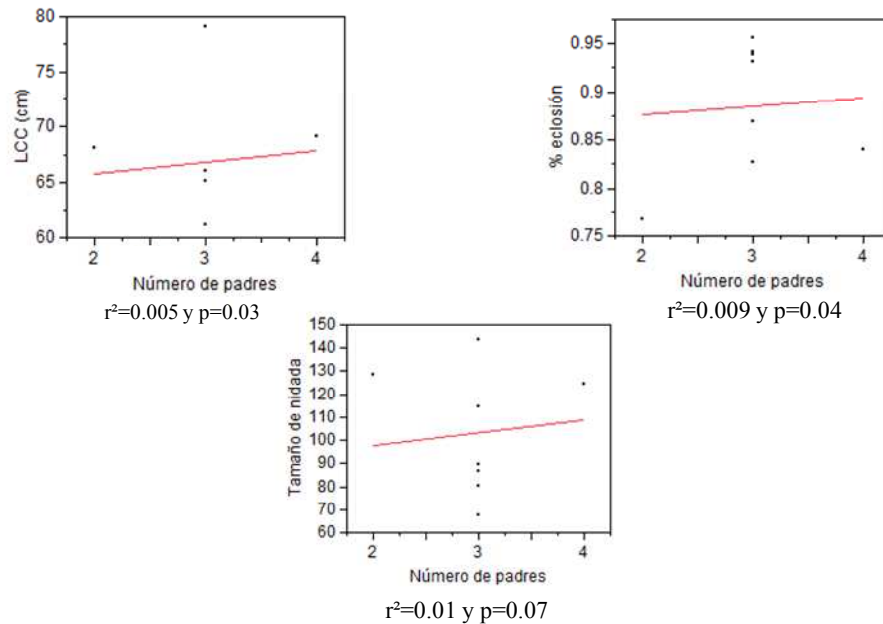
### 5.3 Estimadores de adecuación

#### 5.3.1 Estimadores de adecuación de hembras

Los valores de adecuación de las hembras progenitoras de los ocho nidos analizados se presentan en la Tabla 7. Se encontró relación positiva entre el número de machos que fertilizan un nido y la capacidad reproductiva de las hembras: porcentaje de eclosión ( $r^2=0.005$ ,  $p=0.03$ ) y tamaño de la hembra (LCC) ( $r^2=0.009$ ,  $p=0.04$ ), en cuanto al tamaño de la nidada no se encontró relación con el número de machos que fertilizaron el nido ( $r^2=0.012$ ,  $p=0.07$ ) (Figura 9).

**Tabla 7.** Valores de adecuación de las hembras de *Lepidochelys olivacea*. Tamaño de nidada, LCC y número de padres de cada nido.

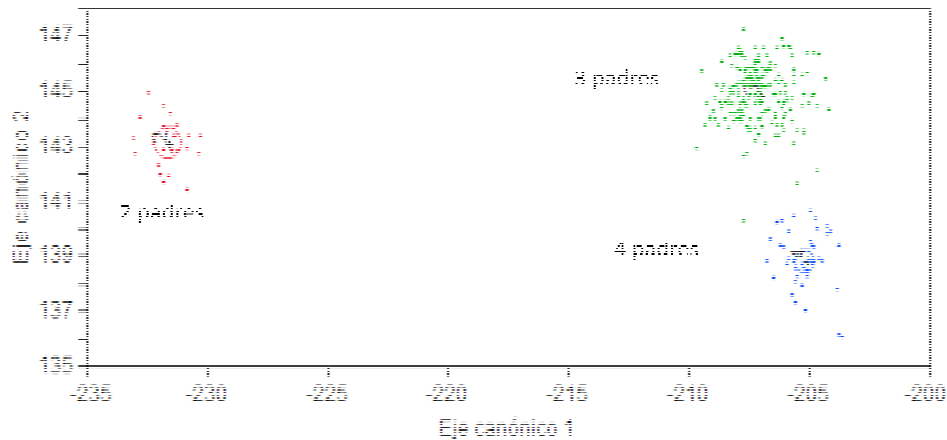
Nido	LCC (cm)	Tamaño de nidada	% Eclosión	Número de padres
2	66	143	124	3
4	79	80	75	3
5	69	124	104	4
7	65	67	63	3
10	66	114	106	3
12	61	86	71	3
14	61	89	85	3
15	68	128	98	2



**Figura 9.** Relación entre el número de machos y la capacidad reproductiva de las hembras (tamaño de nidada, % de eclosión y tamaño de la hembra).

### 5.3.2 Estimadores de adecuación de crías

En el análisis multivariado evaluando el efecto del número de padres que fertiliza un nido de acuerdo con las características indirectas de adecuación materna (LCC, tamaño de la nidada, % de eclosión y número de crías) y las de adecuación de las crías (peso, velocidad de incorporación (vigor), morfometría y He), sí se encontraron diferencias significativas entre los nidos de acuerdo con el número de machos que lo fertilizaron (Wilks' Lambda= 0.003,  $p=0.001$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Análisis de variables canónicas realizado para los ocho nidos en los que se analizó paternidad múltiple. Se encontraron diferencias significativas entre el número de padres (Wilks' Lambda= 0.003,  $p=0.0001$ ), de acuerdo con las características indirectas de adecuación de las hembras y las crías. Los puntos en color rosa representan el nido fertilizado por 2 machos, los de color verde por tres machos y los de color azul por cuatro.

### Peso

En los 8 nidos analizados no se encontraron diferencias significativas en el peso de las crías dentro de cada nido, es decir, no existen diferencias significativas en el peso de las crías de cada padre (Nido 2:  $F=2.43$ ,  $p=0.27$ ; Nido 4:  $F=0.59$ ,  $p=0.74$ ; Nido 5:  $F=2.64$ ,  $p=0.44$ ; Nido 7:  $F=2.34$ ,  $p=0.30$ ; Nido 10:  $F=0.8$ ,  $p=0.66$ ; Nido 12:  $F=2.3$ ,  $p=0.31$ ; Nido 14:  $F=2.18$ ,  $p=0.33$ ; Nido 15:  $F=2.28$ ,  $p=0.13$ ), pero sí entre los nidos ( $F=3.20$ ,  $p=0.001$ ). Cabe mencionar que el peso de las crías no estuvo asociado a la LCC de las hembras. El promedio de este carácter fue de 15.27 gramos y el rango de 11.01 a 22.90.

Los nidos 10, 14 y 15 presentaron las crías con mayor peso, los primeros dos presentaron paternidad de 3 machos distintos mientras que el nido 15 presentó solo dos machos distintos. Los nidos 2, 5 y 7 mostraron las crías con menor peso cabe mencionar que las crías del nido 5 son de dos machos distintos. Las crías de los nidos 2 y 7 son de 3 machos distintos.

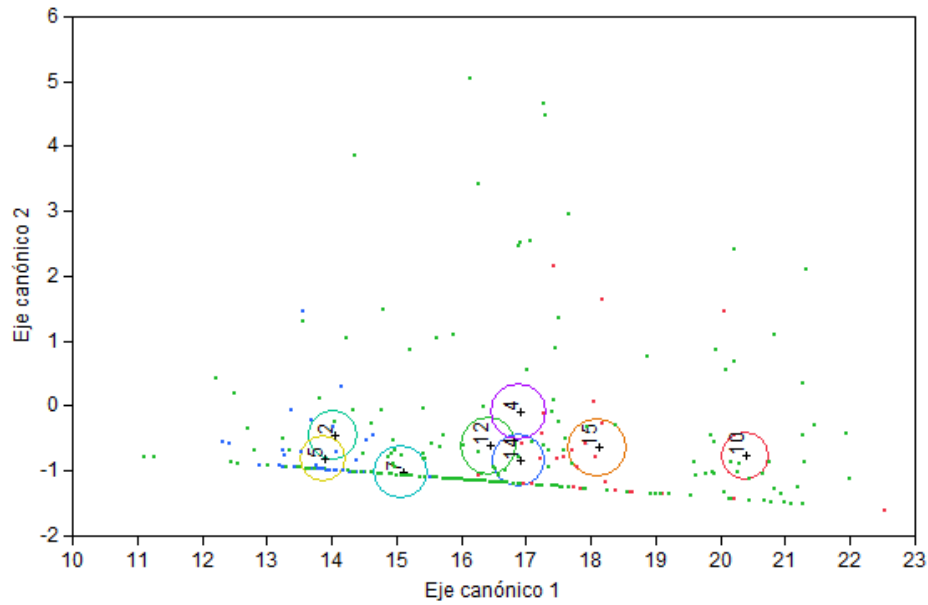
El análisis estadístico mostró una relación negativa entre el número de padres y el peso de las crías ( $r^2=0.22$ ,  $p=0.001$ ), es decir, a mayor número de machos implicados en la paternidad de la progenie menor peso de las crías.

### Vigor (velocidad de incorporación)

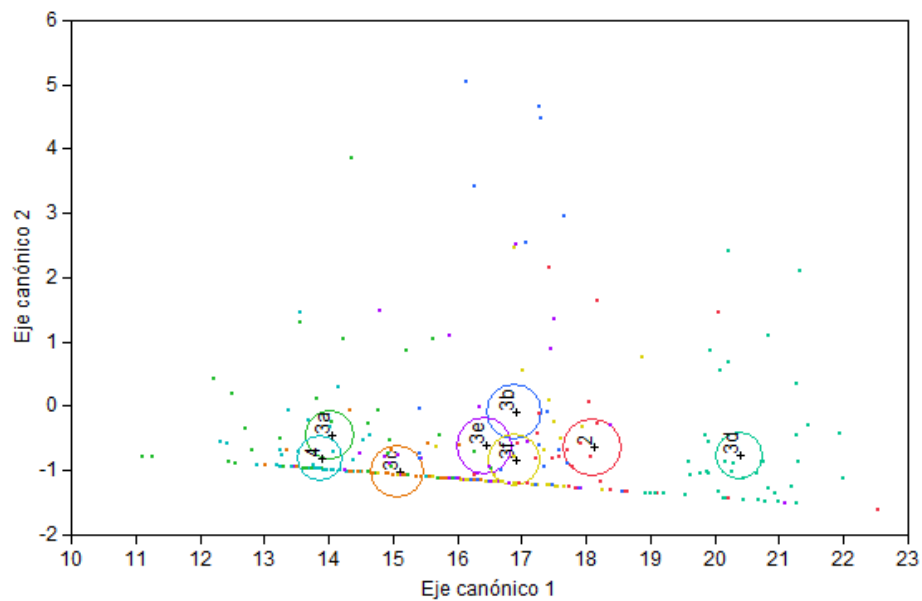
La velocidad de incorporación promedio de incorporación fue de 4.19 s (rango de 1 a 53 s). Se encontraron diferencias significativas en la velocidad de incorporación entre los 8 nidos ( $F= 3.19$ ,  $p= 0.001$ ). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas al interior de estos, es decir, entre la velocidad de incorporación de las crías de los diferentes padres (Nido 2:  $F= 2.03$ ,  $p= 0.36$ ; Nido 4:  $F= 0.43$ ,  $p= 0.80$ ; Nido 5:  $F= 7.35$ ,  $p= 0.06$ ; Nido 7:  $F= 3.07$ ,  $p= 0.21$ ; Nido 10:  $F= 1.32$ ,  $p= 0.51$ ; Nido 12:  $F= 0.41$ ,  $p= 0.81$ ; Nido 14:  $F= 0.12$ ,  $p= 0.93$ ; Nido 15:  $F= 5.20$ ,  $p= 0.06$ ).

De acuerdo con lo análisis estadísticos las crías de los nidos 4, 10 y 15 presentaron mayor tiempo en incorporarse sobre el plastrón. En el nido 15 la paternidad de las crías es de dos machos distintos, mientras que de los nido 4 y 10 la paternidad es de tres machos. Las crías de los nidos que presentaron menor tiempo en la velocidad de incorporación fueron: 5, 7 y 14, cabe mencionar que el nido 5 tiene crías de cuatro machos distintos y los nidos 7 y 14 de tres machos. El estadístico mostró una relación negativa entre el número de padres y el vigor de las crías ( $r^2=0.015$   $p=0.03$ ), es decir, a mayor número de machos implicados en la paternidad de la progenie menor vigor de las crías.

Cabe mencionar que las características de peso y vigor como covariables muestran diferencias significativas entre los nidos (Wilks' Lambda= 0.16,  $p=0.0001$ ) (Figura 11) y entre el número de machos que fertilizaron los nidos (Wilks' Lambda= 0.16,  $p= 0.0001$ ) (Figura 12), es decir, las diferencias en las características de peso y vigor de las crías dependen del número de machos que fertilizaron esos nidos, por ejemplo si fueron 2, 3 ó 4 machos.



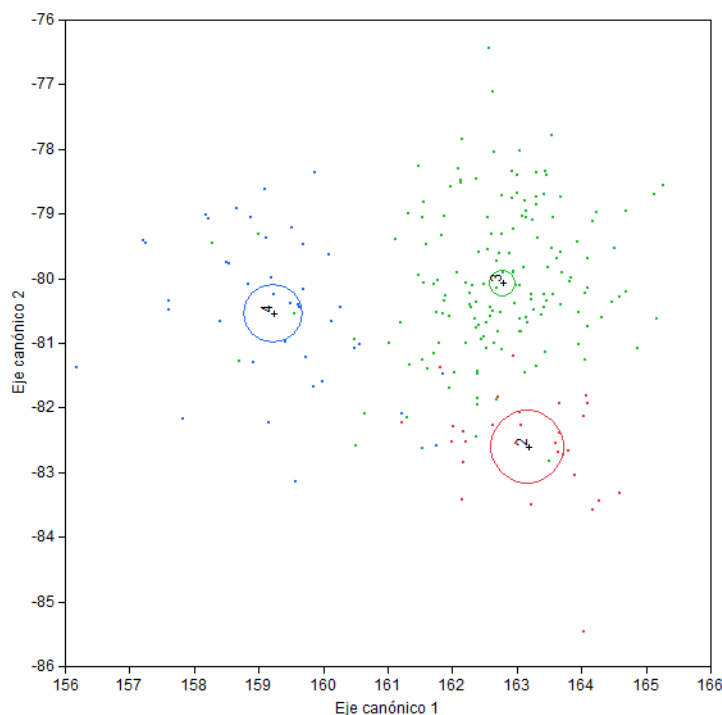
**Figura 11.** Análisis de variables canónicas de 8 nidos. Se encontraron diferencias significativas entre los nidos (Wilks' Lambda= 0.16,  $p= 0.0001$ ), de acuerdo con las características de peso y vigor. La numeración de los círculos corresponde a los 8 nidos analizados.



**Figura 12.** Análisis de variables canónicas realizado en ocho nidos. Se encontraron diferencias significativas entre el peso y el vigor (Wilks' Lambda= 0.010,  $p= 0.0001$ ), de acuerdo con el número de machos que fertilizaron los nidos. Los círculos de colores numerados representan los nidos que se incluyeron en el análisis, dentro de cada círculo se muestra el centroide de los datos. Para resaltar la dispersión de los datos de nidos con 3 padres se agregó una letra en cada etiqueta (Padre 3<sup>a</sup> nido 2, 3b nido 4, 3c nido 7, 3d nido 10, 3e nido 12, 3f nido 14, el número 2 corresponde al número de padres del nido 15 y el número 4 al del nido 5).

### Morfometría geométrica y escudos del caparazón

Los análisis de variables canónicas de ocho nidos demostraron que existen diferencias significativas en la forma de las crías de los diferentes nidos lo que indica que la forma de las crías es distinta si el nido fue fertilizado por 2, 3 ó 4 machos (Wilks' Lambda= 0.010,  $p = 0.0001$ ) (Figura 13), sin embargo no se encontró una relación negativa o positiva. Este resultado es consistente con las diferencias significativas encontradas de acuerdo al número de padres que fertilizaron los nidos. También se encontraron diferencias significativas al interior de los nidos, es decir, la forma de las crías es distinta dependiendo de su progenitor macho (Nido 2: Wilks' Lambda= 0.0001,  $p=0.0001$ ; Nido 4: Wilks' Lambda= 0.0002,  $p= 0.0001$ ; Nido 5: Wilks' Lambda= 0.0009,  $p= 0.0001$ ; Nido 7: Wilks' Lambda= 0.0008,  $p= 0.0001$ ; Nido 10: Wilks' Lambda=0.0007,  $p= 0.0001$ ; Nido 12: Wilks' Lambda= 0.0001,  $p= 0.0001$ ; Nido 14: Wilks' Lambda= 0.0002,  $p= 0.0001$ ; Nido 15: Wilks' Lambda=0.0002,  $p= 0.0001$ ).



**Figura 13.** Análisis de variables canónicas realizado para los ocho nidos en los que se analizó paternidad múltiple. Se encontraron diferencias significativas de acuerdo al número de machos que fertilizaron los nidos (Wilks' Lambda= 0.010,  $p= 0.0001$ ).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Patrón de fertilización y paternidad múltiple

En este estudio se realizó el análisis de PM con una probabilidad de exclusión de 0.99 para 4 *loci* de microsatélite altamente polimórficos en la población de *Lepidochelys olivacea* de la playa de Maruata, Michoacán. Algunos autores han realizado estudios de paternidad en tortugas marinas (Fitzsimmons 1998, Moore y Ball 2002, Chassin 2004 y Jensen *et al.* 2006) con 3 y 4 *loci* de microsatélites polimórficos y con probabilidades de exclusión consistentes con lo descrito para este estudio. El número de *loci* que se requieren para un estudio de paternidad depende de la probabilidad de exclusión, es decir, para tener mayor certeza de la asignación de paternidad de las crías es necesario tener *loci* altamente polimórficos ya que esto aumenta la probabilidad de exclusión.

Se analizaron los microsatélites Or1, Or2, Or7 y Or8, encontrándose 10, 11, 12 y 11 alelos respectivamente; con valores de determinación de paternidad múltiple por locus de y con valores de exclusión de paternidad de 0.65 (Or1), 0.58 (Or2), 0.58 (Or7) y 0.75 (Or8). El número de alelos descritos por este estudio es menor con respecto a los valores reportados por Aggarwall *et al.* (2004), quien reportó para Or1 24 alelos, Or2 con 12, Or7 con 16 y Or8 con 8 alelos. El valor de la probabilidad de exclusión de los 4 *loci* fue de 0.99, este resultado permitió asignar los genotipos paternos implicados en cada nido, con una certeza de 99%.

Para el género *Lepidochelys*, se ha reportado que en las poblaciones con un sistema de anidación en arribada, la frecuencia de paternidad múltiple será mayor que en poblaciones con anidación en solitario Jensen *et al.* (2006). Estas diferencias se atribuyen a características como:

- 1) La proporción sexual operacional, es decir, el número de machos y hembras de una población sexualmente maduros que se aparean.
- 2) Intervalo interanidatorio, el tiempo entre eventos anidatorios de la hembra dentro de una temporada de apareamiento. Se sugiere que el periodo interanidatorio de las hembras que anidan en arribada es mayor que el de las hembras que anidan en solitario. Se ha descrito que las hembras con anidación

masiva presentan periodos interanidatorios de más de 25 días, mientras que en las de anidación en solitario el periodo es de 14 días aproximadamente. Se sabe que el tiempo que transcurre entre la cópula y el desove es de dos semanas. Esto sugiere que los individuos que presentan anidación en arribada potencialmente podrían tener un mayor número de cópulas que los de anidación en solitario (Jensen *et al.* 2006).

3) Almacén espermático, podría estar favorecido por el periodo interanidatorio y por la disponibilidad de machos durante el apareamiento. Por lo que se sugiere que en las hembras con anidación en arribada el tiempo de almacén de las diferentes cargas espermáticas es mayor que en las hembras con anidación en solitario (Jensen *et al.* 2006). Es así, que el tiempo de almacén espermático favorecería la fecundación de una mayor cantidad de óvulos.

La frecuencia de paternidad múltiple encontrada en los 8 nidos pertenecientes a Maruata que es una playa con anidación en solitario fue de 100%, es decir, en todos los nidos se presentó la participación de más de un progenitor. Este resultado es contrario a lo descrito en otros estudios con anidación en solitario. Jensen *et al.* (2006) describió que en poblaciones con anidación en arribada se presenta mayor frecuencia de paternidad múltiple de hasta 92% de los nidos analizados, mientras que en una población con anidación en solitario el porcentaje de paternidad múltiple fue de 30%, el autor atribuye este resultado contrastante a las modalidades de anidación. Hoekert *et al.* (2002) describieron que la frecuencia de paternidad múltiple en una población con anidación en solitario fue de 20% en 10 nidos, mientras que Cortés (2006) reportó la frecuencia de 100% en nidos de una población con anidación en arribada de *L. olivacea*.

Los resultados del presente estudio podrían estar explicados por la cercanía geográfica de Maruata (anidación en solitario), con Ixtapilla (anidación en arribada); la distancia entre estos sitios es de 25 km. Esto sugiere que los individuos que anidan en Maruata forman parte de la población que anida en Ixtapilla. Debido a la filopatría que presentan las hembras de esta especie. Bowen *et al.* (1998), reportaron que el rango de filopatría puede presentarse en sitios con una distancia máxima de 100 km y proponen que las poblaciones de *L. olivacea* conforman un continuo en las costas del Océano Pacífico. El estudio de Shanker *et al.* (2004), con DNA mitocondrial en individuos de *L. olivacea* de

Orissa en la India, reportaron que las diferentes poblaciones que anidan en tres sitios conforman un continuo debido a que su reproducción es panmíctica.

El análisis de paternidad demostró la contribución de dos y hasta cuatro machos en la progenie de cada nido. Sin embargo, existió la contribución de un macho predominante en cada nido. El nido con mayor número de machos implicados en generar progenie fue el 5 con 4 machos y en el nido 15 solo 2 machos. En los 6 nidos restantes se encontró paternidad múltiple de 3 machos por nido. Este resultado es consistente con lo descrito por Jensen *et al.* (2006), quienes reportaron de uno hasta 3 machos por nido en una población de *Lepidochelys olivacea* con anidación en solitario. En la fertilización de los nidos se observó la participación mayoritaria de un macho en cada nido, denominándolo “macho primario”. Sin embargo, no existieron genotipos paternos compartidos entre los nidos. Respecto a esto se han propuesto tres hipótesis que podrían explicar la contribución mayoritaria de un macho al nido. Una explicación es la presencia de apareamientos múltiples debido al acceso en la cópula de un macho de mejor calidad genética que otro. Otra, describe el costo de resistir a la cópula de las hembras, si el costo es mayor a la copula entonces se presentara mayor frecuencia de apareamientos múltiples (Lee y Hays 2004). Y la tercera tiene que ver con el tiempo de cópula de un macho con respecto a otro o a otros, lo que le permite remover una carga espermática anterior y/o depositar exitosamente el semen que potencialmente fertilizará la mayor parte de los óvulos.

Con respecto al orden de fertilización se encontró que en los 8 nidos se presentó un patrón de fertilización en desorden (Figura 4), este resultado es consistente con lo descrito por Lara-De La Cruz (2011). Esto sugiere que en las hembras de esta población de *Lepidochelys olivacea* las cargas espermáticas que se alojan en el oviducto conforman una mezcla y no se mantienen en unidades fragmentadas por alguna barrera física o mecánica. Esto podría estar explicado porque durante el proceso de fertilización el oviducto aumenta de tamaño y grosor (Wyneken 2004) por lo que las cargas espermáticas de los diferentes machos podrían no mantenerse separadas conforme el orden de cópula. Por el contrario, en especies de tortugas dulceacuícolas se han identificado túbulos especializados en el almacén espermático mientras que en tortugas marinas no existe una regionalización especializada en el almacén espermático (Gist y Congdon 1998).

La competencia sexual esta explicada en dos sentidos: 1) Competencia intrasexual: es aquella que ocurre entre individuos del mismo sexo, dentro de las conductas precopulatorias de las tortugas marinas se ha observado la competencia entre los machos por la cópula. Esto sugiere que las hembras podrían ser favorecidas por la competencia intrasexual como un primer nivel de selección precopulatorio. 2) Competencia intersexual: cuando los miembros de un sexo determinan cuál individuo del sexo opuesto tiene oportunidad de copular. Dado que en este estudio se encontró que el patrón de fertilización fue en desorden, esto podría sugerir que el efecto de la competencia intersexual específicamente la elección críptica podría estar imposibilitada o disminuida en su efecto en la elección de pareja tal y como lo sugieren Lee y Hays (2004).

## **6.2 Estimadores de adecuación de hembras**

Algunos de los estimadores de adecuación de las hembras presentaron una relación positiva con el número de machos que fertilizaron los nidos, por ejemplo; el porcentaje de eclosión y el tamaño de la hembra (LCC). En este sentido Zbinden *et al.* (2007) reportaron que en *Caretta caretta* se encontró una relación positiva entre el número de machos implicados en la fertilización de un nido y el tamaño de la hembra, es decir, que la cantidad de machos que fertilizan un nido aumenta conforme el tamaño de la hembra. Sin embargo, existen otros estudios (Lee y Hays 2004 y Lara-De La Cruz 2011) en los que se describe que no existe relación positiva entre el número de machos que fertilizan un nido y la capacidad reproductiva de las hembras. Sin embargo, en el sistema de apareamiento poliándrico se sugiere que existen beneficios que mejoran los valores indirectos de adecuación de las hembras o de su progenie.

## **6.3 Estimadores de adecuación en crías**

El número de machos implicados en la progenie presentó una relación negativa con los estimadores de adecuación de las crías, como: peso y vigor. En cuanto a la característica del peso, se encontraron diferencias significativas entre los nidos de acuerdo con el número de padres (machos) implicados en la progenie, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el peso de las crías con genotipo paterno en común.

Las crías de los nidos 2 y 5 presentaron los promedios más bajos de peso, en un análisis estadístico se demostró que existe una relación negativa entre el número de crías y el peso. Esto podría estar explicado por el espacio del oviducto de las hembras disponible para cierto número de huevos, que estaría disminuido al fertilizar mayor cantidad de huevos. Las crías de los nidos que presentaron mayor peso fueron las de los nidos: 10, 14 y 15 cabe mencionar que estos nidos estuvieron conformados por una menor cantidad de crías.

En cuanto al vigor medido en términos de tiempo de reincorporación, se presentaron también diferencias significativas entre los nidos. Las crías que tardaron más tiempo en reincorporarse fueron las de los nidos 5, 7 y 14 mismos que presentaron menor cantidad de crías y mayor peso promedio. Mientras que las crías de los nidos 2 y 5 presentaron mayor cantidad de crías, menor peso promedio y el tiempo de la prueba de vigor fue menor. El análisis estadístico mostro que no existe una correlación entre el número de crías y el vigor de estas Sin embrago, en un análisis posterior se demostró una relación positiva entre el peso y el vigor de las crías es decir, que a mayor peso de las crías mayor fue el tiempo que requirió una cría para llevar a cabo su reincorporación sobre el plastrón.

Referente al resultado del análisis de morfometría se encontraron diferencias significativas entre y dentro de los nidos. El análisis mostró que las diferencias se mantienen de acuerdo al número de padres y dentro de cada nido también existen diferencias entre las crías con un genotipo paterno en común. El análisis de morfometría geométrica muestra diferencias sutiles en la forma del caparazón. Este resultado es consistente con lo descrito por Lara-De La Cruz (2011) quienes describen diferencias en la forma del caparazón de las crías de 15 nidos de *Chelonia mydas*.

La característica de morfometría del caparazón si presentó diferencias significativas de acuerdo al orden de fertilización del nido. Se realizaron análisis estadísticos para comprobar si las características de peso, vigor y morfometría presentaban diferencias de acuerdo al orden de fertilización. En cuanto al peso y vigor no se encontraron diferencias.

## 7. CONCLUSIONES

1. La frecuencia de paternidad múltiple encontrada en este estudio fue del 100% para un sitio con anidación en solitario. El número de machos implicados en la paternidad de las crías presentó una relación positiva con algunas de las características reproductivas de las hembras, como: porcentaje de eclosión y LCC.
2. Los estimadores de adecuación de las crías, (como el peso) presentó una relación negativa con el número de crías, mientras que el vigor tuvo una relación positiva con el peso: a mayor peso de las crías mayor tiempo de reincorporación. El vigor no presentó relación con el número de crías. Las características de peso y vigor también mostraron una relación negativa con el número de padres. A mayor número de machos implicados en la paternidad de un nido menor peso y menor tiempo de reincorporación. La morfometría del caparazón mostró relación con un genotipo paterno en particular dentro de cada nido.
3. Se presentó un patrón desordenado en el proceso de fertilización. Esto podría sugerir que no existe un mecanismo fisiológico que posibilite la capacidad de conservar separadas las distintas cargas espermáticas en el oviducto. Dentro de los mecanismos de selección sexual, la selección intrasexual podría presentarse con mayor intensidad que la selección intersexual la cual incluye la elección crítica y por lo tanto ser un evento de menor impacto en la elección de pareja

## 8. REFERENCIAS

- Albavera, E. 2008. Comentario personal. Comisión Mexicana de la Tortuga. Playa de Ixtapilla, Municipio de Aquila, Michoacán.
- Aggarwal, R.K., T.P. Velavan, D. Udaykumar, P.S. Hendre, K. Shanker y L. Singh. 2004. Development and characterization of novel microsatellite markers from the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Molecular Ecology Notes* 4: 77-79.
- Aggarwal, R., Lalremruata, A., Velavan, T., Sowjanya, A y Singh, L. 2008. Development and characterization of ten novel microsatellite markers from olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Conservation Genetics*. 9:981-984.
- Aranguen-Méndez, J., J. Jordana y M. Gómez. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics Selection Evolution* 33: 243-252.
- Bollmer J.L., M.E. Irwin, J.P. Rieder y P.P. Parker. 1999. Multiple paternity in loggerhead turtle clutches. *Copeia* 2: 475-478.
- Bowen, B., Clark, A., Abreu-Grobois, F., Chaves, A., Reichart, H. y Ferl, R. 1998. Global phylogeography of the ridley sea turtles (*Lepidochelys* spp.) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genetica*. 101: 179-189.
- Chassin N., O. 2004. Variabilidad genética y paternidad múltiple de la tortuga verde del pacífico oriental (*Chelonia mydas* Linnaeus 1758). Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias Biomédicas. UNAM. México.
- Cortés R., X. 2006. Análisis de paternidad múltiple de *Lepidochelys olivacea* en la costa de Oaxaca. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. 43 pp.
- Crim, J.L., L.D. Spotila, J.R. Spotila, M. O'Connor, R. Reina, C.J. Williams y F.V. Paladino. 2002. The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea* exhibits both polyandry and polygyny. *Molecular Ecology* 11: 2097-2106.
- Delmas, V., E. Baudry, M. Girondot y A.C. Prevot-Julliard. 2007. The righting response as a fitness index in freshwater turtles. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 99-109.
- Davis, A.K., y A.M. Grosse. 2008. Measuring fluctuating asymmetry in plastron scutes of yellow-bellied sliders: the importance of gender, size and body location. *The American Midland Naturalist* 159: 340-348.

- Dufour, K.W., y P.J. Weatherhead. 1998. Bilateral symmetry and social dominance in captive male red-winged blackbirds. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42: 71-76.
- Dutton, P.H. 1997. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies. In: *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum 396. 173 pp.
- Dutton, P.H., y S.K. Davis. 1998. Use of molecular genetics to identify individuals and infer mating behavior in leatherbacks. In: *Proceedings of the Sixteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-412. 158pp.
- FitzSimmons, N., C. Moritz y S.S. Moore. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 12: 432-440 pp.
- FitzSimmons, N. 1996. Use of microsatellite loci to investigate multiple paternity in marine turtles. In: *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. 173 pp.
- FitzSimmons, N. 1998. Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology* 7: 575-84.
- Frankel, O., Soulé, M. 1992. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, 327pp.
- Frankham, R., Ballou, J., y Briscoe, D. 2003. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, 617p.
- Gist, D., y Congdon, J. 1998. Oviductal sperm storage as a reproductive tactic of turtles. *The journal of experimental zoology*. 282: 526-534.
- Harry, J.L. y D.A. Briscoe. 1988. Multiple paternity in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Journal of Heredity* 79: 96-99.
- Hoekert, W.E.J., H. Neuféglise, A.D. Schouten y S.B.J. Menken. 2002. Multiple paternity and female biased mutation at a microsatellite locus in the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Heredity* 89: 107-113.

- Ireland, J.S., A.C. Broderick, F. Glen, B.J. Godley, G.C. Hays, P.L.M. Lee y D.O.F. Sivinski. 2003. Multiple paternity assessed using microsatellite markers, in green turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 291: 149-160.
- Jennions, M., y Petrie, M. 2000. Why do female mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews* 75: 21-64.
- Jensen, M.P., A. Abreu-Grobois; J. Frydenberg y V. Loeschcke. 2006. Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley rookeries. *Molecular Ecology* 15: 2567-2575.
- Jones, A.G. 2005. GERUD 2.0 A computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes* 5: 708-711.
- Joseph, J. y Shaw, P. 2011. Multiple paternity in egg clutches of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*). *Conservation Genetics*. 12: 601-605.
- Karl, S. 2008. The effect of multiple paternities on the genetically effective size of a population. *Molecular Ecology*. 17: 3973-3977.
- Kichler, L., M.T. Holder, S.K. Davis, M.R. Márquez y D.W. Owens. 1999. Detection of multiple paternities in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling. *Molecular Ecology* 8: 819-830.
- Lara-De La Cruz, L.I., K. Oyama, H. Cano-Camacho, M.G. Zavala-Paramo, G. Vázquez-Marrufo y O. Chassin-Noria. 2010. Detecting patterns of fertilization and frequency of multiple paternities in *Chelonia mydas* of Colola (Michoacán, México). *Hidrobiológica* 20: 85-89.
- Lara-De La Cruz, L.I. 2011. Paternidad múltiple y adecuación de *Chelonia mydas*. Tesis de maestría. Maestría en Ecología. UNAM. México.
- Lee, P.L.M., y G.C. Hays. 2004. Polyandry in a marine turtle: females make the best of a bad job. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 6530-6535.
- Lutz, P.L., y J.A. Musick. 1997. *The biology of sea turtles*. CRC Press, Inc. U.S.A. 432 pp.
- Márquez, R. 1996. *Las tortugas marinas y nuestro tiempo*. Fondo de Cultura Económica. México. 197 pp.

- Moore, M.K. y R.M. Ball Jr. 2002. Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nest on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 11: 281-8.
- Morera, L., D.F. De Andrés, M. Barbancho, J. J. Garrido y C. J. Barba. 1999. Detección de variabilidad genética por microsatélites en el alano español. *Archivos de Zootecnia*
- Mortimer, J.A. 2000. Reducción de las amenazas a los huevos y a las crías: Los viveros. En: Eckert, K.L, K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois, M. Donnelly (Eds.). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas. Publicación No. 4, 2000 (Traducción al español). 265 pp.
- Nieto-Ortiz., O.R. 2010. Paternidad múltiple de tortuga negra (*Chelonia mydas*) en una playa con baja densidad de anidación. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. 51 pp.
- Owens, D. W., y G. J. Ruiz. 1980. New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica* 36: 17-20.
- Pearse, D.E., y J.C. Avise. 2001. Turtle mating systems: behavior, sperm storage, and genetics paternity. *Journal of Heredity* 92: 206-211.
- Pearse, D., Janzen, F. y Avise, J. 2002. Multiple paternity, sperm storage, and reproductive success of female and male painted turtles (*Chrysemys picta*) in nature. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 51: 164-171.
- Rieder, J.P., P.G. Parker, J.R. Spotila y M.E. Irwin. 1998. The mating system of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*): a molecular approach. In: *Proceedings of the Sixteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-412. 158 pp.
- Rohlf, F.J. 2005. TpsDig: digitize landmarks and outilines. Ver. 2.04. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook, NY.
- Shanker, K., Ramadevi, J., Choundhury, B., Singh, L. y Aggarwall, K. 2004. Phylogeography of olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) on the east coast of India: implications for conservation theory. *Molecular Ecology*. 13: 1899-1909.
- Sivinski, J. 1984. Sperm in competition. In: Smith, R.L. (Ed.). *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic press New York. 85-115 pp.

- Tautz, D. 1989. Hipervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6470.
- Theissinger, K., N.N. FitzSimmons, C.J. Limpus, C.J. Parmenter y A.D. Phillott. 2009. Mating system, multiple paternity and effective population size in the endemic flatback turtle (*Natator depressus*) in Australia. *Conservation Genetics* 10: 329-346.
- Uller, T., y Olsson, M. 2008. Multiple paternities in reptiles: patterns and processes. *Molecular Ecology*. 17:2566-2580.
- Wyneken, J. 2004. La anatomía de las tortugas marinas. U. S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 172 pp. (Versión en español de Wyneken, J. 2001. *The Anatomy of Sea Turtles*. U. S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, 172 pp.).
- Zbinden, J.A., C.R. Largiader, F. Leippert, D. Margaritoulis y R. Arlettaz. 2007. High frequency of multiple paternity in the largest rookery of mediterranean loggerhead sea turtles. *Molecular Ecology* 16: 3703-3711.

## 9. ANEXO I

**Tabla 8.** Genotipos de las crías del nido 2 (crías 91 – 233) Los distintos tonos de gris representan diferentes genotipos paternos en los nidos, son de machos diferentes en cada nido en cada nido.

Cria	Genotipo				
	Or1	Or2	Or7	Or8	
Nido 2	92	158 /174	150 /168	194 /194	144 /152
	93	158 /174	162 /168	194 /194	144 /152
	94	174 /174	150 /170	194 /194	144 /152
	95	146 /174	150 /168	194 /194	144 /148
	99	158 /174	150 /170	194 /196	144 /148
	101	146 /174	150 /168	194 /196	144 /152
	112	146 /158	150 /168	194 /196	144 /148
	113	146 /174	150 /170	194 /196	152 /158
	119	146 /174	150 /170	194 /194	144 /152
	121	146 /174	162 /162	194 /194	148 /158
	124	146 /174	162 /168	194 /194	152 /158
	125	146 /174	162 /168	194 /196	144 /152
	126	146 /174	162 /170	194 /196	144 /152
	131	146 /174	150 /170	194 /194	144 /148
	134	146 /174	162 /170	194 /194	144 /152
	136	146 /174	150 /168	194 /194	144 /152
	141	146 /174	162 /168	194 /194	144 /152
	145	146 /174	150 /170	194 /196	144 /152
	147	146 /174	162 /170	194 /194	144 /152
	148	146 /174	150 /168	194 /196	152 /152
	155	146 /158	150 /168	194 /196	148 /152
	159	146 /158	162 /170	194 /194	152 /158
	161	146 /174	162 /170	194 /194	148 /152
	164	146 /158	150 /170	194 /194	148 /158
	170	146 /174	162 /170	194 /196	144 /152
	171	146 /158	150 /168	194 /196	148 /152
	173	146 /174	162 /170	194 /196	148 /158
	174	158 /174	150 /168	194 /194	148 /152
	175	158 /174	162 /168	194 /196	152 /158
	176	146 /174	162 /170	194 /196	148 /158
	178	158 /174	162 /168	194 /194	148 /158
	180	158 /174	150 /168	194 /194	152 /158
	181	146 /174	150 /168	194 /194	148 /152
	183	146 /158	150 /168	194 /194	148 /152
	187	146 /174	150 /170	194 /196	148 /152
	188	146 /158	150 /168	194 /196	148 /158
	192	146 /174	150 /168	194 /194	148 /152
	194	158 /174	150 /168	194 /194	144 /148
	200	146 /174	150 /170	194 /196	148 /158
	203	158 /174	150 /168	194 /194	152 /158
	213	146 /158	162 /170	194 /194	144 /152
	214	146 /158	162 /168	194 /194	144 /152
	218	146 /158	150 /168	194 /194	144 /152
	219	146 /158	150 /170	194 /196	144 /152
	232	158 /174	150 /168	194 /194	144 /152
	233	146 /158	150 /170	194 /194	148 /152

**Tabla 9.** Genotipos de las crías del nido 4 (crías 342-421) Los distintos tonos de gris representan diferentes genotipos paternos y son independientes en cada nido.

Cría	Genotipo			
	Or1	Or2	Or7	Or8
<b>Nido 4</b> 346	146 /150	150 /150	196 /206	150 /158
348	146 /150	150 /170	196 /206	140 /150
351	150 /162	150 /150	196 /206	150 /158
352	150 /150	150 /150	196 /206	140 /150
353	146 /150	150 /150	196 /206	150 /158
355	146 /170	170 /170	206 /206	140 /150
356	150 /170	150 /150	196 /206	150 /150
358	146 /162	150 /170	196 /206	150 /150
360	146 /170	150 /170	196 /212	140 /150
361	150 /162	150 /170	206 /206	140 /150
362	146 /170	150 /170	196 /196	150 /150
365	150 /170	150 /150	196 /206	140 /158
366	146 /150	150 /170	196 /206	150 /150
367	146 /162	150 /150	206 /212	140 /158
368	150 /170	150 /150	196 /196	150 /150
376	146 /162	150 /170	196 /196	140 /150
377	150 /170	150 /150	196 /196	150 /150
378	150 /170	150 /150	196 /206	150 /158
380	146 /150	150 /172	196 /206	140 /158
381	146 /150	150 /170	196 /206	140 /150
383	146 /162	150 /170	196 /196	150 /158
385	150 /150	150 /150	196 /206	150 /150
387	146 /150	150 /170	196 /206	150 /158
391	150 /162	150 /170	196 /206	150 /158
393	150 /170	170 /170	206 /212	150 /150
396	146 /170	170 /170	196 /196	140 /150
397	146 /150	150 /170	196 /206	150 /158
398	150 /170	170 /170	196 /212	140 /150
399	146 /150	150 /170	196 /196	140 /150
405	150 /170	150 /170	196 /206	158 /158
408	150 /170	150 /150	206 /212	140 /150
410	146 /170	150 /150	196 /206	140 /150
412	146 /162	150 /170	196 /206	140 /158
413	146 / 146	150 /150	196 /206	140 /150
414	150 /150	150 /170	196 /206	140 /150
415	150 /162	150 /170	206 /212	140 /150

**Tabla 10.** Genotipos de las crías del nido 5 (crías 422 –545) Los distintos tonos de gris representan diferentes genotipos paternos en los nidos y son independientes en cada nido.

Cría	Genotipo				
	Or1	Or2	Or7	Or8	
<b>Nido 5</b>	447	154 /154	164 /168	196 /196	148 /150
	454	150 /154	150 /164	196 /208	148 /150
	455	150 /170	164 /170	196 /208	150 /160
	457	154 /170	164 /168	196 /208	150 /150
	458	154 /154	164 /170	196 /208	150 /150
	460	154 /154	150 /164	196 /196	150 /150
	461	154 /150	164 /170	196 /208	148 /150
	462	154 /170	164 /168	196 /196	148 /150
	463	154 /154	164 /170	196 /202	148 /150
	464	154 /154	164 /168	196 /208	148 /160
	465	154 /154	164 /170	196 /206	148 /150
	467	154 /154	164 /168	196 /196	150 /150
	471	154 /154	164 /170	196 /208	148 /150
	474	154 /154	164 /168	196 /206	148 /150
	476	154 /170	164 /170	196 /208	150 /160
	479	154 /170	164 /168	196 /208	148 /150
	481	154 /170	164 /170	196 /208	150 /160
	482	150 /154	162 /164	196 /208	148 /150
	486	154 /170	164 /168	196 /208	148 /150
	489	154 /170	162 /164	196 /208	148 /150
	493	154 /170	150 /164	196 /208	148 /160
	494	154 /154	164 /170	196 /208	150 /152
	495	154 /170	164 /168	196 /208	150 /150
	501	154 /170	162 /164	196 /196	150 /150
	502	154 /154	162 /164	196 /196	150 /160
	503	154 /154	164 /170	196 /196	150 /160
	504	154 /170	164 /168	196 /208	150 /160
	507	154 /170	164 /170	196 /208	150 /160
	508	154 /154	164 /168	196 /208	150 /150
	510	154 /154	164 /170	196 /208	150 /160
	514	154 /154	164 /168	196 /208	150 /160
	515	154 /170	164 /170	196 /208	150 /160
	516	170 /170	164 /168	196 /208	150 /160
	518	154 /170	164 /170	196 /196	150 /160
	519	154 /170	164 /168	196 /196	150 /152
	521	154 /154	164 /170	196 /208	150 /160
	523	154 /154	164 /168	196 /208	152 /160
	524	154 /154	164 /170	196 /208	150 /160
	526	170 /170	164 /170	196 /208	150 /160
	528	170 /170	164 /170	196 /196	150 /160
	529	170 /170	164 /168	196 /196	150 /160
	531	154 /170	164 /170	196 /208	150 /160
	534	154 /170	164 /170	196 /208	150 /160
	535	154 /154	164 /168	196 /208	150 /160
	538	154 /170	164 /168	196 /208	150 /160

**Tablas 11.** Genotipos de las crías del nido 7 (crías 818-884) Los distintos tonos de gris representan diferentes genotipos paternos y son independientes en cada nido.

Cría	Genotipo			
	Or1	Or2	Or7	Or8
<b>Nido 7</b> 819	150 /162	166 /168	196 /210	148 /152
821	162 /162	166 /166	196 /210	152 /160
822	158 /162	150 /166	194 /210	152 /160
823	158 /158	166 /168	196 /196	152 /160
824	162 /162	150 /166	194 /210	148 /152
827	150 /162	150 /168	194 /210	148 /152
828	150 /162	150 /166	194 /210	148 /152
829	150 /162	166 /168	196 /210	148 /152
830	162 /162	150 /166	196 /196	148 /152
831	150 /162	166 /166	196 /210	148 /160
832	150 /162	150 /150	196 /210	152 /160
833	150 /162	150 /168	194 /196	148 /152
834	162 /162	166 /168	194 /210	148 /160
838	158 /162	150 /166	196 /196	148 /160
839	150 /162	150 /166	196 /210	148 /160
840	150 /162	150 /166	194 /210	148 /160
841	150 /162	150 /166	196 /210	148 /160
842	162 /162	150 /166	196 /210	152 /152
843	158 /170	150 /166	196 /210	148 /160
844	162 /170	166 /166	194 /196	148 /152
845	150 /162	166 /166	194 /196	148 /152
846	158 /162	150 /168	194 /196	148 /152
849	150 /158	166 /166	196 /210	148 /152
850	150 /158	150 /166	196 /210	152 /160
851	158 /170	166 /168	196 /210	148 /152
857	158 /162	150 /166	194 /196	148 /152
859	150 /162	150 /168	196 /210	152 /160
860	150 /162	166 /168	194 /196	152 /160
861	150 /162	150 /150	194 /196	152 /160
862	158 /162	150 /150	194 /196	148 /152
864	162 /162	166 /166	196 /210	148 /152
868	150 /162	166 /166	196 /210	152 /160
869	150 /162	166 /166	194 /196	152 /160
870	162 /162	150 /166	196 /210	148 /152
877	150 /162	150 /166	196 /210	148 /152
881	150 /162	150 /166	194 /196	148 /152
884	162 /162	150 /166	196 /210	148 /152

**Tabla 12.** Genotipos de las crías del nido 10 (crías 935 – 1048) Los distintos tonos de gris representan diferentes genotipos paternos y son independientes en cada nido

Cría	Genotipo			
	Or1	Or2	Or7	Or8
<b>Nido 10</b> 935	146 /150	150 /150	194 /196	150 /156
936	146 /150	150 /170	196 /206	148 /150
939	146 /162	150 /160	196 /206	148 /150
941	146 /162	150 /170	194 /206	150 /156
946	146 /150	150 /170	196 /206	150 /156
948	146 /162	150 /170	194 /206	148 /150
952	146 /162	150 /150	194 /194	148 /156
954	146 /162	150 /150	196 /206	148 /156
956	146 /162	150 /150	194 /206	148 /156
958	146 /162	150 /170	194 /196	148 /150
959	146 /150	150 /170	194 /196	148 /150
960	146 /162	150 /170	196 /206	148 /150
962	146 /162	150 /170	194 /206	150 /156
970	146 /162	150 /170	194 /206	150 /156
971	146 /162	150 /170	196 /196	148 /150
973	146 /162	150 /150	194 /196	148 /150
975	146 /146	150 /170	194 /196	148 /150
977	146 /162	150 /170	194 /196	148 /150
979	146 /162	150 /170	194 /196	148 /150
981	146 /162	150 /160	194 /196	148 /150
983	146 /162	150 /150	194 /206	150 /156
984	146 /150	150 /170	194 /196	148 /150
986	146 /150	150 /160	194 /196	150 /156
987	146 /162	150 /170	194 /196	148 /150
988	146 /162	150 /160	196 /206	148 /156
989	146 /162	150 /160	194 /196	148 /150
992	146 /162	150 /170	194 /196	148 /150
997	146 /162	150 /170	194 /194	148 /150
999	146 /162	150 /170	194 /206	148 /150
1000	146 /146	150 /150	194 /194	148 /156
1001	146 /162	150 /170	194 /206	148 /150
1002	146 /162	150 /150	194 /206	148 /156
1005	146 /162	150 /170	196 /206	148 /150
1006	146 /162	150 /150	196 /206	148 /150
1007	146 /162	150 /170	194 /206	150 /150
1008	146 /162	150 /150	194 /206	148 /150
1013	146 /162	150 /170	194 /194	148 /156
1015	146 /162	150 /150	194 /206	148 /150
1016	146 /162	150 /170	194 /196	148 /156
1017	146 /162	150 /160	196 /206	148 /150
1019	146 /146	150 /170	194 /194	148 /150
1027	146 /162	150 /170	194 /194	150 /156
1030	146 /150	150 /170	194 /196	148 /156
1034	146 /162	150 /170	194 /196	148 /150
1036	146 /162	150 /160	194 /196	148 /156
1044	146 /150	150 /170	194 /196	148 /156
1046	146 /150	150 /150	194 /206	148 /150

**Tabla 13.** Genotipos de las crías del nido 12 (crías 1119-1204) Los distintos tonos de gris representan diferentes genotipos paternos y son independientes en cada nido.

Cría	Genotipo			
	Or1	Or2	Or7	Or8
<b>Nido 12</b> 1121	150 /150	150 /150	194 /210	148 /152
1123	150 /154	162 /166	194 /204	148 /156
1128	154 /170	166 /166	194 /204	148 /152
1129	154 /170	166 /166	194 /210	148 /156
1130	150 /154	150 /166	194 /204	148 /152
1131	150 /170	150 /166	194 /204	156 /156
1132	150 /170	166 /166	194 /204	152 /156
1134	154 /170	150 /166	194 /204	152 /152
1139	150 /150	150 /162	194 /204	148 /152
1141	150 /150	162 /166	194 /204	148 /156
1142	150 /170	162 /166	194 /204	152 /15
1144	150 /150	162 /166	194 /204	152 /156
1145	150 /154	150 /166	194 /204	152 /156
1146	154 /170	150 /150	194 /204	152 /156
1147	150 /154	150 /166	194 /194	148 /156
1150	150 /170	150 /166	194 /194	148 /156
1151	170 /170	150 /162	194 /204	152 /156
1152	154 /170	150 /166	194 /204	148 /156
1153	154 /170	162 /166	194 /194	148 /152
1159	154 /170	150 /166	194 /194	148 /156
1161	154 /170	166 /166	194 /194	148 /156
1163	154 /170	150 /166	194 /204	148 /152
1164	154 /170	150 /150	194 /210	152 /156
1165	150 /154	166 /166	194 /204	148 /152
1169	170 /170	162 /166	194 /204	148 /152
1171	150 /170	150 /166	194 /210	148 /152
1172	150 /150	150 /162	194 /204	148 /152
1174	150 /170	162 /166	194 /204	148 /152
1176	154 /170	150 /166	194 /194	148 /152
1177	150 /150	166 /166	194 /204	156 /156
1182	154 /170	150 /166	194 /194	148 /156
1188	154 /170	150 /166	204 /204	148 /156
1190	150 /154	150 /162	194 /204	148 /156
1191	150 /150	150 /166	194 /194	148 /156
1193	150 /154	150 /162	194 /194	148 /156
1194	150 /170	150 /162	194 /194	148 /152
1196	150 /150	150 /166	194 /204	148 /152
1200	154 /170	150 /166	194 /194	148 /152
1202	154 /170	166 /166	194 /194	148 /152

**Tablas 14.** Genotipos de las crías del nido 14 (cría 1205 – 1293) Los distintos tonos de gris representan diferentes genotipos paternos y son independientes en cada nido.

Cría	Genotipo			
	Or1	Or2	Or7	Or8
<b>Nido 14</b> 1204	158 /158	150 /168	190 /210	150 /150
1207	158 /166	150 /170	190 /210	148 /150
1208	158 /166	150 /170	190 /210	148 /150
1209	150 /158	150 /170	190 /210	148 /156
1210	158 /166	150 /150	190 /206	148 /156
1212	150 /158	150 /168	190 /210	148 /150
1213	150 /166	150 /170	190 /210	148 /150
1214	158 /166	150 /170	190 /206	150 /156
1215	158 /166	150 /170	210 /210	148 /156
1216	158 /158	150 /170	190 /206	148 /156
1217	158 /166	150 /170	190 /206	148 /150
1219	158 /158	150 /170	190 /206	148 /156
1220	150 /158	150 /170	190 /210	148 /156
1221	150 /158	150 /170	190 /206	148 /156
1223	150 /166	150 /170	190 /210	150 /156
1230	150 /158	150 /168	206 /210	148 /156
1231	158 /166	150 /168	206 /210	148 /156
1233	158 /166	150 /166	210 /210	148 /150
1234	158 /166	150 /170	210 /210	148 /156
1235	158 /166	150 /170	190 /210	150 /156
1238	150 /158	150 /170	190 /206	150 /156
1239	150 /158	150 /170	190 /206	150 /156
1242	158 /166	150 /170	190 /206	150 /156
1243	150 /158	150 /170	190 /210	150 /156
1244	158 /166	150 /168	190 /210	150 /156
1245	150 /166	150 /170	190 /210	150 /156
1247	158 /166	150 /170	190 /206	148 /156
1248	150 /158	150 /168	190 /206	148 /150
1250	150 /158	150 /170	190 /206	150 /156
1253	150 /158	150 /170	210 /210	148 /156
1255	158 /166	150 /168	210 /210	148 /156
1258	158 /166	150 /168	190 /206	148 /156
1259	158 /166	150 /170	190 /210	148 /156
1260	158 /166	150 /168	210 /210	150 /156
1265	150 /158	150 /168	190 /206	150 /156
1269	166 /166	150 /170	190 /210	150 /156
1273	150 /158	150 /170	190 /206	148 /156
1274	158 /166	150 /170	190 /210	148 /156
1278	150 /158	150 /170	190 /206	148 /156
1284	150 /158	150 /170	190 /210	150 /156
1288	150 /166	150 /170	190 /210	148 /156
1292	158 /166	150 /170	190 /210	148 /150

**Tabla 15.** Genotipos de las crías del nido 15 (crías 1294-1421) Los distintos tonos de gris representan diferentes genotipos paternos y son independientes en cada nido.

Cría	Genotipo			
	Or1	Or2	Or7	Or8
<b>Nido 15</b> 1295	146 /154	150 /164	204 /206	144 /160
1296	146 /154	150 /164	194 /206	152 /160
1297	146 /154	150 /164	194 /206	144 /152
1299	154 /170	150 /164	194 /204	144 /150
1300	154 /170	150 /164	194 /206	144 /150
1303	146 /154	150 /164	194 /206	144 /150
1305	146 /154	150 /164	194 /206	152 /160
1306	146 /154	150 /164	194 /204	152 /160
1307	146 /170	150 /164	194 /206	144 /150
1308	146 /170	150 /164	194 /204	144 /152
1311	146 /170	150 /164	194 /204	144 /152
1313	146 /170	150 /164	194 /204	144 /160
1315	146 /170	150 /164	194 /204	144 /160
1316	154 /154	150 /164	194 /206	144 /150
1317	146 /154	150 /164	194 /206	144 /150
1319	146 /154	150 /164	194 /204	144 /150
1322	146 /154	150 /164	194 /204	144 /150
1323	146 /154	150 /164	194 /204	150 /150
1324	146 /154	150 /164	194 /204	144 /150
1326	146 /154	150 /164	194 /204	144 /150
1335	146 /154	150 /164	194 /204	144 /150
1337	146 /154	150 /164	194 /206	144 /150
1347	154 /170	150 /164	194 /206	144 /160
1349	146 /154	150 /164	194 /206	152 /160
1354	170 /170	150 /164	194 /204	152 /160
1362	146 /154	150 /164	194 /206	144 /160
1364	154 /170	150 /164	194 /206	144 /160
1365	146 /170	150 /164	194 /204	144 /152
1367	146 /154	150 /164	194 /204	144 /150
1369	146 /170	150 /164	194 /204	144 /160
1370	146 /170	150 /164	194 /204	144 /152
1373	154 /170	150 /164	194 /206	144 /150
1375	154 /170	150 /164	194 /204	144 /160
1382	154 /154	150 /164	194 /206	152 /160
1383	146 /170	150 /164	194 /206	144 /160
1391	146 /170	150 /164	194 /206	152 /160
1399	154 /170	150 /164	194 /204	144 /152

## CAPÍTULO II

### ANÁLISIS DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA EN CRÍAS DE *Lepidochelys olivacea*

#### 1. INTRODUCCIÓN

##### 1.1 Escudos supernumerarios

La ecología evolutiva asume la existencia de variabilidad en la adecuación de las poblaciones naturales. La estimación de la adecuación es posible a través de la cuantificación de las características de sobrevivencia y reproducción. Sin embargo, en muchas especies de vertebrados es difícil obtener estos parámetros por lo que se asume que existe una relación entre el fenotipo y la adecuación, por ello la adecuación en poblaciones naturales podría ser evaluada con parámetros fenotípicos de los individuos (Delmas *et al.* 2007).

Moller y Pomiankowski (1993) proponen que si la simetría fuese un indicador de calidad, los individuos simétricos serían más exitosos en competencia intra-sexual e inter-sexual que sus contrapartes asimétricas, así como en la competencia por otros recursos. Por lo tanto la simetría podría tener implicaciones evolutivas y estar relacionada con la estabilidad genética y la adecuación. Dufour y Weatherhead (1998) realizaron un trabajo con aves y sugirieron que la simetría podría ser un indicador confiable de la calidad fenotípica y tal vez genotípica, siendo este un aspecto potencialmente importante a considerar en la selección sexual.

En las crías de tortugas acuáticas, se ha visto que la habilidad de incorporación sobre su propio caparazón es un comportamiento que podría estar relacionado con su sobrevivencia, ya que el hacerlo de manera eficiente prevendría considerablemente su exposición a los depredadores o a la deshidratación. Por lo tanto la velocidad de

incorporación (vigor) es un componente importante de adecuación de las tortugas acuáticas (Delmas *et al.* 2007).

El caparazón de las tortugas es de vital importancia para el desempeño locomotor y la sobrevivencia, se ha sugerido que la forma del caparazón puede influir en la supervivencia y adecuación de los individuos (Myers *et al.* 2006). Aunque en todas las especies de la familia Cheloniidae se sugiere que existe un número y arreglo de los escudos del caparazón con altas variaciones individuales. Dentro de las especies de tortugas marinas la especie que presenta mayor variación en el arreglo de los escudos es *Lepidochelys olivacea* (Mast y Carr 1989).

Los escudos del caparazón de las tortugas marinas son estructuras epidérmicas queratinosas que crecen encima de los huesos del caparazón. Estos pueden crecer de dos formas: aumentar de tamaño (área) en los márgenes, o bien el escudo entero aumentar en grosor. En la familia Cheloniidae los márgenes de los escudos del caparazón y las suturas de los huesos que conforman el caparazón no están alineados unos con otros (Wyneken 2004). El arreglo típico de los escudos del caparazón de *L. olivacea* es: 1 nucal, de 5 a 7 vertebrales o centrales, de 6 a 9 pares de escudos costales y más de 11 pares de escudos marginales (Pritchard y Mortimer 2000; Wyneken 2004).

Özdemir y Türkozan (2006), sugieren que las desviaciones del patrón de escudos podría estar explicado por las condiciones variables durante el desarrollo ontogenético tales como: la cantidad de oxígeno durante la incubación, las variaciones en la temperatura y el manejo de los huevos en cierta etapa del desarrollo. En la tortuga *L. olivacea* el manejo de los huevos en una cierta etapa del desarrollo es una fuente de variación en el patrón de escudos (Hill 1971, en Türkozan *et al.* 2001) Así mismo, Davis y Grosse (2008) describieron que la asimetría en tortugas dulceacuícolas está relacionada con la presencia de escudos extra en el caparazón o en el plastrón de los individuos, y existe evidencia de que esto puede ser causado por contaminación.

En un estudio realizado por Davis y Grosse (2008) se encontró que la simetría del plastrón (serie de escudos que recubren la región ventral) dependía del sexo del individuo y del tamaño. Las hembras presentaron menor desviación en la forma del plastrón que los

machos, así como los individuos adultos presentaron mayor desviación en la simetría de los mismos. Las diferencias encontradas en la forma del plastrón entre hembras y machos se presentaron particularmente en los escudos que recubren los músculos de las zonas: del húmero, del pectoral y femorales. También encontraron mayor variación en los escudos de los adultos que en los de las crías, para ello se generaron algunas hipótesis: 1) el crecimiento de los escudos, unos sobre otros, generan mayor número de suturas en individuos adultos, 2) la bio-acumulación de toxinas en los individuos podrían interferir con los procesos fisiológicos, como el crecimiento del tejido.

## 1.2 Morfometría geométrica

Los estudios de morfometría geométrica surgieron recientemente con la fusión entre la geometría y la biología. La morfología geométrica analiza la forma en un hiper-espacio que permite analizar si existen cambios morfológicos en los organismos en diferentes ambientes, diferenciar especies y estadios de desarrollo (Bookstein, 1982; Irschick *et al.* 1997). La morfometría geométrica estudia los cambios en la forma independientemente del tamaño partiendo de un conjunto de “landmarks” o puntos morfométricos. Los “landmarks” son puntos basados en coordenadas que permiten deducir la forma de los organismos y pueden tener un significado filogenético, estructural, funcional o de desarrollo (Lele y Richtsmeier 1991).

Los trabajos publicados sobre morfometría geométrica en tortugas se han realizado con especies dulceacuícolas (Claude *et al.* 2003, Valenzuela *et al.* 2004, Depecker *et al.* 2006, Myers *et al.* 2006 y Davis y Grosse 2008). En tortugas marinas existe un estudio en *Chelonia mydas*, *Caretta caretta* y *Eretmochelys imbricata* en el que analizó la articulación del hombro de los individuos, incluyeron 88 ejemplares dulceacuícolas y 11 de tortugas marinas (Depecker *et al.* 2006), en el que se concluye que la inserción de la escapula y el húmero de los individuos depende de los hábitos terrestres o acuáticos. Lara-De La Cruz (2011) realizó un estudio de morfometría geométrica de nidos con paternidad múltiple de *Chelonia mydas* en el que describe que la forma del caparazón no está relacionada con un genotipo paterno en particular. Así mismo no se encontró relación entre la forma del caparazón y la disposición y arreglo simétrico o asimétrico de los escudos.

## 2. HIPÓTESIS

1. Las crías de *Lepidochelys olivacea* de la costa michoacana presentarán una mayor variación en el patrón de distribución de escudos del caparazón, que los individuos adultos.
2. Debido a que el número y arreglo de escudos no están relacionados con la forma del caparazón se espera que no existan diferencias significativas en la forma de los caparazones de las crías con simetría respecto a los asimétricos.
3. La forma del caparazón de las crías de *L. olivacea* estará relacionada con alguno de los parámetros de adecuación de las hembras, como: LCC, tamaño de nidada y porcentaje de eclosión, o con los estimadores de adecuación de las crías (i.e peso y vigor).

## 3. OBJETIVOS

### General

Analizar la forma y disposición de los escudos del caparazón de *Lepidochelys olivacea* y describir la relación entre estas características y los estimadores de adecuación de crías y hembras.

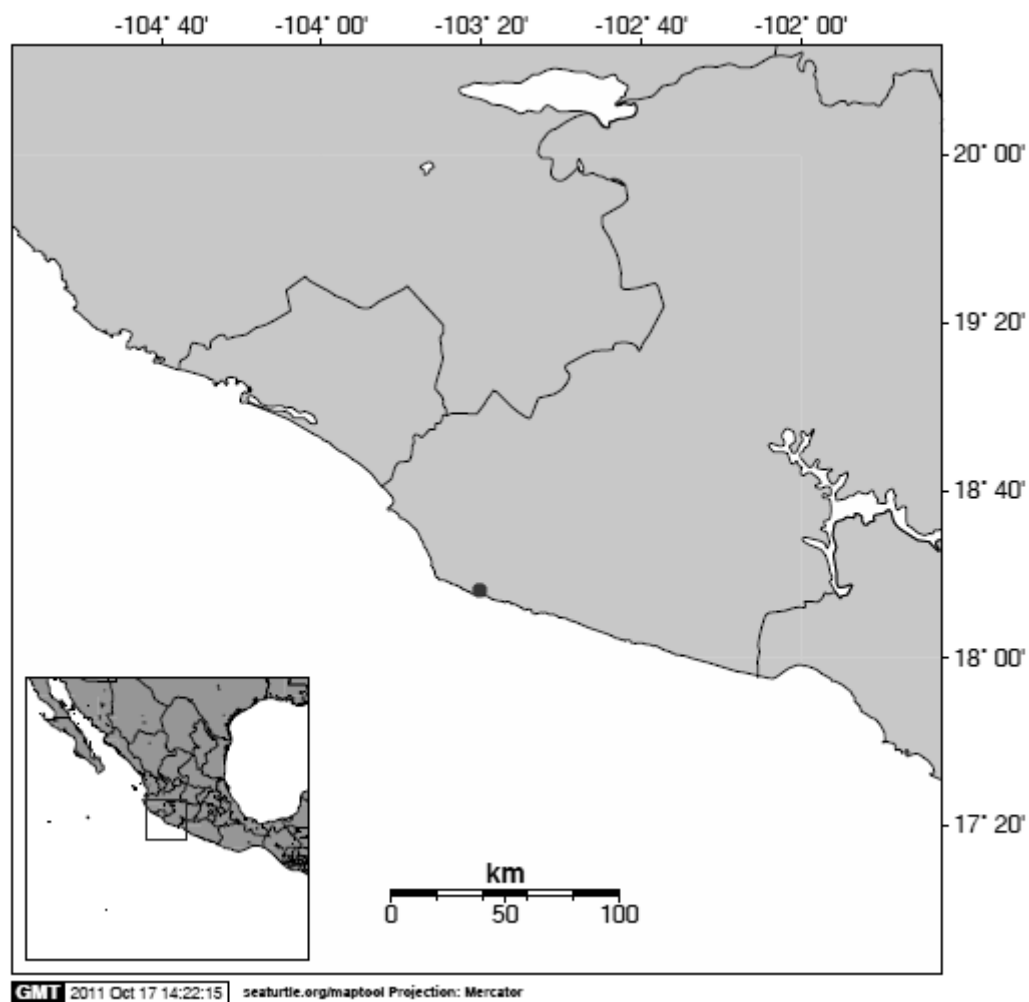
### Particulares

1. Estimar los porcentajes de individuos adultos y crías de *Lepidochelys olivacea* de Maruata, Michoacán, que presentan escudos supernumerarios.
2. Realizar un análisis de morfometría geométrica de las crías de *L. olivacea* con arreglo simétrico y asimétrico del número de escudos.
3. Evaluar la relación entre los estimadores de adecuación de las crías y hembras de *L. olivacea* con la variación en la forma de las crías.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4. 1. Trabajo de campo

La localidad de estudio fue la playa de Maruata perteneciente al municipio de Aquila, Michoacán. Localizada a los 18°16' 0" de latitud Norte y 103° 20' 0" de longitud Oeste; limita al oeste con el río Maruata y al este por el acantilado "Rincón Chiquero" (Figura 1).



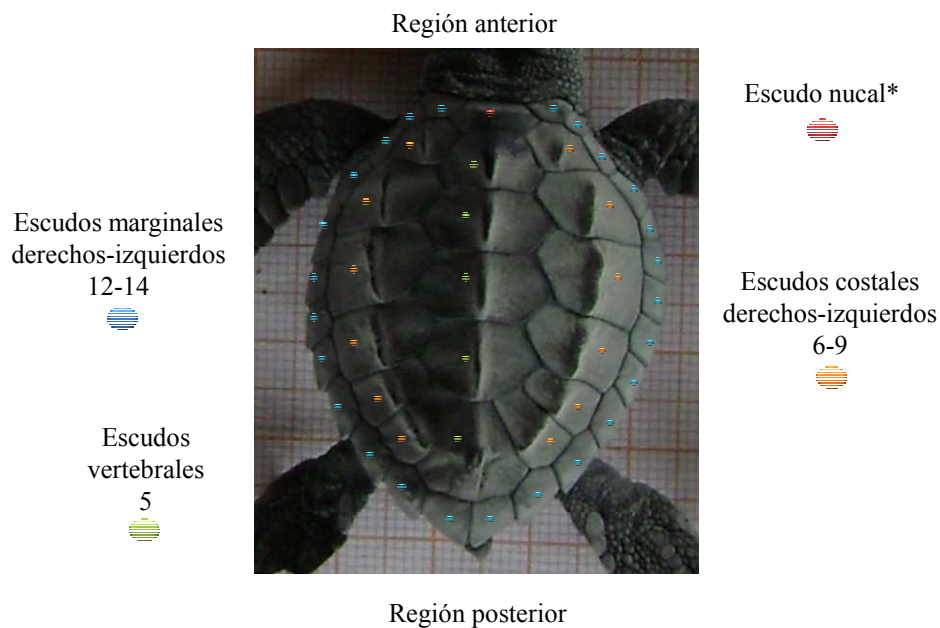
**Figura 1.** Mapa del sitio de estudio, el círculo representa la playa de Maruata, Michoacán.

Se realizó el conteo de escudos vertebrales, costales (o laterales) y marginales del caparazón de 25 hembras anidadoras. De las cuales 8 pertenecen a la primera temporada (septiembre a diciembre de 2008) y 17 a la segunda (septiembre a diciembre de 2009).

Durante la primera temporada de anidación, se seleccionaron 958 crías de 15 nidos sembrados en vivero (promedio= 64 crías por nido, rango 67-143 crías). Se registraron algunas características reproductivas de las hembras (progenitoras de estos nidos), como: LCC (Longitud curva del caparazón), tamaño de nidada y porcentaje de eclosión. De las crías de se obtuvieron datos que representan estimadores de adecuación: peso y vigor. El peso de las crías se obtuvo con ayuda de una balanza granataria Scout Pro OHAUS® (precisión 0.0001g). La prueba de vigor que consistió en colocar la cría sobre su caparazón (región dorsal) y tomar el tiempo que tardaban en incorporarse sobre el plastrón (región ventral), con un cronometro. Cada una de estas crías fue colocada sobre una superficie plana cubierta con papel milimétrico (como escala de referencia) para posteriormente fotografiarlas con una cámara digital (Sony, 7.2 megapixeles, zoom óptico 3x), para el análisis de morfometría.

#### **4.2 Escudos supernumerarios**

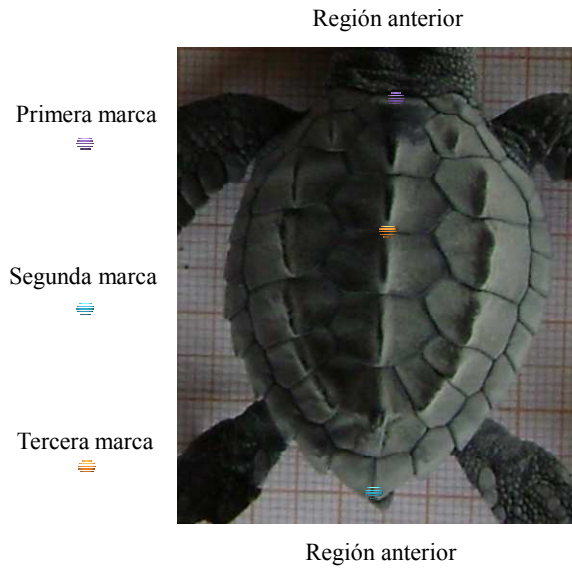
El análisis consistió en enumerar los escudos del caparazón, desde la región anterior hacia la región posterior y separando los conteos en lado derecho e izquierdo en los casos de los escudos marginales y costales. En este análisis no se considero el escudo nual, ya que en ocasiones esta segmentado (Figura 2).



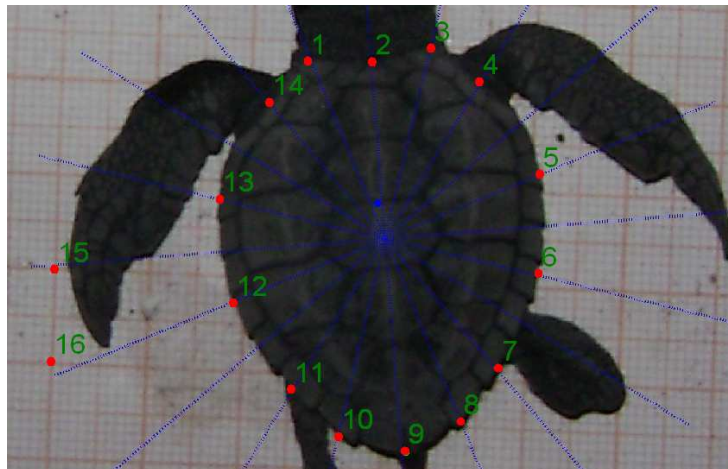
**Figura 2.** Esquema del caparazón de *Lepidochelys olivacea*. Los escudos se dividen en: vertebrales, costales y marginales. El escudo nucal no se considero para este trabajo.

### 4.3 Morfometría geométrica

El análisis morfométrico se baso en la dispersión de marcas anatómicas conspicuas y reproducibles del caparazón de las tortugas, denominadas Semi-landmarks. Estas marcas se realizaron con el programa MakeFan6 de la serie IMP (Integrated Morphometrics Package). Sobre la imagen se colocaron tres puntos de referencia; en la escama nucal, en la unión de la tercera y cuarta escama ventral y la tercer marca en la unión de las últimas dos escamas marginales de la región posterior (Figura 3). A partir de estas marcas se generaron dos ejes que forman un plano cartesiano, que se tomo de referencia para formar un abanico con 10 radios que cubrió todo el caparazón. En la intersección de cada radio con el margen del caparazón se colocó un semi-landmark con el programa TPS-Dig (Rohlf 2005), sumando en total 14 semi-landmarks y dos marcas extras como escala de referencia en el papel milimétrico (Figura 4).



**Figura 3.** Asignación de puntos de apoyo en el programa MakeFan6 en las fotografías digitales de las crías de *Lepidochelys olivacea*.



**Figura 4.** Asignación de semi-landmarks en las fotografías digitales de las crías de *Lepidochelys olivacea*.

A partir de la asignación de los semi-landmarks se convirtieron las marcas en coordenadas geométricas a través de un ajuste de procrusters, que consiste en la superimposición de las marcas generadas en el programa CoorGen6 de la serie IMP (<http://www2.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>). Este proceso minimiza las diferencias

entre la configuración de los landmarks a través de la traslación, rotación y escalación. De esta manera quita el efecto del tamaño y demás variables que no se relacionen con la forma (Rohlf 1990).

Las coordenadas procrusters (variables de forma), se utilizaron para realizar un análisis de variables canónicas (CVA) con el software JMP 8.0 (SAS Institute).

El análisis estadístico entre las características reproductivas de las hembras; LCC (Longitud Curva del Caparazón), tamaño de nidada y porcentaje de eclosión con respecto a la forma del caparazón de las crías se realizó con un análisis de variables discriminantes con el software JMP 8.0 (SAS Institute). También se analizaron los estimadores de adecuación de las crías, como peso y vigor con respecto a la morfología del caparazón.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Escudos supernumerarios

Se realizó el conteo de los escudos del caparazón de 25 hembras anidadoras, se observó que en 20 individuos se presentaron escudos supernumerarios, es decir, asimetría (80%). Las diferencias en el número de escudos generalmente se presentan en los marginales y costales. La distribución de los escudos en las hembras se muestra en la Tabla 1. De acuerdo con la distribución de los escudos no existen todas las combinaciones posibles, por ejemplo en los escudos costales la combinación 5–6 no se presentó. El conteo de escudos se realizó en 958 crías de *Lepidochelys olivacea* pertenecientes a 15 nidos. De las cuales el 30% presentan simetría y 70% escudos asimétricos. Los escudos con mayor variación en número y distribución fueron los costales y marginales (Tabla 1).

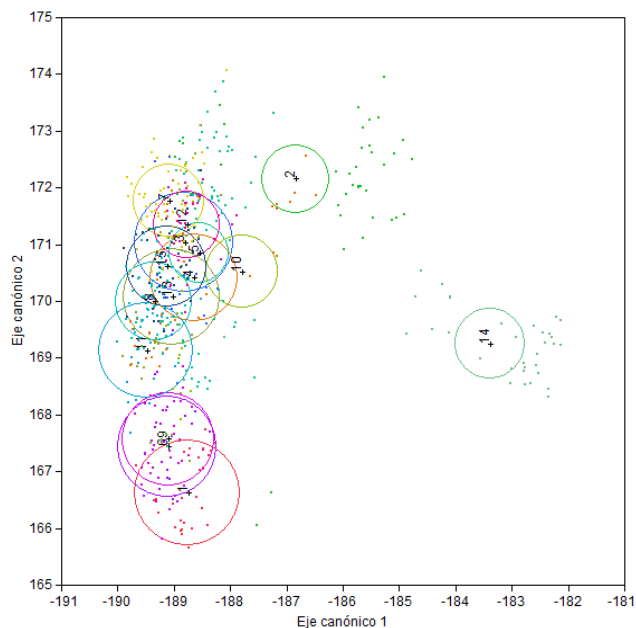
### 5.2 Morfometría geométrica

El análisis de variables canónicas demostró que si existen diferencias significativas entre los 15 nidos analizados (Wilks' Lambda= 0.007,  $p= 0.0001$ ) (Figura 5). Se encontró que la variable que presenta mayor relación con la forma del caparazón de las crías es el tamaño de la nidada ( $r^2=0.85$ ,  $p=0.0001$ ), en este análisis se incluyeron la LCC de la hembra y el porcentaje de eclosión.

A partir de las coordenadas procrustes se realizó un análisis de placas delgadas para determinar las variaciones en la forma entre los caparazones de las crías y se ilustra a utilizando un gradilla de deformación, del caparazón de las crías de los 15 nidos. En la gradilla se muestra la configuración promedio de cada semi-landamark y las flechas muestran la intensidad y desviación de la deformación que ocurre en cada semi-landamark. (Figura 6).

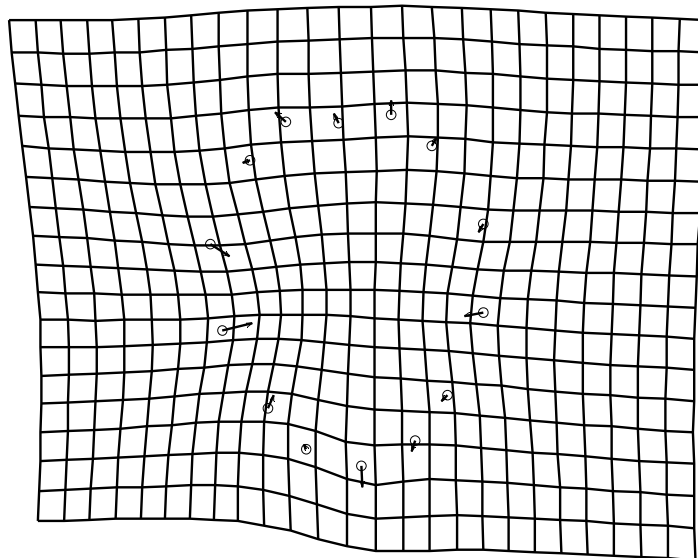
**Tabla 1.** Distribución de los escudos del caparazón de crías y hembras de *Lepidochelys olivacea* y su frecuencia (%). En negritas se resalta el arreglo típico de los escudos de acuerdo con la literatura. El número de escudos se presenta en números separados por un guión cuando se refiere a su distribución en los lados izquierdo y derecho.

	Número de escudos	N (%) crías	N (%) hembras
Centrales	4	1 (0.1)	
	5	543 (57)	4 (16)
	<b>6</b>	<b>303 (32)</b>	<b>9 (36)</b>
	<b>7</b>	<b>93 (10)</b>	<b>10 (40)</b>
	<b>8</b>	<b>13 (1)</b>	<b>2 (8)</b>
	<b>9</b>	<b>4 (0.4)</b>	
Costales	5 – 5	142 (15)	1 (4)
	5 – 6	99 (10)	
	5 – 7	15 (1.6)	
	5 – 8	5 (0.5)	
	6 – 5	86 (9)	9 (36)
	<b>6 – 6</b>	<b>320 (34)</b>	<b>6 (24)</b>
	<b>6 – 7</b>	<b>67 (7)</b>	
	<b>6 – 8</b>	<b>8 (0.8)</b>	
	<b>7 – 5</b>	<b>14 (2)</b>	
	<b>7 – 6</b>	<b>90 (9)</b>	<b>5 (20)</b>
	<b>7 – 7</b>	<b>53 (5.5)</b>	
	<b>7 – 8</b>	<b>12 (1.2)</b>	
	<b>8 – 6</b>	<b>7 (0.5)</b>	<b>1 (4)</b>
	<b>8 – 7</b>	<b>10 (1)</b>	<b>2 (8)</b>
<b>8 – 8</b>	<b>20 (2)</b>	<b>1 (4)</b>	
9 – 6	3 (0.3)		
9 – 8	7 (0.7)		
Marginales	11 – 10	5 (0.52)	
	11 – 11	6 (0.6)	2 (8)
	11 – 12	12 (1.2)	
	11 – 13	5 (0.5)	
	12 – 11	22 (2.3)	
	<b>12 – 12</b>	<b>354 (57)</b>	<b>7 (28)</b>
	<b>12 – 13</b>	<b>143 (15)</b>	<b>2 (8)</b>
	<b>12 – 14</b>		<b>2 (8)</b>
	<b>13 – 12</b>	<b>70 (7.3)</b>	<b>3 (12)</b>
	<b>13 – 13</b>	<b>341 (36)</b>	<b>8 (32)</b>



**Figura 5.** Análisis de variables canónicas realizado para los 15 nidos. Se encontraron diferencias significativas en la forma del caparazón de las crías (Wilks' Lambda= 0.007, p= 0.0001).

Región anterior



Región posterior

**Figura 6.** Gradilla de deformación del caparazón de crías de *Lepidochelys olivacea*. Los círculos muestran los promedios de forma y la intensidad y dirección de la deformación de cada semi-landmarks.

De acuerdo con el análisis de discriminantes, se encontraron diferencias significativas en la forma del caparazón de las crías en relación con la disposición y arreglo de escudos simétricos y la forma del caparazón con escudos asimétricos (Wilks' Lambda= 0.75,  $p= 0.0001$ ).

En el análisis estadístico de variables discriminantes de las características reproductivas de las hembras: LCC, tamaño de nidada y porcentaje de eclosión con respecto a la morfometría del caparazón de las crías, se encontró que la forma del caparazón está relacionada en un 85% con el tamaño de la nidada (Wilks' Lambda= 0.0001,  $p= 0.0001$ ).

En cuanto a los estimadores de adecuación de las crías en relación con la forma del caparazón, el análisis estadístico de variables discriminantes evidencio que, no existen diferencias significativas en la forma del caparazón relacionadas con el peso de las crías (Wilks' Lambda= 0.001,  $p= 0.08$ ), o con el del vigor (Wilks' Lambda= 0.001,  $p= 0.11$ ).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Escudos supernumerarios

A diferencia de lo esperado se planteó que el porcentaje mayor de asimetría se presentaría en las crías debido a que la simetría es una característica importante para la sobrevivencia de los individuos y esto supondría que existió un proceso de selección que favoreció a los individuos simétricos en su sobrevivencia y reproducción. Sin embargo, en un estudio realizado con tortugas dulceacuícolas se observó que la asimetría era mayor en los individuos adultos que en crías. Para ello se propone que la asimetría en los individuos adultos podría estar explicada por: 1) el crecimiento del tejido de los escudos continua uno sobre otro y se podrían generar nuevas suturas y con ello mayor número de escudos, 2) la bioacumulación de toxinas en los individuos adultos que interfieran con el óptimo desarrollo del caparazón (Davis y Groose 2008).

Aunque típicamente los análisis de simetría se realizan con los escudos del caparazón, existen trabajos en los que se analizan los escudos del plastrón. En este sentido Davis y Groose (2001), proponen que los escudos del plastrón crecen sobre capas de tejido en los bordes de la línea media y que este presenta escudos nuevos conforme la edad del individuo. También encontraron que el mayor índice de simetría se presentó en los machos, para lo que proponen las siguientes hipótesis: 1) el plastrón de las hembras podría ser más asimétrico por que el crecimiento de estas es más rápido con respecto al de los machos. 2) el plastrón de las hembras podría ser más asimétrico, debido a que su tasa de crecimiento es más rápida como producto del uso eficiente de los recursos. Cabe mencionar que en el presente estudio solo se consideraron individuos hembras y crías para el análisis.

La variación en la simetría de los escudos se ha basado en diversos factores, debido a que el patrón de escudos presenta un periodo crítico de formación así como la diferenciación gonadal (Ewert 1979). El manejo de los huevos después de la ovoposición tiene un efecto marcado sobre la variabilidad del número de escudos. Por lo tanto, el

trasplante, desplazamiento e incubación artificial de huevos de tortugas marinas deben ser evaluados por sus efectos en las crías (Mast y Carr 1989).

Este resultado atípico del porcentaje de asimetría mayor en individuos adultos que en crías de *Lepidochelys olivacea* podría estar explicado por: 1) los neonatos con recuentos de escudos asimétricos mueren antes de madurar, 2) los escudos pueden experimentar la fusión durante la ontogenia de tal manera que la etapa adulta muestra el patrón normal de escudos (Ozdemir y Turkozan 2006). Se ha observado que la tasa de desviación en el número de escudos en crías de un criadero fue mayor respecto al de playas naturales (Suganuma *et al.* 1994). También se propone que la mayor variación en el número de escudos se presenta en las hembras adultas respecto a los machos adultos (Turkozan *et al.* 2001).

## 6. 2 Morfometría geométrica

Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas en la morfología del caparazón entre los 15 nidos. De acuerdo con los resultados se encontraron diferencias significativas en la forma del caparazón entre las crías con arreglo y disposición simétrica de los escudos y las que presentaron asimetría. Este resultado es contrario a lo esperado debido a que la distribución de las costillas que forman el caparazón está recubierta por una capa dérmica, las suturas que se forman en el caparazón óseo no necesariamente se corresponden con las de la recubierta dérmica (Wyneken 2004). Se sugiere que la forma del caparazón se ve afectada por el arreglo simétrico o asimétrico de las suturas que originan los escudos.

En este sentido existe un estudio que describe la forma del caparazón de crías de *Chelonia mydas*, en el que se analizaron 14 nidos y se encontraron diferencias significativas entre estos, sin embargo la tendencia de la deformación del caparazón no fue relevante para la sobrevivencia de los individuos (Lara-De La Cruz 2011).

Respecto a la asociación entre las características reproductivas de las hembras y las medidas indirectas de adecuación de las crías con la forma del caparazón. Se encontró que

la variable que mejor explica la forma del caparazón es el tamaño de la nidada con una relación del 85%, se asume que el efecto materno representa una característica muy importante sobre la adecuación de las crías. Se ha descrito en otros estudios el efecto materno sobre las características indirectas de adecuación de las crías. Delmas *et al.* (2007) realizaron pruebas de vigor en crías de *Trachemys scripta*, con diferenciales en la temperatura de incubación y provenientes de nidos distintos, encontrando que existe un efecto materno en conjunto con la contribución genética del padre, genera diferencias en el tiempo de incorporación de las crías. Aunque en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de vigor con respecto a la forma del caparazón, las diferencias en estas variables podrían presentarse de tal manera que no se aprecien en este análisis, debido a que existen características indirectas de adecuación que son más sensibles de medir (i.e vigor)

Es importante resaltar que los resultados del capítulo I de esta tesis demuestran que si existen diferencias significativas en la forma del caparazón relacionadas con un genotipo paterno en particular. Por lo tanto, el presente estudio indica que se tiene tanto el efecto materno como también la asociación con algún genotipo paterno en particular y además la asociación de la forma del caparazón con el orden de fertilización de los huevos. Cabe mencionar que las características analizadas en este estudio representan uno de los primeros reportes descritos de *Lepidochelys olivacea*.

## 7. CONCLUSIONES

1. Los porcentajes de asimetría en el número de escudos del caparazón de las hembras fue de 80%, mientras que el de las crías fue de 70%. Se sugiere que los valores de asimetría tan altos en las hembras podrían estar explicadas por: a) el crecimiento de las hembras es más rápido con respecto al de los machos, b) se sabe que las hembras presentan con mayor frecuencia escudos asimétricos que los machos. También se ha visto que el manejo de los huevos podría afectar el óptimo desarrollo de los escudos del caparazón.
2. Se encontraron diferencias significativas en la forma del caparazón con respecto a la simetría o asimetría de los escudos de las crías. Contrario a lo esperado esto podría sugerir que la forma del caparazón podría variar de acuerdo con el número y disposición de los escudos.
3. Se demostró que las diferencias en la forma del caparazón están explicadas en un 85% por el tamaño de la nidada. Esto sugiere que el efecto materno en la variación de esta característica es determinante para su óptimo desarrollo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la forma del caparazón dependiendo del peso y vigor de las crías, esto podría estar explicado porque algunas variables son más sensibles de medir y explicar que otras.

## 8. REFERENCIAS

- Bookstein, F.L. 1982. Foundation of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 451-470.
- Claude, J., E. Paradis, H. Tong y J.C. Auffray. 2003. A geometric morphometric assessment of the effects of environment and cladogenesis on the evolution of the turtle shell. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 485-501.
- Davis, A.K. y A.M. Grosse. 2008. Measuring fluctuating asymmetry in plastron scutes of: the importance of gender, size and body location. *The American Midland Naturalist* 159: 340-348.
- Delmas, V., E. Baudry, M. Girondot y A.C. Prevot-Julliard. 2007. The righting response as a fitness index in freshwater turtles. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 99-109.
- Depecker, M., C. Berge, X. Penin y S. Renous. 2006. Geometric morphometrics of the shoulder girdle in extant turtles (Chelonii). *Journal of Anatomy* 208: 35-45.
- Dufour, K.W. y P.J. Weatherhead. 1998. Bilateral symmetry and social dominance in captive male red-winged blackbirds. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42: 71-76.
- Ewert, M. A. 1979. The embryo and its egg: development and natural history. In: Harless, M. y H. Morlock (Eds). *Turtles: perspectives and research*. New York. 333-413 pp.
- Irschick, D., Vitt, L., Zani, P., Losos, J. 1997. A comparison of evolutionary radiations in mainland and Caribbean Anolis Lizards. *Ecology*: 78 (7): 2191-2203.
- Lara-De La Cruz, L.I. 2011. Paternidad múltiple y adecuación de *Chelonia mydas*. Tesis de maestría. Maestría en Ecología. UNAM. México.
- Lele, S. y J.T. Richtsmeier. 1991. Euclidean distance matrix analysis: a coordinate free approach to comparing biological forms using landmark data. *American Journal of Physical Anthropology* 98: 73-86.
- Mast, B. y Carr, L. 1989. Carapatial scute variation in Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempii*) hatchlings and juveniles. In: *Proceeding of the First International Symposium on Kemp's Ridley Sea Turtle Biology*. Conservation and

- Management. Texas A & M University Sea Grant College Program Galveston. 202-219 pp.
- Moller, P. y Pomiankowski, P. 1993. Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Genetica* 89: 267-279.
- Myers, E., Janzen, J., Adams, D. y Tucker, J. 2006. Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). *Evolution* 60: 563-572.
- Özdemir, B. y Türkozan, O. 2006. Carapacial scute variation in green turtle, *Chelonia mydas* hatchlings in northern Cyprus. *Turkish Journal of Zoology* 30: 141-146.
- Pritchard, P.C. y J.A. Mortimer. 2000. Taxonomía, morfología externa e identificación de las especies. En: Eckert, K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donely (Eds). 2000. Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas. Grupo especialista para la conservación en tortugas marinas UICN / CSE. Publicación No. 4 (Español). 265 pp.
- Rohlf, F.J. 1990. Rotational fit (Procrustes) methods. In: Rohlf, F.J. and F. Bookstein (Eds). Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop. University of Michigan Museums of Zoology. Ann Arbor. Michigan. 227-236 pp.
- Rohlf, F.J. 2005. TpsDig: digitize landmarks and outlines. Ver. 2.04. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook, NY.
- Suganuma, H., K. Horikoshi y H. Tachikawa. 1994. Scute deviation of green turtle hatchlings from a hatchery in Ogasawara Islands, Japan. In: Proceedings of the Fourteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and conservation. U.S. Dept. of Commerce. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-351. 148 pp.
- Türkozan, O., C. Ilgaz y S. Sak. 2001. Carapacial scute variation in Loggerhead turtles, *Caretta caretta*. *Zoology in the Middle East* 24: 137-142.
- Valenzuela, N., D.C. Adams, R.M. Bowen y A.C. Gauger. 2004. Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: a powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. *Copeia* 4: 735-742.
- Wyneken, J. 2004. La anatomía de las tortugas marinas. U. S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 172 pp. (Versión en español de Wyneken, J. 2001. The Anatomy of Sea Turtles. U. S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, 172 pp.