

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Biología



Excelencia que trasciende

DEL VALLE
GRUPO EDUCATIVO

**Determinación de la región de origen de las tortugas negras
(*Chelonia mydas agassizii*) en el sitio de forrajeo Poza del Nance
(Parque Nacional Sipacate-Naranjo, Escuintla, Guatemala)
utilizando análisis de ADN mitocondrial**

Trabajo de graduación presentado por
María Eugenia Chavarría Martínez
para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2017

Determinación de la región de origen de las tortugas negras (*Chelonia mydas agassizii*) en el sitio de forrajeo Poza del Nance (Parque Nacional Sipacate-Naranjo, Escuintla, Guatemala) utilizando análisis de ADN mitocondrial.

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Biología



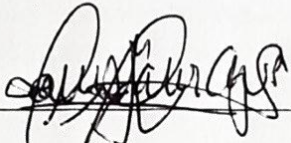
**Determinación de la región de origen de las tortugas negras
(*Chelonia mydas agassizii*) en el sitio de forrajeo Poza del Nance
(Parque Nacional Sipacate-Naranjo, Escuintla, Guatemala)
utilizando análisis de ADN mitocondrial**

Trabajo de graduación presentado por
María Eugenia Chavarría Martínez
para optar al grado académico de Licenciada en Biología

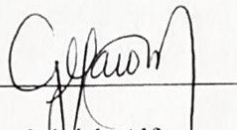
Guatemala

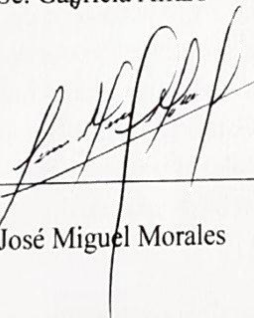
2017

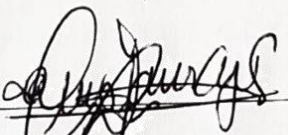
Vo. Bo. Asesor Principal

(f) 
M.Sc. Javier Ajú

Tribunal Examinador

(f) 
MSc. Gabriela Alfaro

(f) 
Lic. José Miguel Morales

(f) 
M.Sc. Javier Ajú

Fecha de aprobación, Guatemala, 1 de agosto de 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a las tortugas y a los ecosistemas marinos y costeros. A mi familia, mis amigos y mi novia por su apoyo y su presencia en mi vida.

Nada de este trabajo hubiera sido posible sin los consejos, el entusiasmo, la paciencia y el apoyo de Maike Heidemeyer MSc, de la Universidad de Costa Rica, asesora principal en el laboratorio, los análisis moleculares y estadísticos, y a Javier Ajú MSc, en la revisión de los resultados y análisis. Quiero hacer una mención especial de todas las y los científicos extraordinarios que han sido parte de este trabajo con su experiencia y su guía: Dr. Federico Albertazzi de CIBCM-UCR, Dr. Alberto Abreu de la UNAM, Dr. Omar Chassin Noria, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el Dr. Jeffrey Seminoff, de la NOAA, MSc. Catherine Hart de la Red Tortuguera, A. C. y Lic. Andrés Ávalos de la UVG.

Infinitas gracias a Protortugas, en especial al MVZ Carlos Alfaro y a Jaime Pérez, quienes facilitaron el uso de su equipo y compartieron sus técnicas y su conocimiento para el trabajo de campo. A don Santos y a don Juanón, de la aldea El Paredón, por los recorridos en lancha, su experiencia y su paciencia. Al equipo de Paredón Surf House, en especial a Ismael por el hospedaje, la comida y sobre todo por la calidez y la amistad. Al Consejo Nacional de Áreas Protegidas –CONAP-, al director y a los guardarrecurso del Parque Nacional Sipacate-Naranja.

Esta investigación se realizó gracias al apoyo del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular –CIBCM- de la UCR y del Departamento de Biología de la UVG, que proporcionaron materiales, equipo e instalaciones en sus laboratorios para los análisis.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	xi
ÍNDICE	xiii
LISTA DE CUADROS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMEN	xix
ABSTRACT.....	xxi
PALABRAS CLAVE	xxiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO METODOLÓGICO.....	23
III. RESULTADOS.....	35
IV. DISCUSIÓN	43
V. CONCLUSIONES	55
VI. RECOMENDACIONES.....	57
VII. LITERATURA CITADA.....	59
VIII. ANEXOS.....	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Valores de los supuestos utilizados para el Análisis de Stocks Mezclados.....	32
2. Frecuencia de haplotipos de ADNmt (773bp) de tortuga negra (<i>Chelonia mydas</i>) por individuos capturados en PdN y por número de hembras anidantes marcadas en los ocho sitios de anidación del Pacífico Oriental incluidos en el MSA de PdN. Datos adaptados a partir de Dutton <i>et. al.</i> (2014).....	38
3. Resumen de los resultados del MSA en BAYES: contribución relativa de cada playa de anidación (%), con su respectiva desviación estándar (SD) e intervalos de confianza (CI).....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Características morfológicas distintivas de la tortuga verde	4
2.	Morfología exterior en distintos estadíos de la tortuga verde.....	5
3.	Ciclo de vida de las tortugas marinas.....	8
4.	Modelo filopátrico de las tortugas marinas con tres poblaciones hipotéticas genéticamente distintas entre sí	8
5.	Distribución mundial de la tortuga verde	10
6.	Mapa de la Poza del Nance	24
7.	Diagrama de flujo del procedimiento de extracción de ADN	29
8.	Promedio de CCL en tortugas de PdN de acuerdo a la base de datos de Protortugas n=147).....	33
9.	Tamaño de las tortugas de PdN (CCL) de acuerdo a la base de datos de Protortugas (n=147), dividido en clases de tallas de 5cm.....	34
10.	Gel de integridad de ADN. El número arriba de cada carril indica el código de muestra.....	35
11.	(a), (b), (c), (d) y (e). Geles de amplificación de ADN. El número de arriba es el código de muestra, abajo está la razón de dilución del ADN. CP: control positivo; B: blanco; E: escalera.....	36

12. Comparación de la longitud de la cola entre un macho y una hembra sexualmente maduros.....	41
13. Morfotipos observados en las <i>C. mydas</i> : “negro”, característico del Pacífico Oriental y “amarillo”, característico del Pacífico Occidental.....	42
14. Tortugas capturadas en un muestreo en PdN, todas poseen morfotipo negro.....	42
15. Representación gráfica de los resultados del MSA Bayesiano, contribución estimada de cada sitio de anidación potencial, para los tres <i>priors</i> probados. Los intervalos de confianza se representan como barras de error.....	45
16. MSN de los haplotipos encontrados en PdN para el presente estudio.....	47
17. MSN con todos los haplotipos del Océano Pacífico disponibles en GenBank.....	48
18. Lesiones que se han encontrado en las tortugas de PdN.....	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Categorías para toma de datos de captura (Protortugas).....	63
2. Toma de datos para muestras de tejido.....	63
3. Lista de acrónimos.....	63
4. Autorización del CEUCA-UVG para la investigación.....	65
5. Licencia de Investigación emitida por CONAP.....	66
6. Licencia de colecta o aprovechamiento de vida silvestre emitida por el CONAP.....	67

RESUMEN

Cuantificar la conectividad existente entre hábitats geográficamente separados en animales migratorios es esencial para definir estrategias adecuadas de conservación en escalas nacionales y regionales. Estudiar las relaciones complejas entre las áreas de anidación y de alimentación de las tortugas marinas permite una mejor comprensión de sus ciclos de vida y biología cuando no están en época reproductiva, fuera de las playas de anidación. La Poza del Nance (PdN), en el Parque Nacional Sipacate-Naranja (Escuintla, Guatemala), es un estuario poco profundo rodeado de manglares, donde tortugas verdes del Pacífico Oriental (PO) (*Chelonia mydas agassizii*) (CCL=83.58cm, n=147) se congregan durante todo el año.

Con el objetivo de determinar los orígenes natales y la contribución de distintos stocks reproductivos a esta área de alimentación, se analizaron secuencias de la región control (CR) del ADN mitocondrial (ADNmt), para 34 individuos capturados en PdN entre los años 2014 y 2015. Se extrajo ADN de todas las muestras y se amplificó un fragmento de la CR de aproximadamente 900bp, utilizando los cebadores H950 y LCM15382. Se encontraron ocho haplotipos en los 34 individuos, con una diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) de 0.7023 ± 0.0668 y 0.002318 ± 0.001527 , respectivamente. Siete de los haplotipos encontrados pudieron ser asignados a stocks de la región y el único haplotipo huérfano (al que posteriormente se le designó CmP 7.2), tiene altas probabilidades de pertenecer al PO.

Se realizaron Análisis de Stocks Mezclados (MSA por sus siglas en inglés) en el que se pusieron a prueba supuestos de distancia y de tamaño poblacional, y otro MSA sin supuestos. Este análisis mostró que no había diferencia aparente entre los supuestos probados y sugiere que el sitio de anidación en Colola Michoacán es la que más contribuye a formar la población de PdN (>70%), con contribuciones menores de las

Galápagos (16-18%), Costa Rica (5-7%) e Islas Revillagigedo (<1%). Dichos resultados podrían indicar que esta área de Centroamérica podría ser un punto de convergencia para las poblaciones de tortuga verde del Noreste y Sudeste del Pacífico, y reitera la necesidad de la cooperación internacional en la conservación de tortugas marinas.

ABSTRACT

Quantifying the connectivity that exists between geographically separated habitats of migratory animals is essential to define adequate conservation strategies on national and regional scales. Studying the complex relationships amongst nesting and foraging areas of migratory sea turtles also allows better understanding of life cycles and biology outside nesting beaches during their non-reproductive periods. Poza del Nance (PdN), in the Sipacate-Naranjo National Park (Escuintla, Guatemala), is a shallow estuary surrounded by mangroves, where adult Eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*, CCL=83.58cm, n=147) aggregate throughout the year.

With the aim to determine natal origins and stock contributions to this foraging ground, we analyzed 773bp sequences of the mtDNA control region (CR) of individuals caught at PdN between 2014 and 2015. DNA was extracted from all samples and approximately 900bp of the CR was amplified using the H950 and LCM15382 primers. Eight haplotypes were found in 34 turtles, with a haplotype (h) and nucleotide (π) diversity of 0.7023 ± 0.0668 and 0.002318 ± 0.001527 respectively. Seven haplotypes were assignable to regional stocks, while the orphan haplotype (now given the nomenclature CmP 7.2) is also likely from the Eastern Pacific.

A Mixed Stock Analysis (MSA) with flat, distance and source population-size priors was performed. It showed no difference among priors and results suggest that the Colola rookery is the primary source for PdN (>70%) with fewer contributions from Galapagos (16-18%), Costa Rica (5-7%) and Revillagigedo Islands (<1%). Results could mean this Central American area might be a point of convergence for north- and southeastern Pacific Green Turtle populations and reiterate the need for international cooperation in sea turtle conservation.

PALABRAS CLAVE

Filopatría, genética de poblaciones, ADNmt, tortuga verde, Análisis de Stocks Mezclados, Pacífico Oriental, especies amenazadas, haplotipo

I. INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas han tenido importancia para el ser humano desde la antigüedad. Forman parte de la mitología, leyendas y folklore de varias civilizaciones. Son parte de varios mitos de la creación del mundo y varias culturas las han visto como símbolos de estabilidad, sabiduría, longevidad, fertilidad y resistencia. Además de su importancia ecosistémica, algunas especies han proveído al ser humano de recursos alimenticios (huevos de prácticamente todas las especies y carne principalmente de la tortuga verde), aceite (tortuga baule) y caparazones (especialmente de la tortuga de carey). Las siete especies de tortugas marinas existentes están en peligro de extinción y se han convertido en uno de los símbolos de la conservación de los mares y ecosistemas costeros. La mayoría de estas especies, entre ellas la tortuga verde (*Chelonia mydas*), han sido ampliamente estudiadas por su extensa distribución, su peculiar ciclo de vida y sus hábitos altamente migratorios.

Este estudio sobre la tortuga negra, también llamada tortuga verde del Pacífico Oriental (*Chelonia mydas agassizii*), realizó una comparación molecular con la región control del ADN mitocondrial (cebadores H950 y LCM15382) de los individuos que se alimentan en la Poza del Nance (Parque Nacional Sipacate-Naranjo, La Gomera, Escuintla) y los haplotipos ya publicados de distintos sitios de anidación (entre ellos las Islas Galápagos, Costa Rica, Islas Revillagigedo y Michoacán), a fin de conocer mejor las rutas migratorias de las tortugas en el Pacífico Oriental, establecer de dónde proviene la población que llega a la poza y la contribución relativa de distintos sitios de anidación a esta población.

A. ANTECEDENTES

1. Generalidades taxonómicas. Las tortugas marinas son un grupo monofilético separado de otras especies de tortugas hace más de 100 millones de años. Comprende dos familias y siete especies en total: Dermochelyidae, cuya única especie es la tortuga baule (*Dermochelys coriácea*) y Cheloniidae, la cual comprende las seis especies restantes: tortuga verde (*Chelonia mydas*, Linneo 1758), parlama (*Lepidochelys olivácea*, Eschscholtz 1829), tortuga plana (*Natator depressus*, Garman, 1880), lora (*Lepidochelys kempii*, Garman 1880) y carey (*Eretmochelys imbricata*, Linneo 1766).

La llamada comúnmente “tortuga negra” o “tortuga prieta” (*Chelonia mydas agassizii*) es para muchos autores una subespecie o población restringida al Este del Océano Pacífico de la tortuga verde, *Chelonia mydas*, aunque hay cierta controversia sobre si debería considerarse una especie distinta (*Chelonia agassizii* Boucour 1868). El epíteto *agassizii* ha sido aplicado por varios autores (Carr 1967; Pritchard and Trebbau 1984; Alvarado y Figueroa 1986, *ob. cit.* en Parham y Zug 1996) para distinguir a esta población propia del este del Pacífico de otras poblaciones de *C. mydas*, de las cuales las tortugas negras se distinguen por tener una coloración más oscura, un tamaño ligeramente menor en la adultez y diferencias leves en la morfología del caparazón, el cual es más abovedado, alto, estrecho y constreñido sobre las aletas anteriores (Parham y Zug 1996; Bowen *et. al* 1992; Raygadas 2008). En sus estudios con morfología craneal, Figueroa (1989) y Kamezaki y Matsui (1995) (*ob. cit.* Por Seminoff 2000) encontraron mucha disimilitud entre las tortugas negras y las demás *C. mydas*, abriendo la posibilidad de reconocerlas como distintas especies. Quienes defienden su diferenciación se basan no solo en los caracteres morfológicos ya mencionados, sino en que, aunque *agassizii* y *mydas* ocurren simpátricamente en las Islas Galápagos y Nueva Guinea, no hay evidencia de eventos reproductivos entre ambas, lo cual para Pritchard (1997) (*ob. cit.* En Urbiola-

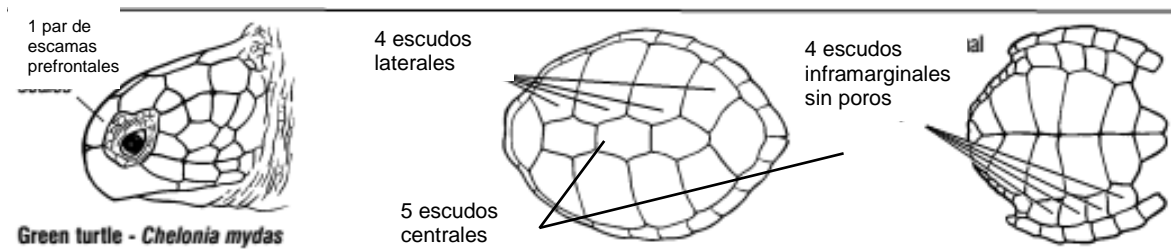
Rangel y Chassin-Noria 2011) crearía el aislamiento reproductivo necesario para reconocer a *C. agassizii* como especie.

Sin embargo, este argumento no es apoyado por las evidencias moleculares, como las que citan Urbiola-Rangel y Chassin-Noria (2011): los resultados no apoyaron la asignación de especie para *C. agassizii* en el trabajo de Karl *et. al.* (1992) con genes nucleares de copia única, el de Dutton *et. al.* (1996) con secuenciación de segmentos mitocondriales y el de Karl y Bowen (1999) secuenciando 1341bp. Al analizar el ADNmt de muestras de 15 colonias dentro de la distribución global del género *Chelonia*, Bowen *et. al.* (1992) encontraron distinción entre las poblaciones Indo-Pacíficas respecto a las del Atlántico y el Mediterráneo, pero no hubo evidencia suficiente para considerar a la tortuga negra un linaje independiente a las demás, no apoyando su asignación como especie (cit.por Urbiola-Rangel y Chassin-Noria 2011). La actualización taxonómica elaborada en 2010 para todas las especies de tortugas del mundo reconoce a *C. mydas* y *C. agassizii* como sinónimos (Rhodin *et. al.* 2010). Hechas estas aclaraciones, en el presente trabajo se considerará a *C. mydas* una sola especie y se utilizará el epíteto *agassizii* para diferenciar a las llamadas “tortugas negras” (la población del Este del Océano Pacífico) de las demás poblaciones de dicha especie (“tortugas verdes”).

2. Descripción de la especie. La tortuga verde es llamada así por el color verdoso de su grasa. Es la segunda especie de tortuga marina de mayor tamaño después de las tortugas baule, la más grande de los quelónidos y la especie de distribución más amplia. Se distingue de otras especies de quelónidos porque tiene un solo par de escamas prefrontales (las demás especies tienen dos). Además, tienen una garra en cada extremidad, cuatro escudos inframarginales de cada lado del plastrón y dos poros de Rathke, uno en cada escama axilar e inguinal. El caparazón tiene cuatro pares de escudos laterales y cinco escudos centrales; el de los adultos es liso (las crías y jóvenes tienen una quilla que va desapareciendo con la edad) y su color cambia con la edad. En las crías el

caparazón es negro con bordes blancos en las aletas; los jóvenes y preadultos tienen colores más brillantes que los adultos, como tonos de verde, rojizo y café amarillento y en la adultez, el caparazón es ovalado y con colores del verde oliva al café, gris y negro. Además presentan puntos, manchas y jaspeado en formas variables (Figura 2). El plastrón es blanco o crema en las crías y se vuelve amarillo cremoso, rosáceo o gris en la madurez (Wyneken 2001; CONABIO 2012; NOAA 2014; Raymundo 2010).

Figura 1. Características morfológicas distintivas de la tortuga verde



(Adaptado de Wyneken 2001)

Los adultos de tortuga verde pueden medir aproximadamente 80-150cm de longitud y pesan más de 100kg, hasta 225kg (CONABIO 2012, CIT 2008); pero las tortugas negras adultas son notablemente más pequeñas alcanzando hasta 90cm de longitud y hasta 120kg de peso (70kg es el peso promedio) (Raymundo 2010). Los machos sexualmente maduros tienen una cola visiblemente mucho más larga y gruesa y musculosa que la de las hembras, característica que permite distinguirlos a simple vista. Con la madurez los machos también desarrollan las uñas de las aletas frontales en forma de garras curvadas que le permiten sujetar a la hembra durante el acto sexual (Márquez 1996).

Figura 2. Morfología exterior en distintos estadios de la tortuga verde:
de izquierda a derecha: cría recién nacida, joven y adulto



(Imágenes tomadas de Wyneken, 2001).

3. Historia natural. La época reproductiva para la tortuga negra ocurre entre julio y octubre, con ciclos de reproducción bianuales o trianuales que pueden retrasarse hasta más de un año si hay factores de estrés en el ambiente, como cambios de clima o escasez de comida. En cada temporada reproductiva, la hembra puede depositar entre una y siete nidadas con un promedio de 75 huevos cada una (Márquez 1996). Cada huevo tiene el tamaño de una pelota de ping-pong y tarda un aproximado de 50-55 días en incubación. Las crías pesan alrededor de 25g al nacer y miden aproximadamente 50mm (NOAA 2014; CONABIO 2012).

Parece ser que la tortuga verde llega a vivir entre 45 y 59 años, y es la que más tiempo demora en alcanzar la madurez sexual: cuanto peor sea la calidad y menor la cantidad de alimento disponible, más se demora la madurez. En Costa Rica y Florida se estima que la alcanzan a los 26 o 27 años, en Australia alrededor de 30, 35 años en la isla Ascensión y 30 años o más en Hawaii. Se estima que las hembras producen 1,900-2,300 huevos durante su vida, las seis a siete veces que anidan en su vida (tomando en cuenta que no anidan todos los años). En cada temporada de anidamiento depositan alrededor de 330 huevos (cerca de cien por nido, excepto por las tortugas negras, que únicamente ponen 65-90 por nido). Descontando predadores naturales, infecciones por hongos, y

otros factores de fallo embrionario, se puede esperar que cada hembra saludable produzca de 1000 a 1900 crías a lo largo de su vida (Spotila 2004).

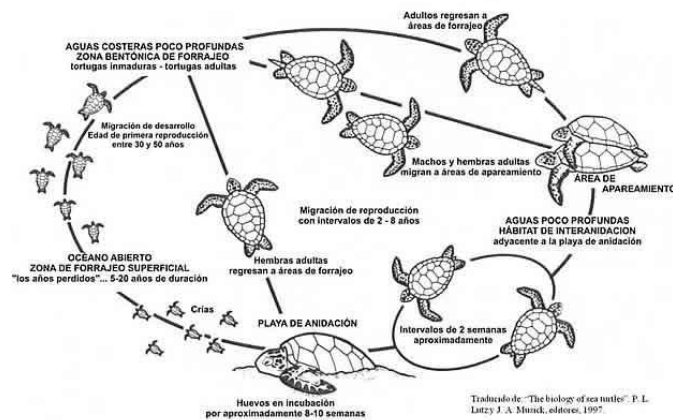
Los primeros días después del nacimiento, las crías se alimentan con los remanentes del saco vitelino durante la primera semana de vida libre, tras lo cual empiezan a alimentarse independientemente. De ahí en adelante, siguen una dieta mayormente carnívora, haciendo una transición a la herbivoría posiblemente después del primer año de vida (Márquez 1996). La *C. mydas* es la única especie de tortuga marina que es casi exclusivamente herbívora en la adultez. Se alimenta de pastos marinos como *Zoostera spp*; *Thalassia spp.*, y *Posidonia spp*, algas y moluscos (CONABIO 2012). Sus mandíbulas aserradas (principalmente en la inferior), y pico achatado la distinguen de otras especies y le permiten arrancar los pastos del fondo arenoso con mayor facilidad (Wyneken 2001). Esta especie se alimenta cerca de las costas, buscando aguas someras con abundantes pastos marinos y mantos algales, también llagan a penetrar bahías y lagunas costeras (Márquez 1996).

Las *C. mydas* juegan un importante papel en mantener saludables los fondos marinos. Sin el forrajeo constante de las tortugas, los pastos crecen demasiado, obstruyendo las corrientes, oscureciendo el fondo y se empiezan a descomponer, creando un hábitat adecuado para los mohos mucosos. Además, en las zonas viejas del pasto hay sobre crecimiento de invertebrados, hongos y microorganismos (Wilson *et. al* 2010). Como las tortugas se alimentan a unos pocos centímetros de la base de las briznas de pasto, permiten que las partes superiores se desechen en el agua. Al pastar una y otra vez sobre la misma área, las briznas de pasto son removidas, impidiendo su acumulación en el fondo. El decremento en la disponibilidad de nitrógeno para las raíces de los pastos que esto implica, impacta las especies de plantas, el ciclaje de nutrientes, densidades de animales y relaciones predador presa. Incluso se ha visto en el Caribe que la disminución poblacional de tortugas verdes resulta en una pérdida de productividad en la red trófica e

incluso afecta negativamente la disponibilidad de peces arrecifales con importancia comercial (Wilson *et. al.* 2010).

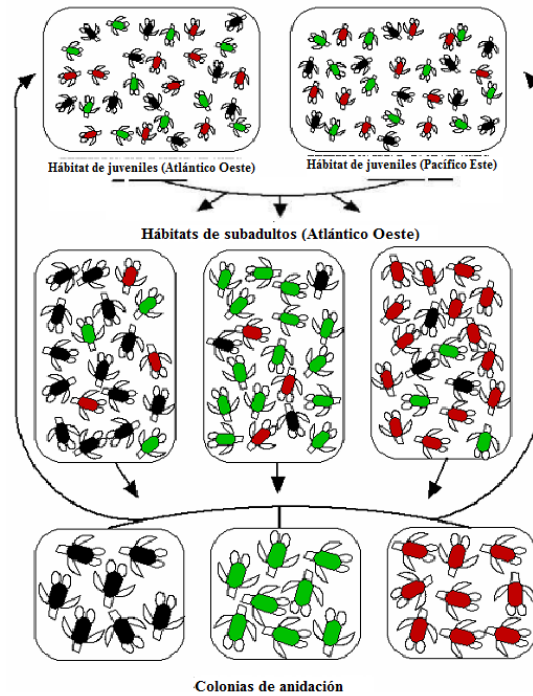
Las tortugas marinas son animales filopátricos, es decir, que regresan a poner sus huevos en la misma playa en la que la hembra nació. Después de eclosionar, las crías de las tortugas marinas tienen hábitos pelágicos, dejándose arrastrar pasivamente por las corrientes oceánicas. Conforme van madurando, las tortugas inician una fase nerítica y los juveniles se reclutan en zonas costeras para crecer y alimentarse. Los adultos son nadadores activos y al llegar a la madurez sexual, tanto *C. mydas* como otras especies de tortugas marinas presentan migraciones complejas, en las que se mueven entre sus playas de anidación y las zonas donde se aparean y se alimentan, que pueden estar separadas por miles de kilómetros entre sí. En las áreas de alimentación se congregan tortugas provenientes de distintas regiones geográficas (a lo que se conoce como “stocks mezclados”), y las hembras adultas vuelven a sus playas natales (“stocks”) a poner sus huevos después del apareamiento (Seminoff 2000, Bowen 2005, Bowen y Karl 2007). Estos procesos se ilustran con detalle en las figuras 3 y 4.

Figura 3. Ciclo de vida de las tortugas marinas



(Adaptado de Lutz y Musick 1997)

Figura 4. Modelo filopátrico de las tortugas marinas con tres poblaciones hipotéticas genéticamente distintas entre sí



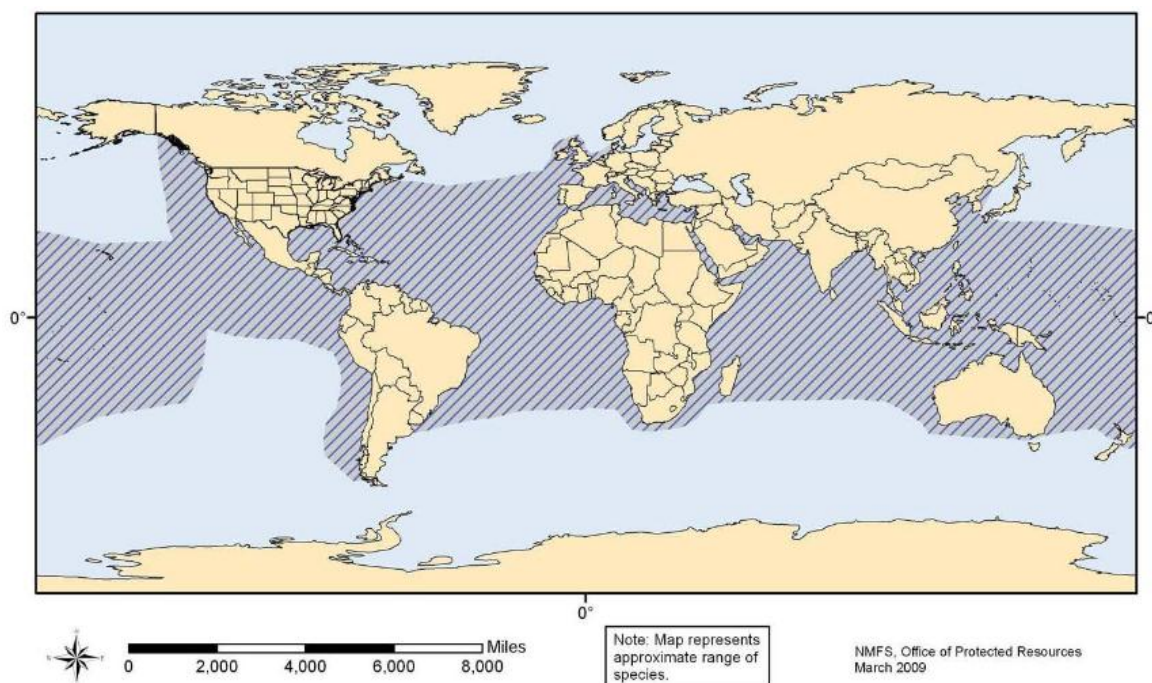
(Adaptado de Bowen *et. al.* 2005).

Los primeros estudios de Carr (1975) y Pritchard (1976) con marcas físicas en poblaciones de *C. mydas* del Atlántico demostraron que las áreas de alimentación se compartían entre tortugas provenientes de distintas colonias anidadoras y análisis posteriores de ADNmt demostraron que aunque existía el traslape en los sitios de alimentación, había diferencias genéticas marcadas entre una colonia de anidación y otra. Dado que el ADNmt se hereda únicamente de la madre, el comportamiento filopátrico de las hembras a lo largo de la historia de la especie ha resultado en que cada colonia de anidamiento se comporte como una unidad reproductora independiente y diferenciada genéticamente en sus haplotipos mitocondriales, lo cual se representa mediante colores en la Figura 4. Un haplotipo se define como un bloque de variaciones genéticas o polimorfismos que tienden a heredarse en bloque, por lo que permiten distinguir fácilmente la estructura de una población. En el caso de las tortugas, con esta información

se definen las unidades de manejo (UM) o “stocks reproductivos”, que son metapobaciones con una frecuencia de haplotipos mitocondriales que diverge significativamente (Bowen y Karl 1998, Bowen y Karl 2007; Avise 1998).

4. Distribución. La *Chelonia mydas* es una especie ampliamente distribuida en aguas tropicales y subtropicales en todo el mundo (Figura 5). Como la mayoría de tortugas marinas, las tortugas verdes son altamente migratorias y usan localidades separadas y hábitats diversos a lo largo de su vida. Primariamente, en la adultez tienen tres tipos de hábitat: playas para anidar, zonas de convergencia en mar abierto y áreas costeras para alimentación béntica (Seminoff 2004, NOAA 2014). La tortuga negra (*C. m. agassizii*) limita su distribución a las aguas templadas (temperaturas mayores a 20°C) del Pacífico Oriental.

Figura 5. Distribución mundial de la tortuga verde



(Tomado de NOAA 2014).

Las principales playas de anidación de *C. m. agassizii* están en Michoacán (México) (Alvarado-Díaz *et. al.* 2001), las islas de Revillagigedo (México) (Holroyd y Trefry 2010), las Islas Galápagos (Ecuador) (Green 1984) y Costa Rica (Blanco *et. al.* 2012), aunque hay reportes de anidaciones esporádicas dentro del rango de la especie, desde el Sur de California (EEUU) hasta Chile (Blanco *et. al.* 2012). Algunas áreas de forrajeo importantes se han identificado en las lagunas de la costa Pacífica en la península de Baja California, Colombia, el Golfo de California y las islas Galápagos (Seminoff 2000). Los sitios de alimentación se ubican principalmente en estuarios y lagunas de agua salada (Bjorndal 1997) y hábitats insulares cercanos a la costa (Amorocho y Reina 2007), aunque puede ser también en aguas abiertas (Seminoff *et. al.* 2002; Seminoff y Jones 2006).

5. Estado de conservación. Aunque las tortugas marinas son seres robustos y capaces de soportar mucho daño físico, son increíblemente susceptibles a contaminación química y biológica, lo cual las hace buenos indicadores biológicos de la salud del ecosistema (Aguirre y Lutz 2004). Por ejemplo se ha visto que una corta exposición a petróleo crudo en *Chelonia mydas* puede producir necrosis del epitelio epidérmico, pérdida de organización celular en la piel, susceptibilidad a infecciones y otros efectos negativos sobre la fisiología. Otra evidencia de esto es la incidencia de la fibropapilomatosis en esta misma especie, que después de haber sido descrita por primera vez en los años 30, se ha convertido en una epidemia mundial circuntropical, que ya dejó de presentarse sólo en tortugas verdes y se ha encontrado en todas las demás especies, incluyendo tortugas bobas (*Caretta caretta*) (Herbst 1994 cit. Por Aguirre y Lutz 2004), parlamas (*Lepidochelys olivacea*) (Aguirre *et. al.* 1999 cit. Por Aguirre y Lutz 2004) y lora (*Lepidochelys kempii*) (Harshbarger 1991 cit. Por Aguirre y Lutz 2004).

Para la IUCN, *C. mydas* se encuentra en la lista roja de especies en peligro de extinción (EN) por los criterios A2bd (Seminoff 2004). Esta organización considera que

esta especie está amenazada porque análisis recientes e históricos indican extensos declives poblacionales en todas las cuencas oceánicas a lo largo de las últimas tres generaciones, como resultado de la sobreexplotación de hembras ovipositoras y sus huevos en las playas de anidación, adultos y juveniles en áreas de alimentación y en menor medida, mortalidad incidental relacionada con la extracción de recursos pesqueros y la degradación de hábitats marinos y costeros. Dicho análisis calculó para el 2001, una población de 88,449 hembras anidantes, lo cual es un declive de 48-65% respecto de datos históricos en los últimos 100 a 150 años (Seminoff 2004).

Todas las especies de tortuga marina, entre ellas la *C. mydas*, están incluidas dentro del Apéndice I de CITES. Según el tratado, las especies de Apéndice I están en peligro de extinción y pueden ser afectadas por el comercio; por lo tanto la exportación, importación, reexportación o introducción procedente del mar de un espécimen están estrictamente regulados a fin de no poner en mayor peligro su supervivencia. Por lo tanto, no es permitido el comercio internacional de cualquier espécimen, parte o derivado de éste. Los permisos, si se otorgan, son básicamente para fines científicos y de investigación y se autorizan solo bajo circunstancias excepcionales (CITES 2013).

En la Lista de Especies Amenazadas (LEA) del Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP), la tortuga negra está asignada en el índice 3. Esta categoría abarca especies amenazadas por pérdida de hábitat o explotación, pero el estado de sus poblaciones permite su uso y manejo regulado (científico, comercial, cacería y reproducción comercial hasta segunda generación). Las especies endémicas regionales se incluyen en esta categoría (CONAP 2009).

6. Regulaciones legales sobre las tortugas marinas. Acorde a los calendarios cinegéticos regionales de CONAP, *C. m. agassizii* está incluida en el listado de especies no permitidas para caza, por lo que no es admisible matar ningún ejemplar en cualquier época del año, sea por caza deportiva o de subsistencia (CONAP 2010). La Resolución de Secretaria Ejecutiva del Consejo Nacional de Áreas Protegidas no 048/2000 prohíbe la cacería de tortugas marinas, dicha prohibición está legalmente reforzada por la Ley de Caza (Decreto 36-04) y su Reglamento (Acuerdo Gubernativo 84-2007).

Todas las especies de tortuga marina están protegidas por la legislación guatemalteca de diversas maneras: el artículo 80, inciso (g) de la Ley General de Pesca y Acuicultura de Guatemala (Decreto 80-2002) prohíbe la captura o pesca intencional de tortugas marinas y otras especies amenazadas o en peligro de extinción. En el inciso (i) del mismo artículo también se prohíbe utilizar artes pesqueras que no cuenten con los dispositivos y equipos necesarios para la protección de dichas especies. Desde 1996, por el Acuerdo Ministerial 029-96 se promulgó la primera regulación para implementar DETs obligatoriamente en los barcos camaroneros, como resultado de una condición impuesta los EEUU a los países exportadores de camarón capturado por pesca de arrastre. El uso obligatorio del DET también se manda en el artículo 17 del Reglamento de la Ley de Pesca y Acuicultura (Acuerdo Gubernativo 223-2005). Además, el acuerdo gubernativo (sin número) promulgado el 17 de febrero de 1981 prohibió por tiempo indefinido la captura, circulación y comercialización de todas las especies de tortugas marinas en Guatemala (poblaciones residentes y reproductoras), y promueve la creación de tortugarios para fomentar la reproducción de estos animales.

7. Estudios con marcas físicas. Desde la década de los 50 y 60 se inició a marcar hembras en las playas de anidación, conduciendo a la observación de que estas siempre regresaban a anidar a la misma playa, llevando a Archie Carr a postular la hipótesis de que las hembras estaban regresando a su sitio de nacimiento (Bowen y Karl 2007). El uso de marcas físicas, como las etiquetas metálicas o plásticas, es una forma relativamente simple y una de las primeras en ser utilizadas para rastrear a las tortugas a lo largo de sus rutas migratorias, ya que en todas las etiquetas se especifica una dirección para reportar en qué sitio, actividad y estado se las encontró. Los estudios de marcaje con etiquetas y recaptura posterior de individuos han permitido establecer que existe una extensa dispersión en las rutas migratorias y un vínculo claro entre playas de anidación y sitios de forrajeo. Las primeras evidencias las obtuvieron Carr y Pritchard en los 70s, al encontrar tortugas de distintas colonias de Surinam y la Isla de Ascención (Océano Atlántico) alimentándose juntas en Brasil. Entre otros estudios más recientes se logró encontrar tortugas negras anidadoras de Michoacán a más de 100km del área de anidamiento, en otras zonas de México, en Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Colombia (Alvarado y Figueroa 1992). De la misma forma, tortugas negras marcadas en el archipiélago de Galápagos se encontraron en Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador continental y Perú, en distancias de 1233 a 2143 km del archipiélago (Green 1984).

Sin embargo, este método no siempre funciona pues depende en buena medida de la disposición de las personas que pudieran encontrar individuos casualmente y su acceso a un medio para reportarlos, así como del esfuerzo e inversión de los investigadores para recuperar individuos marcados. Se requiere invertir mucho tiempo y esfuerzo de marcaje, pero la tasa de recaptura es relativamente baja: Alvarado y Figueroa (1992) reportaron 5176 tortugas marcadas, Green (1984) reporta 5844, para 47 y 23 individuos recapturados, respectivamente. Además, se han dado casos en que las etiquetas se desprenden, haciendo imposible volver a rastrear algunos individuos o incluso puede

duplicarse la información si se le colocasen marcas nuevas a una tortuga que haya perdido las anteriores.

8. Estudios de telemetría satelital. La telemetría satelital es otro método de rastreo que permite conocer de forma detallada las rutas migratorias de las tortugas. Los resultados son sumamente exactos, pero tiene la desventaja de que el precio de los transmisores y receptores es muy alto, lo cual limita bastante el número de individuos que se puede seguir. En la playa de anidación Nombre de Jesús, Costa Rica, se marcó con transmisores satelitales a diez hembras de tortuga negra, para encontrar a qué sitios se dirigían después de anidar e identificar sus sitios de forrajeo. De las diez tortugas marcadas en dicho estudio, seis permanecieron en costas costarricenses, una migró a Panamá y tres migraron al norte de Nicaragua, una de las cuales se también llegó hasta las costas salvadoreñas y guatemaltecas (Blanco *et. al.* 2012). Otro estudio con telemetría satelital, (Hart *et. al.* 2015) rastreó la migración de tres hembras marcadas anidando en Colola, Michoacán migrando hacia el sur, a sitios de alimentación en Centroamérica.

9. Estudios con ADN mitocondrial. Se han realizado diversos tipos de estudios moleculares para estudiar la estructura poblacional de las tortugas marinas, por ejemplo electroforesis de proteínas (Smith *et. al.* 1977), RFLPs (Bowen *et. al.* 1992) y posteriormente análisis de ADN nuclear y mitocondrial (Avisé *et. al.* 1992, Karl *et. al.* 1992). Todos los estudios han coincidido en que las tortugas tienen una baja diversidad genética y baja tasa mutacional, que Avisé (1992) estima en 2% por cada millón de años para todos los testudines. Esto se atribuye a factores como el largo tiempo generacional y las bajas tasas metabólicas de estos animales. A partir de los estudios de Carr y Pritchard en los 70s con marcas físicas en el Atlántico, se analizaron las secuencias de ADNmt en los individuos de Surinam y la Isla de Ascención para corroborar la hipótesis de la filopatría postulada por Carr. En estos estudios se confirmó este postulado al encontrar un haplotipo de Surinam que no se encontraba en Ascención. Lahanas *et. al.* (1998), al

trabajar con ADNmt de 80 tortugas verdes en un sitio de forrajeo en las Bahamas, estuvieron entre los primeros investigadores en determinar que en dicho sitio se conglomeraban tortugas provenientes de múltiples colonias de anidación del Caribe. Estos y otros estudios posteriores confirmaron que a pesar del traslape constante en los sitios de alimentación, cada colonia de anidamiento se comporta como unidad reproductora independiente y diferenciada por el ADNmt, ya que este es de herencia matrilineal y el comportamiento filopátrico de las hembras lleva al aislamiento reproductivo y la divergencia en la frecuencia de haplotipos (Bowen 1992; Allard *et. al.* 1994). La región control (CR) del ADNmt, está compuesta de ADN no codificante y tiene aproximadamente 1000 bp de longitud. Por su herencia matrilineal y por ser la región con mayor tasa evolutiva es un marcador molecular más confiable para conocer la estructura genética y los stocks reproductivos de las tortugas marinas.

Debido a las dificultades que presentan otros métodos, el uso de marcadores genéticos es una forma muy confiable y relativamente barata para estudiar la relación entre los sitios de alimentación y desarrollo (que son agregaciones de individuos provenientes de varios orígenes natales) y anidación (también llamados “stocks” o sitios de origen), que permite procesar gran cantidad de muestras simultáneamente y además puede dar información sobre la diversidad genética de la población, lo cual es vital para fines de conservación.

Las herramientas moleculares y el Análisis de Stocks Mezclados son frecuentemente utilizadas para conocer la composición de la población y las contribuciones de cada sitio de anidación a los sitios de forrajeo de *C. mydas* y otras especies de tortuga marina. Distintos investigadores se han dado a la tarea de caracterizar genéticamente las playas de anidación mediante la CR del ADNmt, y se han ido publicando en GenBank, como parte de una colaboración internacional para estudiar las rutas migratorias de las tortugas

marinas y la relación entre los sitios de anidación y alimentación (Benson *et. al.* 2005, NOAA 2015).

Entre otros estudios de este tipo con *C. mydas* en el Océano Pacífico, se puede mencionar a Amorocho *et. al.* (2012), que estimó la composición poblacional de tortugas negras juveniles en el sitio de alimentación Isla Gorgona (Colombia), y encontró que la mayoría de individuos provenían de Galápagos y Michoacán, pero había dos individuos con haplotipos que se parecían mucho a las secuencias reportadas de la Polinesia Francesa y Japón, además de uno cuya secuencia se parecía mucho a la reportada en dos atolones de Micronesia. Dutton *et. al.* (2008), encontraron que la población de *C. mydas* en el Archipiélago Hawaiano se comporta como una sola unidad de manejo, con un solo stock genético de seis haplotipos, todos provenientes del sitio de anidación FFS. Se compararon las secuencias de 788 tortugas muestreadas en zonas de alimentación de dicho archipiélago con los datos de tres posibles sitios de anidación (FFS, Michoacán y Galápagos), pero únicamente tres individuos presentaban haplotipos no encontrados en FFS.

La combinación de los datos provenientes de los distintos tipos de rastreo (genético, físico y satelital) sugiere que hay un traslape considerable entre las poblaciones costarricenses, michoacanas y galapagueñas dentro de las zonas de alimentación de Centroamérica (Hart *et. al.* 2015).

10. Análisis de Stocks Mezclados. Puede conocerse el origen natal y la contribución relativa de cada sitio de anidación a un sitio de alimentación determinado a través de un Análisis de Stocks Mezclados (MSA), una herramienta originalmente desarrollada para conocer la composición de las poblaciones de salmón en los sitios de alimentación costeros (Bolker *et. al.* 2003). Esta ha comprobado ser una herramienta muy útil para conocer la conectividad entre los hábitats que usan las tortugas marinas y otros animales

marinos migratorios a lo largo de su vida. La mayoría de MSA en tortugas marinas se ha realizado en el Océano Atlántico y el Caribe y cada vez hay más estudios para conocer el comportamiento de las especies del Pacífico Oriental. Según distintas publicaciones, se ha logrado descubrir que hay diversos factores que influyen en la composición genética de un área de alimentación, por ejemplo el tamaño de la población del sitio de origen (Lahanas *et. al.*, 1998), las corrientes superficiales (Lucas *et. al.*, 2004) y el comportamiento de fidelidad a los sitios de nacimiento (Bowen *et. al.* 2005, Bass *et. al.* 2006). El grado en que cada uno de estos factores contribuye puede variar entre distintas zonas de alimentación (Jensen *et. al.* 2013).

El supuesto básico de un MSA bayesiano se define por la frecuencia haplotípica de cada uno de los stocks potenciales (Pella y Masuda 2001). Cuando se asignan probabilidades iguales a cada stock potencial de contribuir a la composición genética de un sitio mezclado, el supuesto se denomina *flat prior* (LaCasella *et. al.* 2013). Sin embargo, cuando los stocks potenciales muestran poca diferenciación genética entre sí, haplotipos compartidos o diferencias grandes en el tamaño de la población, puede darse un “peso” a los supuestos previos (*weighted priors*) acorde a información biológicamente significativa que pudiera dar explicaciones adicionales sobre la contribución de los stocks a un área de alimentación (Bass *et. al.* 2006, LaCasella *et. al.* 2013). Por ejemplo, se le puede dar más peso dentro del cálculo al sitio de anidación con la población más grande o al geográficamente más cercano al sitio de alimentación que se está estudiando. En los MSA de agregaciones de tortugas marinas hay tres aspectos que se ha hipotetizado como los más determinantes al componer un sitio de forrajeo: (1) el tamaño de la población de los stocks de anidación; (2) la distancia entre el sitio de alimentación y los stocks de anidación y (3) las corrientes marinas que conectan ambos hábitats (Lahanas *et. al.* 1998, Bass y Witzel 2000, Luke *et. al.* 2004, Bass *et. al.* 2006).

Para complementar la información obtenida por el MSA, usualmente se hacen estimaciones de diversidad genética, particularmente las de diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π). Ambos índices de diversidad son valores de probabilidad entre 0 y 1. La h toma el número de haplotipos en una población y su frecuencia, estimando la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes entre sí. La π mide la probabilidad de que dos sitios homólogos al azar sean diferentes entre sí. Es decir, un alto valor de h indica que hay un gran número de haplotipos en la población y un alto valor de π indicaría que los haplotipos presentes divergen mucho entre sí (Nei y Li 1979; Nei 1987; Goodall-Copestake *et. al.* 2012)

B. JUSTIFICACIÓN

Las tortugas son un grupo muy antiguo, que ha sobrevivido por casi 220 millones de años, las tortugas marinas existen hace aprox. 110 millones (Spotila 2004). En la actualidad aproximadamente la mitad de especies de tortugas existentes (entre ellas todas las tortugas marinas) están en riesgo de extinción. Esto las hace el grupo de vertebrados más amenazados del mundo. Entre sus mayores amenazas se cuenta el tráfico de mascotas, uso de distintas partes de su cuerpo para medicina tradicional, destrucción y contaminación del hábitat, consumo de carne y huevos (WCS 2014) y la elaboración de objetos artesanales con su caparazón, en el caso específico de la tortuga de carey.

Las siete especies de tortugas marinas están en la Lista Roja de IUCN como Vulnerables, En Peligro o En Peligro Crítico. En todas las especies hay poblaciones en declive, debido a la captura accidental (*bycatch*) de la industria pesquera, ingesta accidental de plásticos, caza por su carne o caparazón y el consumo de sus huevos. También se ven afectadas por el desarrollo y aparición de infraestructura de las playas de anidación, ya que la luz artificial desorienta a las crías en su camino al mar y la presencia

de gente, barreras físicas, ruidos y luces puede impedir que las hembras aniden. A pesar de que todas las especies están incluidas en el Apéndice I de CITES que prohíbe el comercio de los animales, sus partes o derivados, en muchos países persiste el comercio ilegal o sin regulaciones y el consumo de objetos de carey, carne de tortuga verde, aceite de tortuga baula, huevos de parlama, entre otros. La gran cantidad de amenazas que se ciernen sobre las tortugas marinas hace urgente la investigación aplicada a la conservación en distintos aspectos de su biología, con la esperanza de que al comprenderlas mejor se podrá elaborar mejores estrategias para protegerlas.

La tortuga negra o tortuga prieta (*C. m. agassizii*) es una población de *C. mydas* que habita exclusivamente en el Pacífico Oriental y se distingue de las poblaciones del resto del planeta por su tamaño más pequeño y coloración oscura. Sus principales sitios de anidamiento están en las costas de México (especialmente Michoacán y las Islas Revillagigedo), Ecuador (Islas Galápagos) y Costa Rica, con anidación esporádica en otras playas tropicales del continente americano. Como todas las tortugas marinas, durante su ciclo de vida migra entre diversos tipos de hábitat, desde su nacimiento en una colonia de anidación, hasta sitios de alimentación (forrajeo) en los que se congregan crías, jóvenes, adultos o una mezcla entre varios estadios. Estos pueden estar o no cercanos al sitio de nacimiento de cada animal, al que las hembras volverán para poner sus propios huevos.

Entender la extensión geográfica por la que se desplazan las tortugas en sus distintas etapas de vida es extremadamente importante para elaborar planes de manejo y conservación, particularmente para formular y hacer las modificaciones pertinentes en la Estrategia Nacional de Tortugas Marinas de Guatemala. Si una tortuga cruza aguas internacionales o llega a un país sin las medidas de protección necesarias, los esfuerzos de conservación en otras partes del mundo pueden verse afectados. Los resultados de este estudio proveerán evidencia genética a la conjetura de que la PdN aglomera tortugas de

distintas partes del Pacífico Oriental y comprobará o refutará que también hay individuos provenientes de otras regiones, como el Pacífico Central o incluso el Pacífico Occidental. Estos hallazgos serán importantes para incluir en una actualización del Plan Maestro del PNSN y fortalecerá la necesidad de priorizar la conservación de las áreas marinas y costeras en colaboración con otros gobiernos.

C. OBJETIVOS

1. General. Contribuir al conocimiento sobre la historia natural y rutas migratorias de las tortugas negras a través del estudio de ADNmt.

2. Específicos

- Definir de qué playas de anidamiento provienen las tortugas negras que llegan a alimentarse a la Poza del Nance, Parque Nacional Sipacate Naranjo, Escuintla por comparación de secuencias de ADNmt reportadas en sitios de anidación.
- Determinar si la cercanía geográfica o el tamaño de población de playas de anidación influye en la composición de haplotipos de la población de la Poza del Nance.
- Conocer la composición de haplotipos en la Poza del Nance mediante la amplificación de fragmentos de la región control del ADNmt.
- Estimar la contribución relativa de cada uno de los sitios de anidación al sitio de forrajeo a través de un Análisis de Stocks Mezclados.

D. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La proporción de haplotipos provenientes del sitio de anidamiento con mayor población (Michoacán, México) es de mayor a la de otras playas de anidación en como

Galápagos, Revillagigedo y Costa Rica, debido a la relativa accesibilidad y cercanía desde México.

II. MARCO METODOLÓGICO

B. PROCEDIMIENTO

1. Sitios de estudio

a. **Parque Nacional Sipacate-Naranjo.** El Parque Nacional Sipacate-Naranjo fue creado en 1969 mediante un Acuerdo Gubernativo para proteger especies forestales valiosas, aves marinas y otras especies de fauna silvestre en vías de extinción. Está ubicado a 35msnm en el litoral del municipio de La Gomera, departamento de Escuintla en la latitud 14°05'03" y tiene 2000 hectáreas (20km²) de extensión (Figura 4). Estuvo bajo la responsabilidad de diversas instituciones pero nunca hubo un sistema administrativo ni un plan de manejo, provocando degradación del medio y sobreexplotación de los recursos. El primer Estudio Técnico en el parque no fue elaborado sino hasta el año 2000, cuando el CONAP tomó formalmente la administración del PNSN y elaboró el primer y único Plan Maestro del área hasta la fecha (CONAP 2002).

El área presenta clima cálido con estación seca (noviembre-abril) y lluviosa (mayo-octubre). Está en la zona de vida Bosque Seco Subtropical (Bs-S) según Holdridge. El sistema hídrico del área es de relevancia por la interdependencia entre el sistema marino, estuarino y fluvial. El sistema de humedales del área protegida es de gran importancia porque no sólo alberga enorme riqueza de flora y fauna sino que provee servicios ambientales como captura y retención de sedimentos y nutrientes, protección de las líneas costeras, mantenimiento de calidad, carga y recarga de agua, etc. Además, provee recursos a la comunidad al ser un punto de potencial ecoturístico, surf, fuente de extracción de leña de mangle, madera y hojas de palma para construcción, vía de transporte acuático y pesca, entre otras.

El sitio es está reportado para desove de tortugas marinas baule (*Dermochelys coriacea*), parlama (*Lepidochelys olivacea*) y hay reportes de desoves ocasionales de carey (*Eretmochelys imbricata*). No hay reportes de que la tortuga negra desove en este sitio, pero es relativamente fácil de encontrar dentro de la Poza del Nance (CONAP, ONCA y FONACON 2002). La Poza, es un área de alimentación y reproducción para la tortuga negra que las alberga todos los meses del año, por la gran cantidad de algas en el área, en especial *Gracilaria sp.* (CONAP 2008). Las cuatro especies de tortuga reportadas en el parque están en el apéndice I de CITES, dentro de categorías de amenaza de la IUCN y en la categoría 3 de manejo de LEA-CONAP, salvo por la carey, que está en categoría 2.

b. **Poza del Nance.** La poza es una de las áreas más anchas y profundas del estero Sipacate. Dicho estero se extiende desde Sipacate hasta el Paredón Buena Vista y constituye el inicio del Canal de Chiquimulilla (ver Figura 6). Las orillas del estuario están extensamente cubiertas de manglar y sus aguas tienen influencia del mar, agua dulce continental y precipitación pluvial (c). Dicho lugar es un sitio de reproducción y forrajeo para *C. m. agassizii* durante todo el año. El informe anual para Guatemala de la Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas (2010) identificó la navegación en lancha como la mayor amenaza para la especie en dicho hábitat, ya que al circular a altas velocidades puede causarse lesiones a los animales. Varios individuos capturados a lo largo de los años durante la identificación y marcaje que ha hecho Protortugas se han encontrado con heridas ocasionadas por propela de motor.

Figura 6. Mapa de la Poza del Nance.

Se resaltó en amarillo el Departamento de Escuintla, el PNSN tiene una marca roja.

La Poza del Nance está señalada con una marca rosa.



(Elaboración propia)

2. **Captura de ejemplares.** El protocolo utilizado para capturas es el mismo que Protortugas ha utilizado desde sus inicios, que corresponde a las sugerencias del manual de Eckert *et. al.* (1999). Se utiliza un trasmallo de seda verde no. 120, de 200m de longitud por 5m de alto, con luz de tres pulgadas en cada espacio. Este se extiende a lo ancho de la poza, fijando la red en un extremo. Una vez completamente extendido, se dejan pasar aproximadamente 5-10 minutos y la red comienza a cerrarse ambos lados, en forma de gota, para que todas las tortugas que hayan estado nadando en el área queden controladas.

Luego, una por una se les sacará de la red y subirá a la lancha para llevarlas hasta la orilla, donde se les colocará una toalla mojada sobre los ojos para evitar el estrés, mientras esperan a ser sexadas, pesadas, medidas, marcadas según los estándares y métodos del manual de NMFS-SEFSC (2008) y se les tomará una muestra de tejido cutáneo (como se especifica en la sección 4). Luego se les liberará de vuelta a la poza.

Como requisito legal, es indispensable tener una licencia de investigación de CONAP para este proyecto, ya que implica la manipulación de fauna silvestre en su ambiente natural, y una licencia de colecta para poder tomar y procesar las muestras de tejido cutáneo. Institucionalmente se requiere la autorización del Comité de Ética en Cuidado y Uso Animal (CEUCA) de la UVG. Estos documentos se incluyen en los Anexos 4, 5 y 6.

3. **Marcaje y medidas.** A todas las tortugas nunca capturadas en la Poza del Nance se les identifica con marcas PIT marca Avid® los cuales transmiten y se leen a una frecuencia de 125kHz. Siguiendo la metodología estándar, también utilizada por Protortugas desde 2002 y acorde al manual NMFS-SEFSC (2008). Al capturar un ejemplar, se le pasaba el lector por el hombro derecho y el resto del cuerpo para saber si estaba previamente marcada y en caso afirmativo se anotó el número. Si era una tortuga nueva (nunca antes capturada), se le inyectaba una marca PIT Avid® nueva en el músculo del hombro derecho.

Además de estas, se colocan marcas metálicas externas (*flipper tags*) manufacturadas por NBT (National Band and Tag Company, Kentucky, EEUU), hechas de aleación Inconel® 681, parte de la serie GC000-GC999. Estas se colocan según métodos estandarizados, con un aplicador especial en las aletas anteriores a todas las tortugas que no las posean, con el número par del lado derecho y un impar del lado

izquierdo. De esta forma en la base de datos, a cada tortuga le corresponden dos números: los de las marcas de las aletas y la del PIT. Las marcas metálicas viejas que no hayan sido colocadas por Protortugas se anotarán y reportarán a la entidad que las marcó originalmente, para contribuir a los proyectos de recuperación de datos. También se dará aviso al CMTTP (ACCSTR, Universidad de Florida, EEUU), que es el programa centralizado encargado de manejar los datos de marcaje y facilitar el intercambio de información.

Si la etiqueta de una tortuga ya marcada luce dañada, cubierta por organismos (por ejemplo, percebes) que no pueden despegarse o si la marca parecía estar en riesgo de desprenderse, la etiqueta vieja se removía y se colocaba otra. Se procede de igual forma si la etiqueta vieja está colocada de una forma que dañe al animal (crecimiento de tejido alrededor o rasgando el tejido), procurando que las etiquetas nuevas no causen incomodidad. En ambos casos, las etiquetas retiradas se reportarán (NMFS-SEFSC 2008).

4. **Toma y almacenamiento de muestras de tejido cutáneo.** Se tiró con una pinza de la piel suave de la aleta posterior derecha y con un bisturí (una hoja nueva por cada animal), se obtuvo aprox. 0.5-1 cm² de tejido del borde posterior de la aleta, se cortó en pedazos más pequeños dentro del tubo para aumentar la penetración del buffer y se almacenó en buffer SED (250mM EDTA pH8.0; 20% DMSO; saturado de NaCl aprox a 230 g/L) en tubos de 2mL, sin refrigeración (Chassin, O.; Profesor titular del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, UMICH 2015 comunicación personal). Se envolvió la tapa de cada tubo con parafilm para evitar escurrimiento de líquido durante el transporte.

Antes y después de la toma de tejido se desinfectó el área con gluconato de clorhexidina al 0.5% para preparar la piel y prevenir infecciones en la zona de corte. Este procedimiento provoca poco o ningún sangrado. Todo el tiempo se usaron guantes

quirúrgicos. Stephens *et. al* (2010) comprobaron con *Lepidochelys kempii* que la biopsia de tejido es un método poco invasivo, minimiza el estrés para el animal y es una fuente confiable de ADN de calidad, comparable al que se puede obtener de la sangre.

Después de la toma de muestra los guantes quirúrgicos y pinza se enjuagaron con agua, alcohol y luego hipoclorito de sodio 1% para evitar contaminación. Además, por cada cinco individuos capturados se cambiaron los guantes por unos nuevos (Ávalos, A.; investigador del Instituto de Investigaciones, UVG, 2015 comunicación personal). Cada tubo (en la tapa y lateral) se identificó con un código de muestra y la fecha. En los anexos 1 y 2 se presentan las hojas de campo que se usaron en la investigación: el anexo 1 incluye las medidas que Protortugas toma en todas las visitas y una hoja adicional que relaciona las marcas con el código de muestra de tejido, el cual consistió en tres números, comprendidos en una serie desde 001 hasta 999 a fin de facilitar el etiquetado y procesamiento de la información.

5. Extracción de ADN. Se procesaron las muestras en los laboratorios de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala. Para extraer el ADN se utilizó el siguiente protocolo para *C. mydas*, elaborado por Fitzsimmons (1997) y con las recomendaciones basadas en entrevistas con el Dr. Omar Chassin (2015):

- Pesar aprox. 0.1g de tejido de cada muestra y se agregarle 300 μ L de solución de extracción (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; 10mM NaCl; 0.1% SDS) y 5 μ L de proteinasa K (10mg/mL) en un vial de 1.5mL.
- Incubar entre una y tres horas a 60°C, invirtiendo ocasionalmente los viales.
- Añadir 150 μ L de acetato de amonio 7.5M y refrigerar por 20 minutos a -70°C para precipitar las proteínas.
- Centrifugar por 20 minutos a 13,000rpm a 4°C y transferir el sobrenadante a un vial limpio.

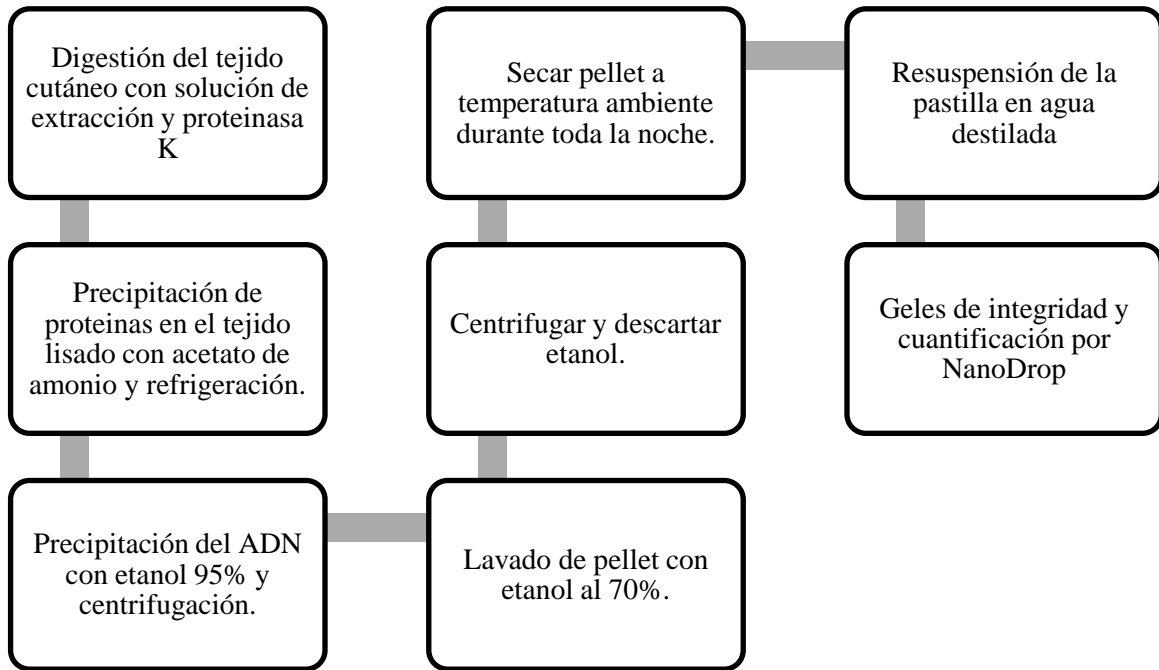
- Para precipitar el ADN, añadir 1mL de etanol 95% frío y refrigerar a -70°C por 20 minutos (o toda la noche) y centrifugar durante 20 minutos a 4°C.
- Eliminar etanol por decantación evitando perder la pastilla. Luego añadir 600µL de etanol 70% frío y centrifugar a 13,000rpm durante 20 minutos a 4°C.
- De nuevo eliminar el etanol de los viales por decantación y secar la pastilla a temperatura ambiente.
- Resuspender la pastilla en 100µL de agua bidestilada desionizada y almacenar el tubo con ADN a 4°C.

6. Determinación de la integridad, pureza y cuantificación del ADN en solución.

En geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed®, se corrieron 4µL del ADN más 1µL de Loading Dye y se revelaron bajo un transiluminador de luz ultravioleta, para examinar su integridad. Se obtuvo la concentración de ADN en ng/µL de cada muestra mediante un análisis con NanoDrop™, colocando un blanco cada diez muestras para asegurar que la calibración y la lectura eran correctas. Finalmente, se procedió a amplificar todas las extracciones exitosas.

7. **Amplificación de ADN.** Los PCR y análisis de datos se hicieron en el Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica (CIBCM-UCR), San José, Costa Rica. Se amplificó el ADN con los cebadores LCM15382 (5'-GCTTAACCCTAAAGCATTGG-3') y H950 (5'GTCTCGGATTTAGGGGTTT-3') para la la región control de ADNmt, de acuerdo a lo sugerido en la publicación de Abreu-Grobois et. al. (2006) y usados para *C. m. agassizii* (Dutton et. al.2014). En muchos estudios similares para sitios de forrajeo se han usado los cebadores DHCM2 y LTCM2 (Amarocho y Reina 2007; Anderson et. al. 2013; Dutton et. al. 2008) que amplifican entre 380 y 510 bp, pero los cebadores escogidos amplifican alrededor de 773-880bp. Ese incremento en la resolución puede ayudar a distinguir entre haplotipos muy similares entre sí (Abreu-Grobois 2006).

Figura 7. Diagrama de flujo del procedimiento de extracción de ADN utilizando el protocolo de Fitzsimmons (1997) con sugerencias adicionales de Chassin



(Com. pers. 2015)

Para amplificar las muestras se hizo una mezcla de PCR a un volumen final de 25 μ L a los que se añade la solución de ADN. La receta de PCR, con un volumen final de 25 μ L está modificada a partir de la proporcionada por Heidemeyer (com. pers. 2015): 0.132mM dNTPs, 2.0mM de MgCl₂, 0.88mM de cada cebador, Buffer de PCR (Thermo Scientific) 1X, 1U de Taq polimerasa (Thermo Scientific) y solución de ADN mitocondrial (20ng/ μ L).

Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron:

1. Desnaturalización inicial por 4 minutos a 94°C.
2. 35 ciclos de:
 - a. desnaturalización a 94°C por 50 segundos,

- b. anillamiento a 50°C por 30 segundos y
 - c. 30 segundos de polimerización a 72°C por 60 segundos.
3. Extensión final por 7 minutos a 72°C y un ciclo final de 3 minutos a 30°C.

En cada PCR se incluyó un blanco y un control positivo para detectar contaminación o cualquier otro tipo de fallo. Los resultados de la amplificación se visualizaron en geles de TBE y agarosa al 1.2% teñidos con GelRed®.

8. Análisis de secuencias. Los productos de PCR se enviaron por correo a los laboratorios de MCLAB EN Estados Unidos para ser purificados y posteriormente secuenciados. Se mandaron tubos rotulados con 10 µL de cada producto amplificado en una concentración de 10-20 ng/µL, junto con 10 µL de cada cebador a 3.2 µM.

Al recibir de vuelta los electroferogramas, se utilizó el software Geneious R9 (Kearse *et. al.* 2012) para alinear, curar y recortar las secuencias recibidas y compararlas con los datos ya publicados de las secuencias de la región control del ADNmt en sitios de anidación publicadas en GenBank® del NCBI (Benson *et. al.* 2005) y la base de datos de la NOAA (2015). Se usó la nomenclatura estándar de los haplotipos de 384bp, con el prefijo CmP (propio de la población del Océano Pacífico) seguido por una secuencia de números asignada a los distintos sitios y el sufijo numérico secuencial asignado por Dutton *et. al.* (2014) para indicar variantes por polimorfismo en las 386bp adicionales en las secuencias de 770bp. Los haplotipos nuevos (también llamado “huérfanos”) se enviaron al Dr. Peter Dutton (peter.dutton@noaa.gov) y al Dr. Michael Jensen (jensen@noaa.gov), de la NOAA para confirmar el estado de la secuencia y asignarle un nuevo número, a fin de poder proceder a publicarlo en GenBank.

9. Análisis de datos. Con el programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier 2009) se estimó la diversidad haplotípica (h) basada en Nei (1987) y nucleotídica (π) basada en el modelo de Tamura y Nei (1993). Las contribuciones relativas de cada sitio de anidación cuyos haplotipos se encuentren en la Poza del Nance se estimaron usando un Análisis de Stocks Mezclados (MSA). El programa utilizado fue BAYES (Pella y Masuda 2001), el cual utiliza probabilística bayesiana para estimar la composición mezclada de un sitio, pudiendo incluir supuestos previos. Para el MSA de este estudio únicamente se tomaron en cuenta los haplotipos que también se encontraban en al menos uno de los sitios de anidación. El MSA de este estudio incluyó un *flat prior* (dar a todos los posibles sitios de origen una probabilidad igual de contribuir al sitio de anidación) y dos *weighted priors* (dar mayor peso dentro del cálculo probabilístico a ciertos sitios de anidación según alguna característica): de tamaño poblacional y para la distancia geográfica entre los stocks de anidación cuyos haplotipos se encontraron en la poza del Nance.

Para el *weighted prior* de tamaño poblacional se calculó la proporción del tamaño de cada stock sobre el total de hembras anidantes totales en todos los stocks, y se dio mayor peso a sitios con mayor población de hembras anidantes. Los valores de tamaño poblacional se obtuvieron de Seminoff *et. al.* (2015) y Heidemeyer (no publicado). El *weighted prior* de distancia se calculó usando la proporción de distancias totales dividido entre las distancias específicas desde cada sitio, las cuales se estimaron con el programa Google Earth versión 7.1.5.1557. Para cada uno de los *priors* se realizaron cuatro cadenas MCMC (*Marcov Chain Monte Carlo*), una por cada uno de los cuatro sitios de anidación potencial, con 50,000 permutaciones por cadena. En el Cuadro 1 se pueden encontrar los supuestos utilizados para crear el modelo.

Cuadro 1. Valores de los supuestos utilizados para el Análisis de Stocks Mezclados.

Playa de anidación	Flat prior	Distance prior		Population size prior	
		<i>Distancia (km)</i>	<i>Total/ proporción de distancia del stock</i>	<i>Hembras anidantes</i>	<i>Proporción</i>
Revillagigedo	0.25	2432	0.22	500	0.63
Michoacán	0.25	1473	0.20	11580	0.19
Costa Rica	0.25	715	0.45	2826	0.15
Galápagos	0.25	1628	0.13	3603	0.03
TOTAL	1.00	6248	1.00	18509	1.00

III. RESULTADOS

A. Tamaño y sexo de los individuos muestreados

Se tomaron muestras de tejido de 34 individuos en total, de los cuales 32 eran hembras y dos machos, todos adultos sexualmente maduros. El largo curvo del caparazón (CCL, *curved carapace length* por sus siglas en inglés) de los individuos muestreados es de 83.08 cm y el peso promedio de 65.19 kg. Se depuró la base de datos de medidas recopilada por Protortugas en diversos muestreos desde el año 2000, la cual compila los datos de 147 individuos en total. Al obtener los promedios de tallas de dicha base de datos, se encontró un CCL promedio de 83.58 cm (desviación estándar +/- 11.46cm) y 71.44 kg (desviación estándar +/- 26.28 kg), como puede analizarse en las figuras 8 y 9. De estos 147 individuos, cinco están identificados como machos sexualmente maduros.

Figura 8. Promedio de CCL en tortugas de PdN de acuerdo a la base de datos de Protortugas (n=147)

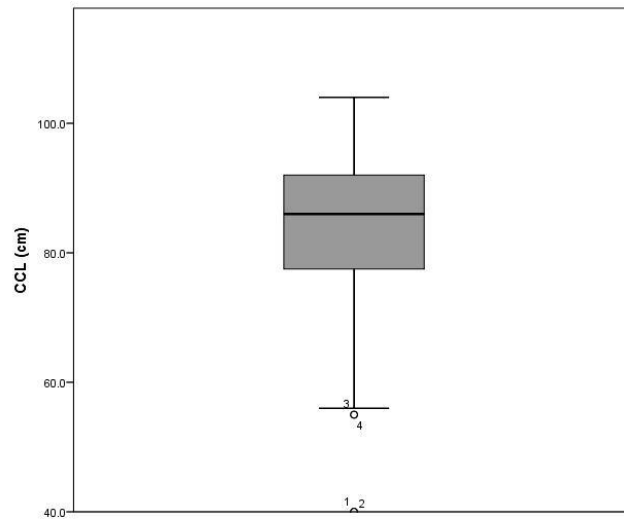
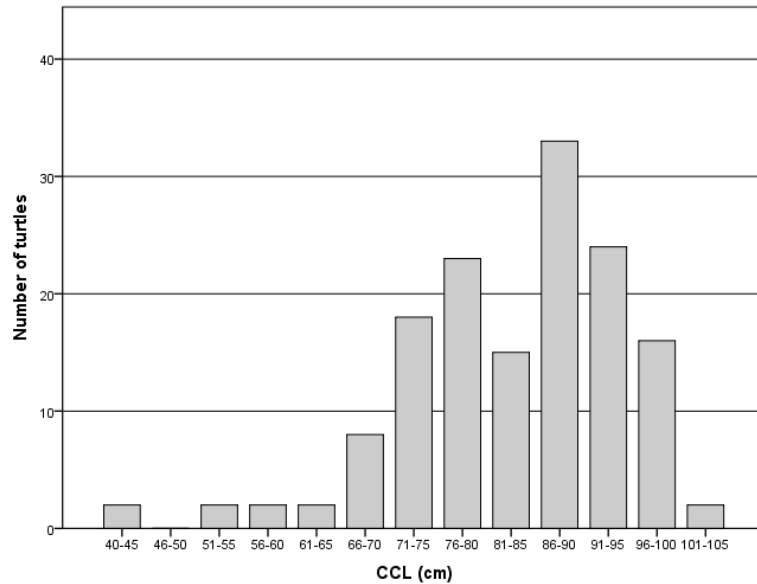


Figura 9. Tamaño de las tortugas de PdN (CCL) de acuerdo a la base de datos de Protortugas (n=147), dividido en clases de tallas de 5cm.



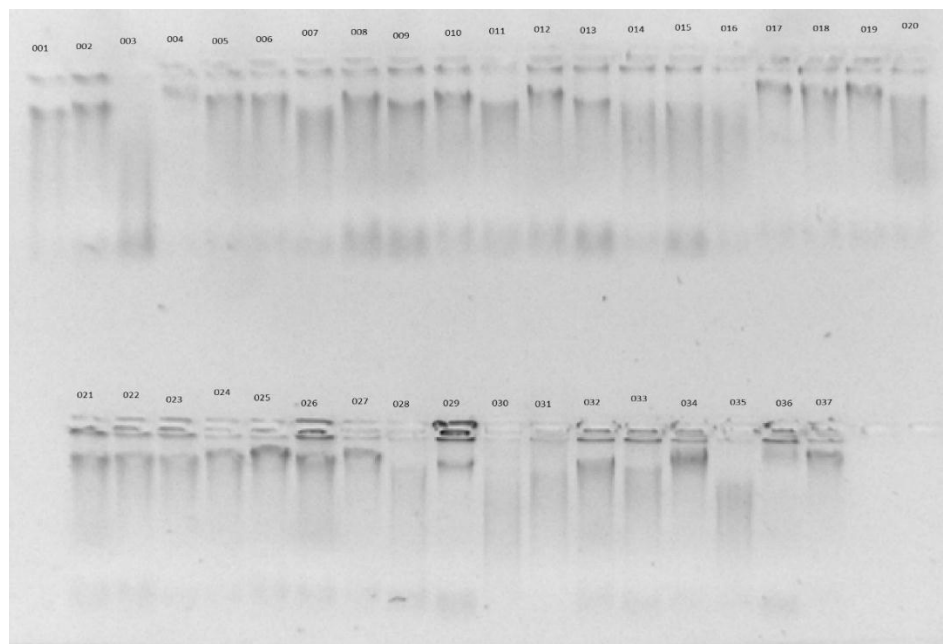
B. Extracción y amplificación de ADN.

Se extrajeron un total de 34 muestras de individuos distintos. El rendimiento promedio de las muestras fue de 534 ng/ μ L. La integridad de las muestras es buena, como puede observarse en la Figura 10.

Se realizó el procedimiento de amplificación para las 34 muestras, basándose en la concentración mostrada en el NanoDropTM para diluir el ADN a 20ng/ μ L. En los casos que no se obtuvo amplificación en el primer intento, se repitió el procedimiento y se ajustaron las diluciones de ADN si era necesario. Finalmente todas las muestras amplificaron exitosamente. En todos los casos se utilizó un blanco y un control positivo para asegurar la confiabilidad de los resultados. Los resultados pueden observarse en la Figura 11.

Figura 10. Gel de integridad de ADN.

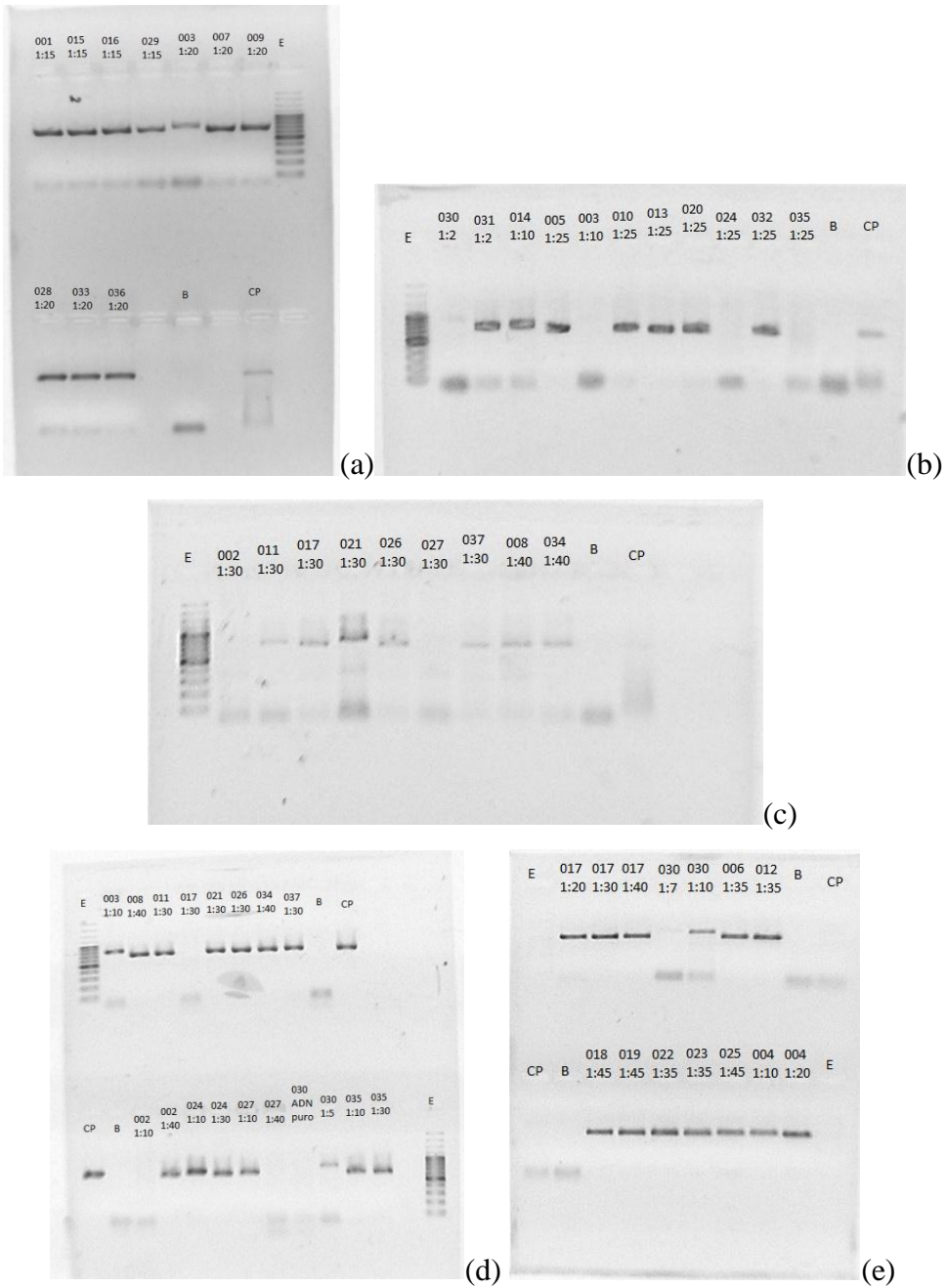
El número arriba de cada carril indica el código de muestra.



C. Análisis de stocks mezclados, diversidad haplotípica y nucleotídica.

Después de recibir los resultados de la secuenciación, las secuencias se recortaron a 773bp, se alinearon y se compararon con la base de datos de haplotipos mitocondriales que se han caracterizado en distintas playas de anidación alrededor del mundo, y cuyas secuencias se encuentran disponibles en GenBank® del NCBI (Benson *et. al.* 2005) y la base de datos de la NOAA (2015). Se encontró un total de ocho haplotipos en el sitio. Siete de estos pudieron asignarse a sitios de anidación y uno era un haplotipo huérfano, al cual las entidades correspondientes nombraron como CmP 7.2.

Figura 11 (a), (b), (c), (d) y (e). Geles de amplificación de ADN. El número de arriba es el código de muestra, abajo está la razón de dilución del ADN. CP: control positivo; B: blanco; E: escalera.



En el Cuadro 2 se puede apreciar la frecuencia de haplotipos encontrados en los distintos sitios de anidación, y en la Poza del Nance. El valor obtenido para diversidad haplotípica (h) fue de 0.7023 ± 0.0668 y para diversidad nucleotídica (π) fue de 0.002318 ± 0.001527 . En el Cuadro 3 se presentan los resultados del MSA, mostrando una contribución mayoritaria de Michoacán sobre los demás sitios de anidación en los tres *priors* utilizados. Los resultados de los *priors* difieren muy poco entre sí.

Cuadro 2. Frecuencia de haplotipos de ADNmt (773bp) de tortuga negra (*Chelonia mydas*) por individuos capturados en PdN y por número de hembras anidadas en los ocho sitios de anidación del Pacífico Oriental incluidos en el MSA de PdN. Datos adaptados a partir de Dutton *et. al.* (2014). El * indica nuevos sitios de muestreo y haplotipos de Heidemeyer (2015). Los ** indican nuevos haplotipos de este estudio.

Sitio	POZA DEL NANCE													
	TOTAL	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cmp1.1														
Cmp2.1														
Cmp3.1														
Cmp3.2														
Cmp4.1														
Cmp4.2														
Cmp4.3														
Cmp4.4														
Cmp4.5														
Cmp4.6														
Cmp4.7														
Cmp4.8														
Cmp4.9														
Cmp4.11														
Cmp5.1														
Cmp6.1														
Cmp6.2														
Cmp7.1														
Cmp7.2**														
Cmp8.1														
Cmp8.2														
Cmp8.3														
Cmp9.1														
Cmp11.1														
Cmp12.1														
Cmp13.1														
Cmp14.1														
Cmp15.1														
Cmp15.2*														
Cmp17.1														
Cmp17.2														
Cmp24.1														
Cmp93.1														
Cmp218.1*														
Cmp220.1*														
ISLAS REVILLAGIGEDO	77	1	8	13	2	3	40	2	33	2	7			
<i>Isla Clarion</i>	58		6	7	2	3								
<i>Isla Socorro</i>	19	1	2	6										
MEXICO	120	58	2	7	5	43	3							
<i>Colola</i>	120		58	2	7	5	43	3						
COSTA RICA	108	12	44	22	4	15	22	4	15	3	1	5		
<i>Nombre Jesus</i>	20	2	7	3	2	5	3	2	5	1	1	1		
<i>Isla San Jose*</i>	46	5	20	11	2	4	11	2	4	1	2	2		
<i>Playa Coloradas*</i>	42	5	17	8	6	8	8	6	8	1	3	3		
GALAPAGOS	126	26	51	31	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>Las Bachas</i>	45	14	16	8	3	16	8	3	16	8	3	16		
<i>Las Salinas</i>	81	12	35	23	3	35	23	3	35	23	3	35		
TOTAL INDIVIDUOS	591	146	29	21	15	99	2	2	6	3	65	31	5	1

Cuadro 3. Resumen de los resultados del MSA en BAYES: contribución relativa de cada playa de anidación (%), con su respectiva desviación estándar (SD) e intervalos de confianza del (CI)

Playa de anidamiento	Flat priors			Distance priors			Population size priors		
	Media	SD	CI (95%)	Media	SD	CI (95%)	Media	SD	CI (95%)
Revilla ggedo	1.000	1.970	0.00-6.79	0.520	1.380	0.00-4.57	0.110	0.660	0.00-1.22
Michoacán	74.320	10.640	51.56-92.64	73.980	10.540	51.28-92.17	76.600	10.490	53.90-94.52
Costa Rica	6.540	6.650	0.00-23.72	8.520	7.140	0.07-26.31	5.210	6.330	0.00-22.15
Galápagos	18.140	10.290	1.87-41.23	16.980	10.120	1.04-39.86	18.080	10.270	1.63-41.11

IV. DISCUSIÓN

A. Caracteres morfológicos

Entre las *C. mydas* del Océano Pacífico se distinguen dos morfotipos: el “negro”, caracterizado por una coloración en tonos de verde olivo, gris y café, y el “amarillo”, con menos pigmentación y tonalidades más claras en la piel y el caparazón, en tonos de ocre, amarillo, verde y café claro (ver Figura 12). Todas las tortugas capturadas en Poza del Nance presentan el morfotipo “negro”, característico de las poblaciones del Pacífico Oriental, lo cual se observa claramente en la Figura 13. Esta característica, junto con los resultados de los haplotipos encontrados, permite inferir que en este sitio de alimentación es muy poco probable que haya migración transpacífica, de la cual sí hay indicios en varios sitios de alimentación en Costa Rica (Heidemeyer, com. pers.).

Se distinguió a los individuos sexualmente maduros de los jóvenes con los datos de talla media de anidación de Michoacán (que sería el stock que más contribuye a la composición poblacional de PdN), que es de 77.3cm CCL. Un individuo no se consideró maduro si el CCL era <77.3cm y adulto si el CCL era ≥ 77.3 cm (Seminoff 2000; Figueroa *et. al.* 1993). Se distinguió a los machos y hembras de acuerdo con la longitud de la cola (ver Figura 12), identificando como machos a los individuos con un largo de cola mayor a 10cm y machos adultos aquellos con colas mayores o iguales a 20cm de longitud (Ross 1984, Limpus y Reed 1985, Wibels 1999). Por las longitudes (83.58cm) y pesos promedio (71.44kg) hallados en el área a lo largo de los años, se observa que este es un sitio de alimentación dominado por adultos sexualmente maduros y fuertemente sesgado hacia las hembras (N=147, de los cuales 5 machos y 142 hembras, según los datos extraídos de Protortugas). Al tomar los datos de longitud, peso y sexo únicamente de los individuos de los que se extrajo ADN

(N=34), los datos no difieren de la base de datos anterior: se capturaron 32 hembras y 2 machos, con un CCL promedio de 83.08cm y un peso promedio de 65.19kg.

Figura 12. Comparación de la longitud de la cola entre un macho (izquierda) y una hembra (derecha) sexualmente maduros



(Fotografía de NOAA South West Fisheries Center, EEUU).

Aunque es posible distinguir fácilmente a los adultos sexualmente maduros de subadultos y juveniles por el dimorfismo sexual y con las medidas de peso y longitud, en este caso no se puede saber en qué fase de su ciclo reproductivo llegan las tortugas a la PdN. Dado que las hembras pueden esperar varios años entre una anidada y otra, serían necesarios análisis hormonales y/o ultrasonidos, u otros métodos más invasivos para establecer si van a PdN antes de anidar, al volver, o en los periodos de descanso entre ciclos reproductivos.

Figura 13. Morfotipos observados en las *C. mydas*: “negro”, característico del Pacífico Oriental (izquierda) y “amarillo”, característico del Pacífico Occidental (derecha)



(Foto de Maike Heidemeyer, 2015)

Figura 14. Tortugas capturadas en un muestreo en PdN, todas poseen morfotipo negro



(Foto M. Chavarría, 2015)

B. Análisis de ADNmt

Este estudio es el primero en documentar los orígenes natales de las tortugas negras que se alimentan en Guatemala. Se descubrieron orígenes múltiples de los individuos agregados en PdN, principalmente de México y Ecuador, como se detallará en los párrafos siguientes.

La composición de haplotipos en la PdN es (ver Cuadro 2):

- 17 individuos con el haplotipo CmP 4.1, un haplotipo universal que es el más numeroso en Colola (Michoacán)
- 7 individuos con haplotipo CmP 5.1, nativo de Colola (Michoacán)
- 5 individuos con haplotipo CmP 4.6, es el haplotipo universal, más común en Islas Galápagos
- 1 individuo con haplotipo CmP 4.7, común en las Islas Galápagos, también se ha detectado en un individuo de Isla San José (Costa Rica)
- 1 individuo con haplotipo CmP 4.8, nativo de Colola (Michoacán)
- 1 individuo con haplotipo CmP 8.3, nativo de Costa Rica
- 1 individuo con haplotipo CmP 15.1, nativo de Salinas (Islas Galápagos)
- 1 individuo con haplotipo huérfano, al que se le asignó el nombre CmP 7.2, tras ser enviado a la NOAA para su análisis y caracterización, donde se le consideró un haplotipo nuevo.

Los datos del MSA revelan que la contribución mayoritaria es de la playa de anidación Colola (Michoacán), muy por encima de las demás. En porcentaje, para los tres *priors* la contribución de este sitio en promedio es de 74.97%. (CI medio 52.24 - 93.11%). A este sitio le seguirían las Islas Galápagos, con una contribución relativa

promedio de 17.73% (CI medio 1.51 - 40.73%), una contribución menor de Costa Rica, con promedio 6.76% (CI medio 0.023 – 24.06%) y prácticamente nula de las Islas Revillagigedo, en promedio 0.54% (CI medio 0.00 – 4.19%).

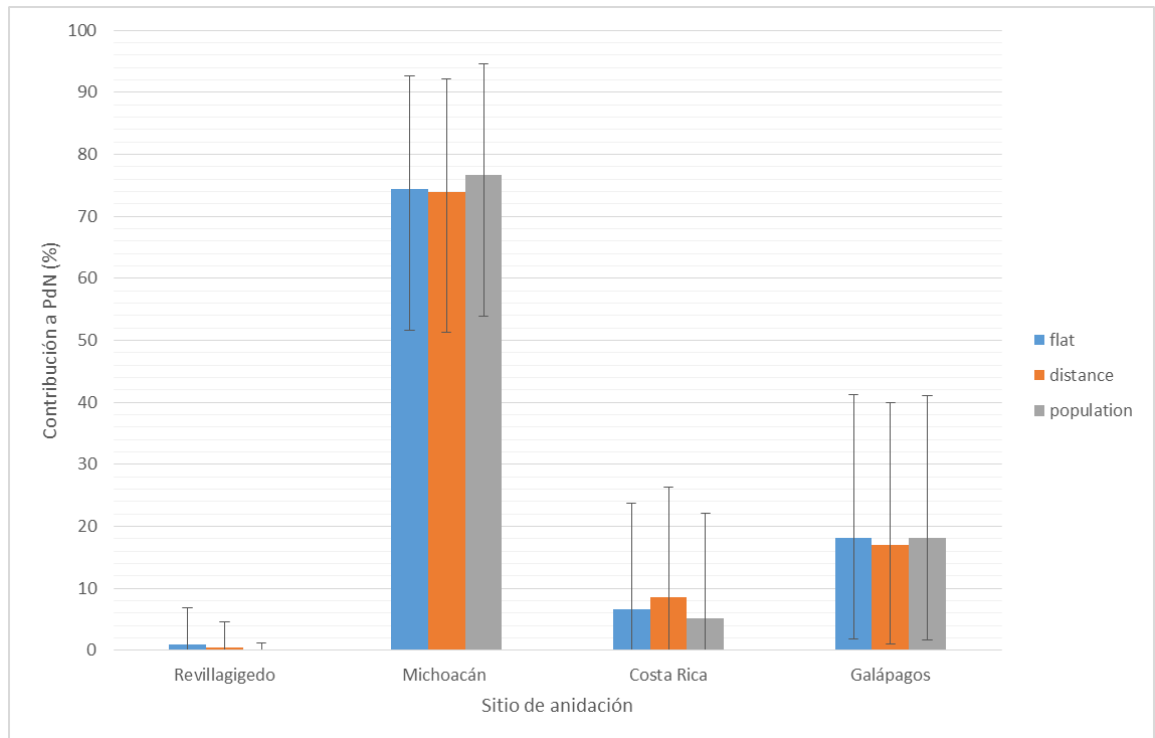
Los resultados del MSA no reflejan una diferencia considerable entre un *prior* y otro, y en todos los casos los intervalos de confianza se traslapan. Esto quiere decir que, al parecer, la distancia y el tamaño de población no parecieran tener un efecto sobre la composición del sitio. Es decir, los resultados no cambian ya sea, asignando a todos los sitios una probabilidad igual de contribuir al sitio de alimentación, o dándole más peso estadístico a los sitios más cercanos geográficamente o a aquellos con mayor número de hembras anidantes. Es interesante notar que los dos sitios que aportarían mayor cantidad de individuos a la PdN (Michoacán y Galápagos), están a más de 1,400km de distancia, mientras que los sitios de anidación más cercanos, en Costa Rica (a menos de 1,000km), parecieran hacer una mínima contribución a la población, aunque sí se encontró un individuo con un haplotipo nativo de dicho sitio. Según los estudios de Heidemeyer (2015) en la Isla del Coco (Costa Rica) la mayoría de las contribuciones (ca. 91%) provienen de Galápagos y hay contribuciones de hasta 5.5% provenientes del Pacífico Occidental, a más de 10,000km de distancia. Con esto podría inferirse que la cercanía muy probablemente no influye en dónde se congregan las tortugas para alimentarse, probablemente debido a que PdN es un sitio de agregación de adultos y estos son nadadores activos, que podrían no depender tanto de las corrientes oceánicas para dispersarse. Sin embargo sería importante complementar los resultados con un análisis de este tipo para descartar completamente la posibilidad de que las corrientes oceánicas sean un factor que favorezca la migración, especialmente desde Michoacán hacia Guatemala. Contrastando los resultados de este estudio con los de Heidemeyer (2015), pareciera que Centroamérica podría funcionar como un puente de convergencia entre las poblaciones anidantes del Pacífico Nororiental y Noroccidental, en el que Guatemala parece tener mayor cercanía al primero y Costa Rica al segundo.

. Como puede observarse en la Figura 15, los intervalos de confianza del MSA en todos los *priors* son muy amplios. Bowen y Karl (2007) mencionan que esto es muy frecuente en los MSA de tortugas marinas debido a diversas limitaciones, por ejemplo, la dificultad para muestrear todas las playas de anidación, especialmente aquellas de anidación solitaria en localidades remotas. y el hecho de que aún se siguen descubriendo poblaciones anidantes en lugares de difícil acceso. Por otra parte, no todas las colonias anidadoras difieren mucho en su frecuencia haplotípica. Por lo tanto se puede considerar que el presente estudio da una aproximación confiable sobre la proporción en la que contribuyen los distintos stocks tomados en cuenta a la composición poblacional de PdN.

Figura 15. Representación gráfica de los resultados del MSA Bayesiano, contribución estimada de cada sitio de anidación potencial, para los tres *priors* probados.

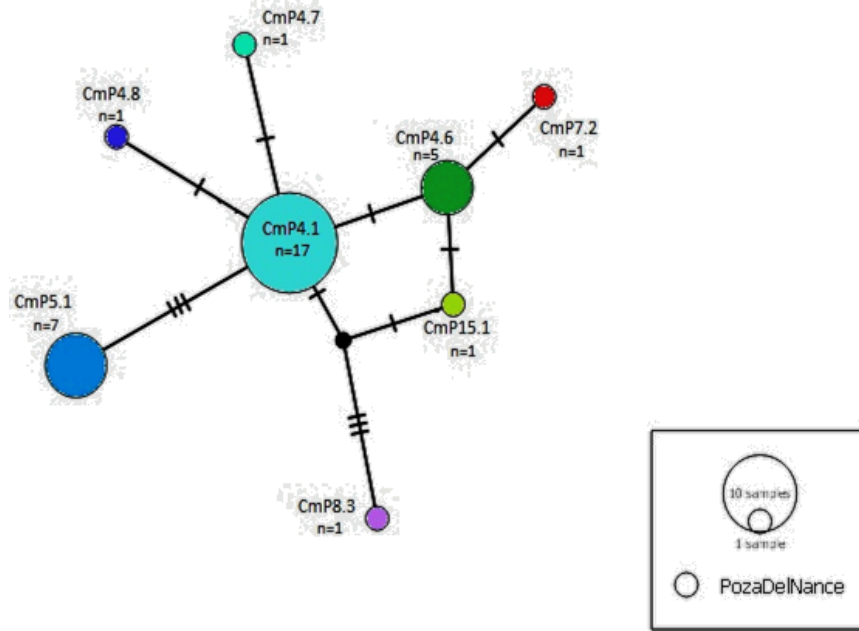
Los intervalos de confianza se representan como barras de error.

Los valores exactos de MSA se incluyen en el Cuadro 3.



Las limitaciones para muestrear ciertas playas de anidación deriva en que ocasionalmente se encuentren haplotipos huérfanos en los sitios de alimentación, a los que es imposible asignarles un origen natal. En el presente estudio se localizó un solo haplotipo huérfano, que se denominó posteriormente CmP 7.2. Como un ejercicio para intentar inferir a qué poblaciones podría estar más relacionado dicho haplotipo, se realizaron dos Redes de Expansión Mínima (*Minimum Spanning Network*, MSN por sus siglas en inglés) introduciendo las secuencias en el programa PopART (Bandelt *et. al* 1999). Este tipo de red relaciona a los haplotipos con base en su número de diferencias o sustituciones. Se realizó un MSN relacionando únicamente los haplotipos encontrados en PdN para ver en dónde se agrupaba CmP 7.2 (Figura 15), y otro MSN tomando en cuenta todos los haplotipos descritos para el Océano Pacífico cuyas secuencias se encuentran en GenBank (figura 16), para ver si los resultados eran coherentes. En efecto en la Figura 16 se observa como todos los haplotipos encontrados en la PdN se agrupan juntos, indicando que existe gran similitud entre ellos, como también lo indica el índice de diversidad nucleotídica. En la figura 15 se observa que CmP 7.2 Se relaciona cercanamente con CmP 4.6 y CmP 15.1. Analizando los datos del cuadro 2 se observa que CmP15.1 es nativo de las Galápagos y que CmP 4.6 también es muy frecuente en estas islas y en Costa Rica. Por los resultados del MSA la autora se inclina a pensar que este individuo podría provenir de las Galápagos. Se resalta que el análisis MSN no se incluye en la metodología ni los resultados ya que es únicamente un ejercicio de inferencia que no suele encontrarse en la literatura, ya que la mayoría de autores suelen analizar varios sitios de alimentación y muestras muy grandes donde pueden aparecer varios haplotipos huérfanos, así que suelen trabajar con cladogramas, y calcular F_{st} En este estudio no se contaba con los datos necesarios para ello.

Figura 16. MSN de los haplotipos encontrados en PdN para el presente estudio.

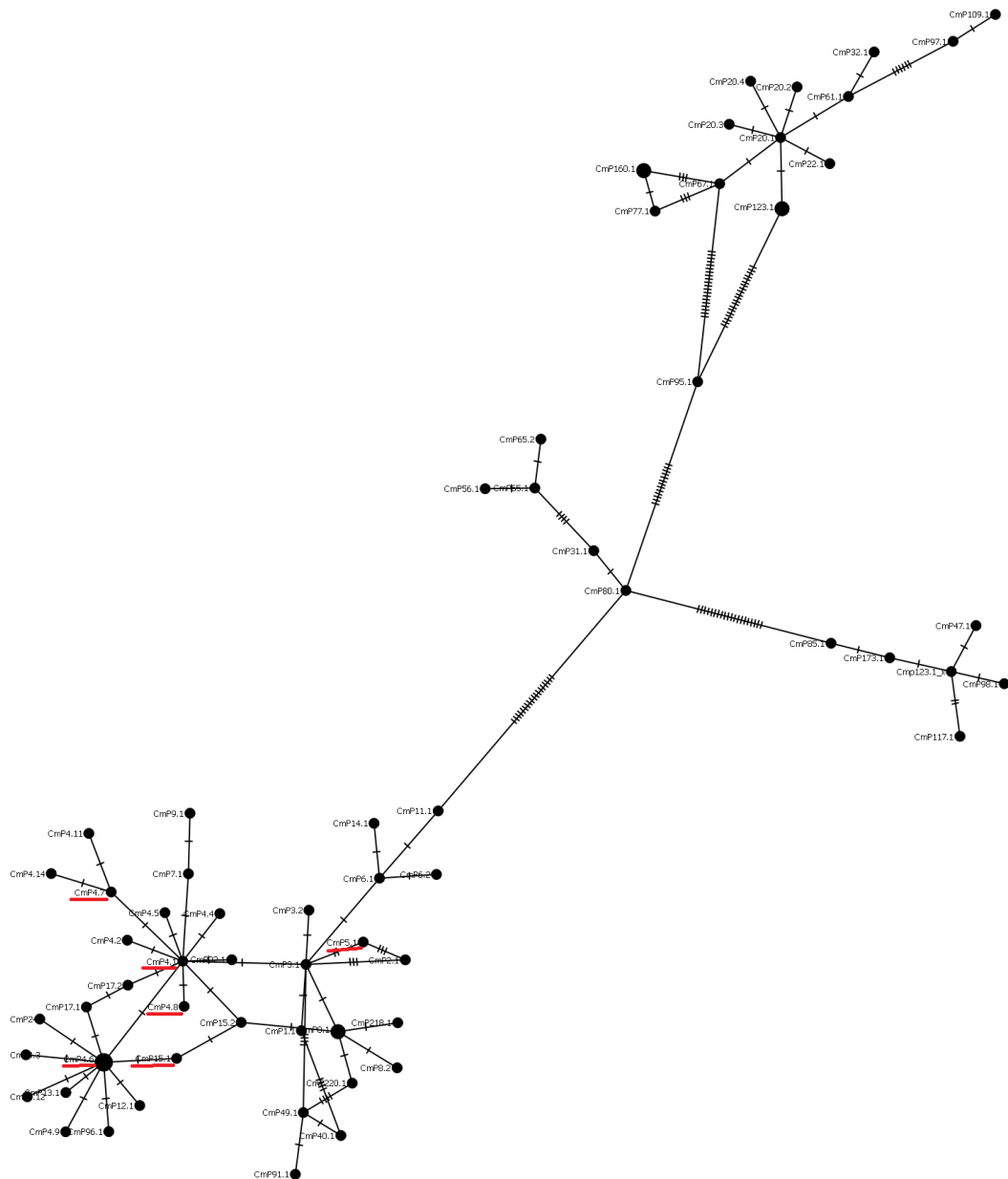


La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes. La diversidad nucleotídica es la probabilidad de que dos sitios homólogos elegidos al azar sean diferentes, es decir, mide qué tan diferente es un haplotipo del otro. En el caso de las tortugas, por el comportamiento filopátrico es de esperar que la diversidad nucleotídica sea siempre menor a la haplotípica. Respecto a la diversidad genética, se encontraron ocho haplotipos (h) totales en el sitio, incluyendo el haplotipo huérfano. La diversidad haplotípica ($h=0.7023 \pm 0.0668$) fue alta y la nucleotídica ($\pi=0.002318 \pm 0.001527$) muy baja. Este resultado se interpreta como que hay numerosos haplotipos en el sitio, pero todos son muy similares entre sí, cumpliendo con el supuesto anteriormente mencionado. Goodall-Copestake *et. al.* (2012) mencionan que una muestra muy pequeña ($n \leq 5$, para dichos autores), puede hacer que los cálculos subestimen o sobreestimen los índices de diversidad h y π y recomiendan tomar muestras con $n \geq$. De acuerdo con estas afirmaciones, el tamaño de muestra utilizado en PdN debería ser suficiente, sin embargo se considera que sí existe la necesidad de muestrear más y durante

más tiempo para tener una idea de las fluctuaciones temporales de los individuos dentro del sitio.

Figura 17. MSN con todos los haplotipos del Océano Pacífico disponibles en GenBank.

Los hallados en PdN se resaltan con rojo.



C. Implicaciones para manejo y conservación de la especie

Poza del Nance es un sitio de alimentación de tortugas marinas adultas, que por el gran volumen de capturas reportadas por Protortugas, se pensaba podía ser importante para las poblaciones del Pacífico Oriental. La tortuga negra no tiene sitios de anidación reportadas en la Costa Pacífica guatemalteca, así que no existían datos que permitieran descifrar la posible proveniencia de dichos animales. Con este estudio se tiene una primera aproximación sobre la composición genética del área.

A pesar de estar dentro de un área protegida, la PdN es un sitio muy intervenido y sujeto a severos impactos antropogénicos, ya que hay turismo en las playas de la zona, tránsito constante de lanchas con motor y pesca artesanal dentro de la poza, pesca de camarón hacia afuera de la costa e influjo de contaminación proveniente de ríos y de basura por las poblaciones cercanas. La agrupación de veterinarios Protortugas, que ha hecho rescates y chequeos del estado físico, ha encontrado diversas lesiones en tortugas de la PdN, entre las que se encuentran: ingesta de plásticos, anzuelos y redes, mortandad y lesiones en el cráneo y caparazón por propelas de lancha, heridas con artilugios pesqueros (atrapadas en redes o enredadas con hilos de pesca, anzuelos clavados en diversas partes del cuerpo), como puede verse en la Figura X (Carlos Alfaro y Jaime Pérez com. pers.).

Es importante resaltar que de acuerdo a los estudios de la IUCN sobre las poblaciones de hebras anidantes en el PO, la población de hembras en Galápagos prácticamente no ha sufrido cambios en las últimas tres generaciones (aproximando 1,400 hembras desde 1976 hasta 2001), probablemente debido a que hace mucho tiempo estas islas son área protegida. Sin embargo ha habido un drástico declive poblacional en Colola Michoacán, estimándose que la población de 15,000 hembras que se observaba en 1970 se redujo a apenas 851 entre 1997-2001 (Seminoff 2004). Dado que las tortugas negras

son una especie migratoria en peligro de extinción, las medidas de conservación deberían planificarse a nivel regional. En este caso, deberían articularse principalmente con las autoridades mexicanas y en segundo lugar las ecuatorianas, ya que es de donde provienen la mayoría de tortugas de la poza. Por tratarse de adultos en edad reproductiva, los individuos de PdN forman parte del número efectivo poblacional de la especie, por lo que los daños a estos podrían impactar directamente en la cantidad de hembras para la playa de anidación.

Podrían enriquecerse los resultados de este estudio con un muestreo genético más exhaustivo que incluya estimación de abundancia, telemetría para conocer los movimientos dentro del sitio de alimentación y las rutas de migración, así como las épocas en las que llegan. Aunque se ha hipotetizado que las tortugas de la Poza llegan a alimentarse principalmente del alga *Gracillaria sp* (Carlos Alfaro y Jaime Pérez com. pers.), se requiere un estudio de ecología trófica con isótopos estables, para conocer exactamente su preferencia alimentaria en cuanto al tipo de alimentos consumidos y la proporción en las que lo consumen.

Figura 18. Lesiones que se han encontrado en las tortugas de PdN



(fotos de Jaime Pérez, Protortugas, tomadas en diversos años)

V. CONCLUSIONES

- 1) Este estudio es un primer acercamiento a la composición genética de las tortugas del área. Según los análisis realizados, la contribución más importante al sitio de alimentación de PdN es de Colola Michoacán, seguido por las Islas Galápagos con contribuciones menores de Costa Rica y casi nulas de Revillagigedo. Sin embargo, dado que el tamaño de muestra es muy pequeño ($n=34$) y que se tomó durante un período de tiempo reducido (únicamente cuatro giras durante 2015), no se puede decir que los resultados sean concluyentes. Estos podrían no ser representativos de cómo se estructura la población de PdN a lo largo del año o no representar todas las playas de anidación cuyos individuos se alimentan en PdN. Además se desconoce con exactitud las rutas que las tortugas toman en su migración, la temporalidad de las mismas y el estadio reproductivo en el que suelen llegar a la PdN.
- 2) Se encontró un haplotipo huérfano, que se conjetura podría estar relacionado a los haplotipos de Galápagos. Probablemente sería necesario que las playas de anidación en dicha área se siguieran caracterizando para encontrar otros individuos con este haplotipo.
- 3) No hay evidencia morfológica (morfotipo amarillo) ni genética (haplotipos mitocondriales) de migración de individuos desde el Pacífico Central y Occidental, como sí han encontrado otros investigadores en varios sitios del Pacífico costarricense. Por esto se asume que PdN es un sitio donde únicamente se congregan individuos del PO.
- 4) Por el tamaño y sexado de los individuos capturados para este estudio, más la base de datos proporcionada por Protortugas, se concluye que este sitio de alimentación está fuertemente sesgado hacia la presencia de hembras adultas

VI. RECOMENDACIONES

1) Debido al enorme impacto antropogénico sobre el ecosistema de PdN, se recomendaría hacer un monitoreo regular del sitio, para ver cómo se están viendo afectadas las tortugas del área por el impacto de las lanchas, la contaminación, la pesca y el dragado del canal, entre otros factores. La especie está protegida a nivel nacional e internacional, por lo que se requiere un mejor conocimiento de las amenazas que enfrenta a nivel local y qué impactos tienen las presiones sobre esta población.

2) Los resultados de este estudio se verían enriquecidos no solo por un mayor número de muestras, sino por estudios adicionales como la telemetría satelital, para conocer las rutas y temporadas de migración de la especie, sus movimientos dentro del sitio de alimentación y por lo tanto las épocas y áreas donde sería más necesario implementar medidas de protección. También sus salidas y la frecuencia de las mismas y la ruta exacta que toman para migrar a sus sitios de anidación. Adicionalmente se recomienda aumentar la intensidad y frecuencia de muestreo a no menos de un año no solo para tener más muestras para el estudio genético sino para poder observar y aproximar cuánto tiempo permanecen los individuos en el área y cómo fluctúa estacionalmente la población. Esto debería complementarse con un estudio de las corrientes oceánicas del PO que pueda correlacionar los datos genéticos y satelitales para definir si las corrientes están ayudando de alguna manera a la dispersión de los individuos.

3) Dado que la Poza como ecosistema se ha estudiado muy poco, se recomienda hacer una caracterización del área que incluya la fluctuaciones en la profundidad, temperatura y corrientes de la zona a lo largo del año, un catálogo de especies animales y vegetales subacuáticas. Haciendo esto, y tomando parte de la muestra de tejido de las tortugas para estudios de isótopos estables, se podrá conocer mucho mejor la red trófica de este ecosistema

- 4) Por tratarse de una especie migratoria, conociendo los sitios de proveniencia de las tortugas, se necesita implementar estrategias locales y regionales de conservación, en especial en coordinación con México y Ecuador a fin de crear corredores marinos protegidos para disminuir las numerosas amenazas que enfrentan los individuos durante sus rutas migratorias, especialmente aquellas relacionadas con el impacto de la pesca. Es muy importante que las autoridades guatemaltecas también verifiquen que los barcos camaroneros estén cumpliendo con el uso correcto de los DET.
- 5) Las tortugas marinas son especies clave en muchos ecosistemas marinos y particularmente las tortugas verdes, como la única especie predominantemente herbívora, tienen un rol importante en el mantenimiento de la salud en los fondos marinos. Por tratarse de especies carismáticas se les podría utilizar como bandera para concientizar al público sobre las características y la importancia de la conservación de los ecosistemas marinos y costeros de Guatemala.

VII. LITERATURA CITADA

1. Abreu-Grobois, Alberto; J. A. Horrocks; A. Formia; P. H. Dutton; R. LeRoux; X. Velez-Zuazo; L. Soares y P. Meylan. 2006. *New mtDNA D-loop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution of mixed stock analysis*. Pp. 179 in M. Frick, A. Panagopoulous, A. F. Rees, K. Williams, eds. Proceedings of the 26th annual symposium on sea turtle biology, Book of Abstracts. ISTS, Isla de Creta, Grecia.
2. ACCSTR. 2008. Archie Carr center for sea turtle research. *Marine turtle DNA sequence patterns*. University of Florida. Disponible en <<http://accstr.ufl.edu/resources/mtdna-sequences/>> (con acceso el 16 de marzo de 2015).
3. Aguirre, Alonso y P. L. Lutz. 2004. *Marine Turtles as Sentinels of ecosystem Health: Is Fibropapillomatosis an Indicator?* EcoHealth 1, 275–283.
4. Amorocho, Diego F. y R. D. Reina. 2007. *Feeding ecology of the East Pacific Green sea turtle Chelonia mydas agassizii at Gorgona National Park, Colombia*. Endang. Species Res. 3: 43-51.
5. Amorocho, Diego F.; A. Abreu-Grobols; P. Dutton y R. Reina. 2012. *Multiple Distant Origins for Green Sea Turtles Aggregating off Gorgona Island in the Colombian Eastern Pacific*. PLoS ONE, 7(12): 1-12.
6. Anderson, J.; D. Shaver y W. Karel. 2013. *Genetic Diversity and Natal Origins of Green Turtles (Chelonia mydas) in the Western Gulf of Mexico*. Journal of Herpetology, 47(2): 251-257.
7. Anleu-Grobois, Alberto. 2015. Entrevistas vía Skype Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Autónoma de México, campus Mazatlán, México. Email: alberto.abreu@ola.icmyl.unam.mx
8. Avise, John C. y Bowen B. 1994. *Investigating sea turtle migration using DNA markers*. Current Opinion in Genetics and Development 4:882-886.

9. Bandelt H, Forster P, Röhl A (1999). *Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies*. Mol Biol Evol 16(1):37–48.
10. Benso, Dennis; E. Karsh-Mizrachi, D. Lipman, J. Ostell y D. Wheeler. 2005. *GenBank*. Nucleic Acids Res, 33(Database issue): D34-D38.
11. Blanco, Gabriela S.; S. Morreale; H. Bailey; J. Seminoff; F. Paladino y J. R. Spotila. 2012. *Post-nesting movements and feeding grounds of a resident East Pacific green turtle *Chelonia mydas* population from Costa Rica*. Endang Species Res 18: 233-245.
12. Bowen, B. W. y Karl, S. A. (2007), *Population genetics and phylogeography of sea turtles*. Molecular Ecology, 16: 4886–4907. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03542.x
13. Bowen, B.W., A.L. Bass, L. Soares & R.J. Toonen. 2005. *Conservation implications of complex population structure: Lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*)*. Molecular Ecology 14(8): 2389-2402.
14. Bowen, Brian W.; a. Bass; A. García-Rodríguez; C. Diez; R. van Dam; A. Bolten; K. Bjorndal; M. Miyamoto y R. Ferl. 1996. *Origin of Hawksbill turtles in a Caribbean feeding area as indicated by genetic markers*. Ecological Applications 6(2): 566-572.
15. Bowen, Brian W.; A. Meylan; P.; J. Ross; C.; C. Limpus; G. Balazs y J. Avise. 1992. *Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny*. Evolution, 46(4): 865-881.
16. Carr, Archie F. 1975. *The Ascension Island green turtle nesting colony*. Copeia, 1975, 547–555.
17. Chassin-Noria, Omar. 2015. Entrevistas Vía Skype. Universidad Michoacana San Miguel Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. Email: ochassin@umich.mx.
18. Chassin-Noria, Omar; A. Abreu-Grobois, P. Dutton y K. Oyama. 2004. *Conservation genetics of the east Pacific Green turtle (*Chelonia mydas*) in Michoacan, Mexico*. Genetica 121: 195-206.
19. CITES. 2013. *Apéndices I, II y III*. Con acceso el 13 de diciembre de 2014 en <http://www.cites.org/esp/app/appendices.php>

20. Clement Mark; D. Posada y K. Crandall. 2000. *TCS: a computer program to estimate gene genealogies*. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660
21. CONABIO. 2012. *Fichas de especies prioritarias. Tortuga Verde o Blanca (Chelonia mydas)*. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F.
22. CONAP, ONCA, FONACON. 2002. *Plan Maestro 2002-2006 Parque Nacional Sipacate-Naranjo*. Guatemala. 122 pp.
23. CONAP. 2009. *Lista de Especies Amenazadas de Guatemala –LEA- y listado de Especies de Flora y Fauna Silvestres CITES de Guatemala*. Documento técnico 67 (02-2009). 122 pp.
24. CONAP. 2010. *Elaboración de los Calendarios Cinegéticos Regionales 2010. Informe Final de Consultoría*. Guatemala: PROBIOMA 60 pp. Con acceso el 16 de abril de 2015 <<http://es.scribd.com/doc/51086183/Calendarios-Cinegeticos-Regionales-Guatemala-2010-2011#scribd>>
25. Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas. CIT 2008. *Manual sobre técnicas de manejo y conservación de las tortugas marinas en playas de anidación de Centroamérica*. San José, Costa Rica. 53 pp.
26. Crite, J. 2000. *Chelonia mydas* (On-line). Animal Diversity Web. Con acceso el 5 de enero de 2015 en <http://animaldiversity.org/accounts/Chelonia_mydas/>.
27. Eckert, K. L., Bjørndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A. and Donnelly, M. (Eds.) 2000 (Traducción al español). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4. Washington, DC: 235 p
28. Excoffier, L. 2009. *Arlequin ver 3.5.1.3*. CMPG, Universidad de Berna, Suiza. <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>>
29. FitzSimmons, Nancy. 1997. *Male Marine Turtles: Gene Flow, Philopatry and Mating Systems of the Green Turtle Chelonia mydas*. Tesis Doctoral. Universidad de Queensland, Australia. 241 pp

30. Goodall-Copestake, W. P., Tarling, G. A., & Murphy, E. J. (2012). *On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals*. *Heredity*, 109(1), 50–56. <http://doi.org/10.1038/hdy.2012.12>
31. Green, Derek. 1984. *Long-Distance Movements of Galapagos Green Turtles*. *Journal of Herpetology* 18(2): 121-130.
32. Hamann, M., Godfrey, M.H., Seminoff, J.A., Arthur, K., Barata, P.C.R., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Broderick, A.C., Campbell, L.M., Carreras, C., Casale, P., Chaloupka, M., Chan, S.K.F, Coyne, M.S., Crowder, L.B., Diez, C.E., Dutton, P.H., Epperly, S.P., FitzSimmons, N.N., Formia, A., Girondot, M., Hays, G.C., Cheng, I.J., Kaska, Y., Lewison, R., Mortimer, J.A., Nichols, W.J., Reina, R.D., Shanker, K., Spotila, J.R., Tomás, J., Wallace, B.P., Work, T.M., Zbinden, J., and Godley, B.J. 2010. *Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century*. *Endangered Species Research*, 11 (3). pp. 245-269.
33. Hart Catherine; G. Blanco; M. Coyne; C. Delgado Trejo; B. J. Godley; T. T. Jones; A. Resendiz; J. Seminoff; M. J. Witt y W. J. Nichols. 2015. *Multinational Tagging Efforts Illustrate Regional Scale of Distribution and Threats for East Pacific Green Turtles (*Chelonia mydas agassizii*)*. *PLoS ONE* 10(2): e0116225. doi:10.1371/journal.pone.0116225
34. Heidemeyer, Maike. 2015. Entrevistas vías Skype, presencialmente y correo electrónico. Email: maike@pretoma.org
35. Heidemeyer, Maike. 2015. *Orígenes natales y migratorios de la agregación de Tortuga negra (*Chelonia mydas agassizii*) en el hábitat de alimentación de la Isla del Coco basado en análisis de ADN, bioquímicos y tecnología satelital*. Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica. 141 pp.
36. Herbst, Lawrence H. y E. R. Jacobson. Fecha desconocida. *Recommendations for Activities Involving Brief Captivity with Non-Invasive or Minimally Invasive Procedures*. ACCSTR, Universidad de Florida. Con acceso el 7 de abril de 2015 en

<http://accstr.ufl.edu/resources/tagging-program-cmttp/recommendations-for-activities-involving-brief-captivity-with-non-invasive-or-minimally-invasive-procedures/>

37. Holroyd, Geoffrey L. y H. E. Trefry. 2010. *The Importance of Isla Clarión, Archipelago Revillagigedo, Mexico, for Green Turtle (Chelonia mydas) Nesting*. Chelonian Conservation and Biology: December 2010, Vol. 9, No. 2, pp. 305-309
38. Karl, Stephen y B. Bowen. 1999. *Evolutionary Significant Units versus Geopolitical Taxonomy: Molecular Systematics of an Endangered Sea Turtle (genus Chelonia)*. Conservation Biology 13(5): 990-999.
39. Koch, Volker; L. Brooks y W. Nichols. 2007. *Population ecology of the green/black turtle (Chelonia mydas) in Bahía Magdalena, Mexico*. Mar Bio 153: 35-46.
40. Lahanas, P. N.; K. Bjorndal; A. Bolten; S. Encalada; M. Miyamoto; R. Valverde y B. Bowen. 1998. *Genetic composition of a Green turtle (Chelonia mydas) feeding ground population: evidence for multiple origins*. Marine Biology 130: 345-352.
41. Márquez, René. 1990. *Species Catalogue: sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date*. FAO Fisheries Synopsis, No. 125, Vol. 11. Roma, Italia. 81 pp.
42. Márquez, René. 1996. *Las tortugas marinas y nuestro tiempo*. 1ª edición. Fondo de Cultura Económica, México. 197 pp.
43. National Marine Fisheries Service Southeast Fisheries Science Center (NMFS-SEFSC). 2008. *Sea Turtle Research Techniques Manual*. NOAA Technical Memorandum, NMFS-SEFSC-579, 92pp.
44. Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press: New York.
45. Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, New York.

46. Nei, M., & Li, W. H. (1979). *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–5273.
47. NOAA Fisheries. 2014. *Green Turtle (Chelonia mydas)*. US Department of Commerce, EEUU. Con acceso el 8 de octubre de 2014 en <http://www.nmfs.noaa.gov/pr/species/turtles/green.htm>
48. NOAA Fisheries. Fecha desconocida. *Turtle DNA Sequence List*. US Department of Commerce, EEUU. Con acceso el 16 de abril de 2015 en <https://swfsc.noaa.gov/textblock.aspx?Division=PRD&ParentMenuId=212&id=1332>
49. Parham, James y G. R. Zug. 1996. *Chelonia agassizii* – Valid Or Not? *Marine Turtle Newsletter* 72: 2-5.
50. Pritchard P. 1976. *Post-nesting movements of marine turtles (Cheloniidae and Dermochelyidae) tagged in the Guianas*. *Copeia*, 1976, 749–754.
51. Raygadas, Bertha. 2008. *Estado de conservación de la población de tortuga negra (Chelonia agassizii) en Michoacán*. Tesis para obtener el Título Profesional de Biólogo. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. 74pp.
52. Raymundo, Isabel. 2010. *Caracterización de las tortugas prietas (Chelonia mydas) del complejo lagunar Chacahua-Pastoría*. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología Marina. Universidad del Mar, Campus Puerto Angel, Oaxaca, México. 57 pp.
53. Rhodin, Anders; P. van Dijk; J. Iverson y H. Shaffer. 2010. *Turtles of the World, 2010 Update: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution and Conservation Status*. Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Specialist Group. Chelonian Research Monographs no. 5.

54. Sánchez Castañeda, Regina; M. R. Jolón Morales, González, Lorenzana, C.; Villagrán Colón, J. C.; Boix Morán J. L.; Dieseldorff Monzón, H. 2002. *Estrategia Nacional de Manejo y Conservación de Tortugas Marinas*. Guatemala: CONAP / FONACON / CBM / EPQ / UNIPESCA. 112pp.
55. Seminoff, Jeffrey A. (Southwest Fisheries Science Center, U.S.) 2004. *Chelonia mydas*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Con acceso el 30 de agosto de 2014.
56. Seminoff, Jeffrey A. 2000. *Biology of the East Pacific Green Turtle Chelonia mydas agassizii, at a warm temperate feeding area in the Gulf of California, Mexico*. Tesis de Doctorado (PhD) especializado en Wildlife and Fisheries Science. Universidad de Arizona, EEUU. 252pp.
57. Spotila, James R. 2004. *Sea Turtles: a complete guide to their Biology, Behavior and Conservation*. Johns Hopkins University Press. 227pp.
58. Stephens, Sarah H.; V. C. White y J. R. Alvarado. 2010. *Assessment of Genetic Tissue Sampling Methods for the Critically Endangered Kemp's Ridley Sea Turtle (Lepidochelys kempii)*. Marine Turtle Newsletter 128; 19-23.
59. Swofford, David L. 2003. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
60. Tamura, K. & M. Nei. 1993. *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*. Molecular Biology Evolution, 10:512–526
61. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A. y Kumar, S. 2013. *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
62. Trejo, C; Díaz, J. 2008. *Biología reproductiva y estado actual de la población de tortuga negra en Michoacán*. (en línea). México. Con acceso el 13 septiembre de 2014.
Disponible en [http:// <http://www.conanp.gob.mx/pdf_especies/tortuga_verde.pdf>](http://www.conanp.gob.mx/pdf_especies/tortuga_verde.pdf)

63. Urbiola-Rangel, Ericka y O. Chassin-Noria. 2011. *Relaciones filogenéticas del género Chelonia*. *Biológicas*, 13(2): 41-47.
64. Wallace B. P.; DiMatteo AD; Hurley BJ, Finkbeiner EM, Bolten AB, Chaloupka, MY, Hutchinson BJ, Abreu-Grobois FA, Amorochó D, Bjørndal KA, Bourjea J, Bowen BW, Briseño Dueñas R, Casale P, Choudhury BC, Costa A, Dutton PH, Fallabrino A, Girard A, Girondot M, Godfrey MH, Hamann M, López-Mendilaharsu M, Marcovaldi MA, Mortimer JA, Musick JA, Nel R, Pilcher NJ, Seminoff JA, Troëng S, Witherington B, Mast RB. 2010. *Regional Management Units for Marine Turtles: A Novel Framework for Prioritizing Conservation and Research across Multiple Scales*. *PLoS ONE*5(12): e15465. doi:10.1371/journal.pone.0015465.
65. Wildlife Conservation Society (WCS). Fecha desconocida. The Turtle Trade. <<http://www.wcs.org/conservation-challenges/natural-resource-use/hunting-and-wildlife-trade/the-turtle-trade.aspx>> Con acceso el 3 de marzo de 2015.
66. Wilson, E.G.; K. L. Miller; D. Allison y M. Magliocca. 2010. *Why Healthy Oceans Need Sea Turtles: The importance of sea turtles to marine ecosystems*. Oceana, 20 pp. Publicación en línea consultada el 30 de agosto de 2014 en: <http://oceana.org/sites/default/files/reports/Why_Healthy_Oceans_Need_Sea_Turtles.pdf>
67. Wyneken, Jeanette. 2001. *The Anatomy of Sea Turtles*. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 172 pp.
68. Wyneken, Jeanette; K. Lohmann y J. A. Musick. 2013. *The Biology of Sea Turtles*, Volume III. CRC Press, Taylor and Francis Group, EEUU. CRC Marine Biology Series. 467 pp.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Categorías para toma de datos de captura (Protortugas)

Fecha de captura _____

# de microchip	# de placas	Sexo (H/M)	No. de captura	No. de lance	Largo curvo (cm)	Ancho curvo (cm)	Muesca a muesca (cm)	Muesca a punta (cm)	Punta a punta (cm)	Largo plastron (cm)	Largo cola (cm)	Cloaca a cola (cm)	Altura (cm)	Peso (lbs)	Observaciones
-----------------------	--------------------	-------------------	-----------------------	---------------------	-------------------------	-------------------------	-----------------------------	----------------------------	---------------------------	----------------------------	------------------------	---------------------------	--------------------	-------------------	----------------------

Anexo 2. Toma de datos para muestras de tejido

Fecha _____

# de microchip	# de placa	Código de muestra

Anexo 3. Lista de acrónimos

ACCSTR	Archie Carr Center for Sea Turtle Research (Centro Archie Carr para Investigación de Tortuga Marina)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
AP	Área Protegida
CECON	Centro de Estudios Conservacionistas
CIBCM	Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la UCR

CITES	Convenio Internacional sobre el Comercio de Especies
CONAP	Comisión Nacional de Áreas Protegidas
CMTTP	Cooperative Marine Turtle Tagging Program (Programa Cooperativo de Marcaje de Tortugas Marinas)
DET	Dispositivo Excluidor de Tortugas
FFS	French Frigate Shoals
FONACON	Fondo Nacional para la Conservación
ICMYL	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM
IUCN	International Union for the Conservation of Nature (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza)
LEA	Listado de Especies Amenazadas
MSA	Mixed Stock Analysis (Análisis de Stocks Mezclados)
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration (Administración Nacional Oceánica y Atmosférica de EEUU)
ONCA	Organización Nacional para la Conservación y el Ambiente
PdN	Poza del Nance
PIT	Passive Integrated Transmitter (Transmisores Pasivos Integrados)
PNSN	Parque Nacional Sipacate-Naranjo
PO	Pacífico Oriental
PRETOMA	Programa Restauración de Tortugas Marinas
RVS	Refugio de Vida Silvestre
SIGAP	Sistema Guatemalteco de Áreas Protegidas
UCR	Universidad de Costa Rica
UM	Unidad de Manejo
UMICH	Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
UNAM	Universidad Autónoma de México
USAC	Universidad de San Carlos de Guatemala
UVG	Universidad del Valle de Guatemala

Anexo 4. Autorización del CEUCA-UVG para la investigación



Comité de Ética, Uso y Cuidado animal de la Universidad del Valle de Guatemala

CEUCA - UVG

Facultad de Ciencias y Humanidades-Departamento de Biología

Investigador Principal: María Chavarría Martínez
E-Mail: mariacm29@yahoo.es
Teléfono: 53058541, 24347530 - Propuesta: I- 2015 – 2

Guatemala, 13 de abril de 2015.


Estimada María Chavarría Martínez:

Por este medio se hace constar que la propuesta del proyecto de investigación titulado: "**Determinación de la región de origen de las tortugas negras (*Chelonia mydas agassizii*) en el sitio de forrajeo Poza del Nance (Parque Nacional Sipacate-Naranjo, La Gomera, Escuintla, Guatemala) utilizando análisis de ADN mitocondrial**" ha sido revisado por miembros del comité de Ética, Uso y Cuidado Animal de la Universidad Del Valle de Guatemala (CEUCA – UVG).

Los evaluadores han hecho sus sugerencias de ampliación y/o modificación con el fin de asegurar el trato ético a los animales que serán muestreados para cumplir con los propósitos de la investigación. Dichas modificaciones han sido realizadas y posteriormente revisadas por el comité. Se ha determinado que las mismas cumplen con los requisitos, así como también se ha cumplido con los procedimientos y lineamientos del CEUCA - UVG.

Por este medio se le informa que está autorizado para llevar a la práctica el proyecto titulado: "**Determinación de la región de origen de las tortugas negras (*Chelonia mydas agassizii*) en el sitio de forrajeo Poza del Nance (Parque Nacional Sipacate-Naranjo, La Gomera, Escuintla, Guatemala) utilizando análisis de ADN mitocondrial**" por un año a partir de la fecha de la presente carta de autorización del comité. Se solicita que si hubiese necesidad de hacer modificaciones posteriores, se comunique de nuevo con nosotros para que dichas enmiendas sean evaluadas de manera que se pueda garantizar que se cumple a cabalidad con los lineamientos del CEUCA - UVG.

Sin otro particular quedo a sus órdenes,


MV Vanessa Granados B

Médico Veterinario

Colegiado 997

CEUCA - UVG


Comité de Ética, Uso y Cuidado Animal

Universidad del Valle de Guatemala.



Anexo 5. Licencia de Investigación emitida por el CONAP.

Forma LI


CONSEJO NACIONAL DE AREAS PROTEGIDAS
CONAP
PRESIDENCIA DE LA REPUBLICA
GUATEMALA, C. A. **Nº 00245 -B**

LICENCIA DE INVESTIGACION

No. 042/2015

Nombre: María Eugenia Chavarria Martínez No. Reg. 1-014-2013
Nacionalidad: Guatemalteca Identificación: DPI: 2582 33125 0101
Institución: Universidad del Valle de Guatemala
Si existe contrato administrativo que ampara esta Licencia, especificar referencia: _____

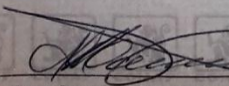
Título de la Investigación: *Determinación de la región de origen de las tortugas negras (Chelonia mydasagassizii) en el sitio de forrajeo Poza del Nance (Parque Nacional) Sipacate Naranjo, La Gomera, Escuintla*


Institución nacional que avala la investigación: Universidad del Valle de Guatemala

Nombre e identificación de otros investigadores participantes:

1. _____
2. _____
3. DR. Carlos Alfaro, MV DPI 2299 86773 1301
4. Jaime Pérez DPI 3502 97304 0101
5. _____

Fecha de Emisión: Guatemala, 08 de Junio del 2,015
Fecha de Vencimiento: Guatemala, 08 de Junio del 2,016


Firma Secretario Ejecutivo o Delegado de CONAP



Firma de Recibido

Anexo 6. Licencia de colecta o aprovechamiento de vida silvestre emitida por el CONAP.

Forma LCA

**CONSEJO NACIONAL DE AREAS PROTEGIDAS (CONAP)
GUATEMALA, C.A.**

Serie A N° 002904

LICENCIA DE COLECTA O APROVECHAMIENTO DE VIDA SILVESTRE

1. Nombre o razón social: María Eugenia Chavarria Martínez
Dirección: 7 calle 35-84 Zona 11
Teléfono: _____ Identificación: DPI: 2542 39803 0101

2. Tipo de colecta: comercial _____ científica XXX aficionada _____

3. No. de registro: _____

4. Especies a coleccionar:

ESPECIES	CANTIDAD	FORMA
Chelonia mydas agassizii	100	muestra de tejido
.....U.L.....		

5. Ubicación de la colecta o aprovechamiento: Poza del Nance, Parque Nacional Sipacate Narajón
la Gomera, Escuintla

6. Número de registro de la propiedad: _____

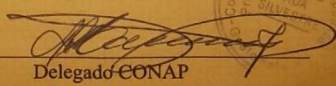
7. Técnicas de colecta autorizadas: _____
Se tirara con una pinza de la piel de la aleta posterior derecha, bisturi
(una hoja nueva por animal) se cortará 1cm2 de tejido y se almacenará en un vial con buffer SED

8. Nombre de colector(es) autorizado(s) e identificación: _____
Dr. Carlos Alfaro DPI 2299 86773 1301
Jaime Pérez DPI: 3502 97304 0101

9. Localidad de traspaso de material coleccionado: _____
Universidad del Valle de Guatemala, 18 avenida 11-95 Zona 15 Vista Hermosa III

Lugar y fecha de emisión: Guatemala, 08 de Junio del 2,015

Válido hasta: Guatemala, 08 de Junio del 2,016

(f) 
Delegado CONAP

