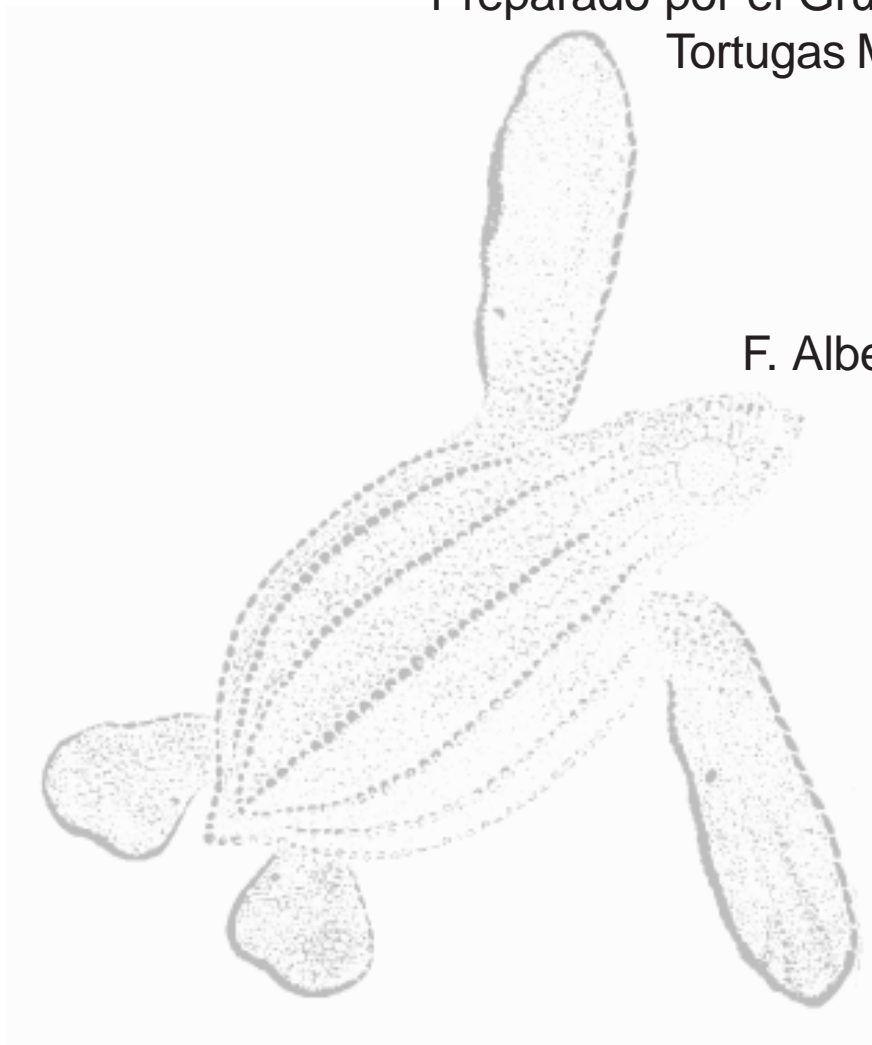


Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas

Preparado por el Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE

Editado por
Karen L. Eckert
Karen A. Bjorndal
F. Alberto Abreu-Grobois
M. Donnelly

Traducido al español por
Raquel Briseño-Dueñas
F. Alberto Abreu-Grobois
con la colaboración de
Laura Sarti Martínez
Ana Barragán Rocha
Juan Carlos Cantú
Ma. del Carmen Jiménez
Jaime Peña



WWF



CMS



SSC



NOAA



MTSG



CMC

El desarrollo y publicación de *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas* fué posible gracias al apoyo generoso de Center for Marine Conservation, Convention on Migratory Species, U.S. National Marine Fisheries Service y el Worldwide Fund for Nature.

©2000 SSC/IUCN Marine Turtle Specialist Group

La reproducción de esta publicación para fines educativos u otros propósitos no comerciales está autorizado sin permiso por el titular del derecho de autor, mientras que la fuente sea citada y que el titular reciba una copia del material reproducido.

La reproducción para fines comerciales está prohibida sin previa autorización del titular del derecho de autor.

ISBN (pendiente)

Impreso por Consolidated Graphic Communications, Blanchard, Pennsylvania USA

Material artístico para la cubierta, por Tom McFarland- Cría de tortuga laúd, *Dermochelys coriacea*

La cita correcta para esta publicación es la siguiente: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Editores). 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.

Para adquirir copias de esta publicación, por favor solicitarlas a:

Marydele Donnelly, MTSG Program Officer
IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group
1725 De Sales Street NW #600
Washington, DC 20036 USA
Tel: +1 (202) 857-1684
Fax: +1 (202) 872-0619
email: mdonnelly@dccmc.org

Presentación

En 1995 el Grupo Especialista en Tortugas Marinas (MTSG por sus siglas en inglés) publicó una *Estrategia Mundial para la Conservación de Tortugas Marinas*. En ella, se definen lineamientos sobre los cuales se deben encauzar los esfuerzos para recuperar y conservar a poblaciones de tortugas marinas reducidas drásticamente o en proceso de declinación, en todo el ámbito de su distribución global. Como elementos singulares en la estructura funcional de ecosistemas complejos, las tortugas marinas sostienen una relación importante con hábitats costeros y oceánicos. Por ejemplo, contribuyen a la salud y el mantenimiento de los arrecifes coralinos, praderas de pastos marinos, estuarios y playas arenosas. La *Estrategia* respalda programas integrales orientados a prevenir la extinción de las especies y promueve la recuperación y el sostenimiento de poblaciones saludables de tortugas marinas que realizan eficientemente sus funciones ecológicas.

Las tortugas marinas y los humanos han estado vinculados desde los tiempos en que el hombre se estableció en las costas e inició sus recorridos por los océanos. Por innumerables generaciones, las comunidades costeras han dependido de las tortugas marinas y sus huevos para la obtención de proteínas y otros productos. En muchas regiones, esta práctica aún continúa. Sin embargo, durante el transcurso del siglo XX, el incremento en la comercialización intensiva de los productos de tortuga marina ha diezmando muchas poblaciones. Debido al complejo ciclo de vida de las tortugas marinas -en este proceso los individuos migran entre varios hábitats que pueden incluir la travesía de toda una cuenca oceánica- para su conservación, se requiere de una planeación del manejo con un enfoque de cooperación internacional, que reconozca la interconexión entre hábitats, de poblaciones de tortugas marinas y de poblaciones humanas, en tanto que se aplique el mejor conocimiento científico disponible.

A la fecha, nuestro éxito para llevar a cabo cualquiera de ambas tareas ha sido mínimo. Las especies de tortugas marinas están catalogadas como “En peligro crítico”, “En peligro” o “Vulnerable” por la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN). La mayoría de las poblaciones han disminuido inexorablemente como secuela de las prácticas de extracción no sustentables para el aprovechamiento de su carne, concha, aceite, pieles y huevos. Decenas de miles

de tortugas mueren cada año al ser capturadas accidentalmente en artes de pesca activas o abandonadas. Asimismo, muchas áreas de anidación y alimentación han quedado inhabilitadas o presentan un franco deterioro, por los derrames de petróleo, acumulación de desechos químicos, plásticos no-degradables y otros desechos antropogénicos; aunado a los desarrollos costeros de alto impacto y, al incremento del turismo y la diversificación de estas actividades tanto en la zona costera como en la oceánica.

Para reforzar la supervivencia de las tortugas marinas, es indispensable que en todos los países localizados en las áreas de distribución de estas especies, el personal que realice los trabajos de conservación en el campo, recurra a lineamientos estandarizados y a criterios apropiados. Las técnicas de conservación y manejo estandarizadas promueven la recopilación de datos comparables y hacen posible el compartir los resultados entre los países y regiones.

En tanto que este manual tiene el propósito de cubrir la necesidad de lineamientos y criterios normalizados, reconoce a la vez, que un sector creciente de interesados en el trabajo de campo y tomadores de decisiones requieren orientación sobre las siguientes interrogantes: ¿cuándo y por qué seleccionar una opción de manejo entre las disponibles? y ¿cómo instrumentar efectivamente la opción seleccionada y evaluar los logros obtenidos?

El Grupo Especialista en Tortugas Marinas de la UICN considera que un manejo apropiado no puede realizarse sin el soporte de una investigación de alta calidad enfocada, en la medida de lo posible, hacia temáticas críticas para la conservación. Nuestra intención es que este manual sea de provecho a los interesados en la protección y manejo de las tortugas marinas de todo el mundo. Reconociendo que los programas con mayores logros, combinan las técnicas de censo tradicionales con el manejo de bases de datos electrónicas y el análisis genético con telemetría satelital; tecnologías que apenas podrían ser vislumbradas por los conservacionistas de la generación anterior, dedicamos este manual a los conductores del manejo y conservación de los recursos naturales del siglo XXI, quienes enfrentarán los cada vez más complejos retos de una administración apropiada. Esperamos que encuentren en este manual un entrenamiento y asesoría útiles.

Karen L. Eckert
Karen A. Bjorndal
F. Alberto Abreu Grobois
Marydele Donnelly
Editores

Agradecimientos

Congruente con el espíritu y estructura del Grupo Especialista en Tortugas Marinas de la Unión Mundial para la Naturaleza (MTSG/IUCN, por sus siglas en inglés), este manual es el resultado de los esfuerzos de colaboración de científicos y tomadores de decisiones situados alrededor del mundo. Los Editores estamos profundamente agradecidos por el apoyo y estímulo brindado por nuestros colegas así como por su buena disposición en compartir datos, experiencias y sabiduría. Tenemos una especial deuda con los autores y coautores - más de 60- que hicieron posible este manual, y con todos aquellos especialistas que participaron en el proceso de revisión crítica.

Las siguientes personas, con su revisión experta, contribuyeron sustancialmente a la obtención de la calidad final del manual: Ana Barragán (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México); Anna Bass (University of Florida, USA); Miriam Benabib (Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México); Alan Bolten (University of Florida, USA); Annette Broderick (University of Wales Swansea, UK); Deborah Crouse (Fish and Wildlife Service, USA); Andreas Demetropoulos (Ministry of Agriculture and Natural Resources, Cyprus); Peter Dutton (National Marine Fisheries Service, USA); Scott Eckert (Hubbs-Sea World Research Institute, USA); Nat Frazer (University of Florida, USA); Jack Frazier (CINVESTAV, México); Marc Girondot (Université Paris 7-Denis Diderot, France); Brendan Godley (University of Wales Swansea, U.K.); Hedelvy Guada (WIDECAS, Venezuela); Julia Horrocks (University of the West Indies, Barbados); George Hughes (KwaZulu-Natal Nature Conservation Service, South Africa); Naoki Kamezaki (Sea Turtle Association of Japan); Rhema Kerr (Hope Zoological Gardens, Jamaica); Jeffrey Miller (Queensland Department of Environment and Heritage, Australia); Jeanne Mortimer (Conservation and National Parks, Republic of the Seychelles); Wallace J. Nichols (University of Arizona, USA); Joel Palma (World Wildlife

Fund-Philippines); Claude Pieau (Institut Jacques Monod, Paris, France); Henk Reichart (STINASU, Suriname); Rodney Salm (IUCN, Eastern Africa Regional Office); Laura Sarti M. (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México); Barbara Schroeder (National Marine Fisheries Service, USA); Jeffrey Sybesma (Faculty of Law, University of the Netherlands Antilles); Robert van Dam (Institute for Systematics and Population Biology, The Netherlands); Alessandra Vanzella-Khoury (United Nations Environment Programme, Jamaica); and Jeanette Wyneken (Florida Atlantic University, USA).

También, hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento a Tom McFarland («Tom's Turtles») por su contribución artística. Su esmero por la precisión garantiza a los lectores de este manual un acceso a ilustraciones claras y exactas. Sus preciosos dibujos mejoran también la perspectiva de supervivencia de las tortugas marinas de una manera real, ya que una acción efectiva de conservación depende de datos verídicos, incluyendo una correcta identificación de las especies.

El manual no podría haberse realizado sin el apoyo financiero del Centro para la Conservación Marina (CMC), la Convención para Especies Migratorias (CMS), el Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF), el Servicio Nacional de Pesquerías Marinas de EUA (NMFS) y la Unidad de Investigación Cooperativa de Pesquería y Vida Silvestre de Florida (USGS, Department of the Interior, Research Work Order 172).

Deborah White Smith diseñó el estilo del manual y transformó docenas de capítulos individuales a un formato coherente. La traducción al español estuvo a cargo de Raquel Briseño Dueñas y F. Alberto Abreu-Grobois, con la participación de Ana Barragán, Juan Carlos Cantú, María del Carmen Jiménez Quiroz, Jaime Peña y Laura Sarti.

En suma, el proyecto resultó beneficiado con los talentos de más de 100 personas de todo el mundo.

¡A todos, nuestro más sincero agradecimiento!

Karen L. Eckert
Karen A. Bjorndal
F. Alberto Abreu Grobois
Marydele Donnelly
Editores

Tabla de Contenido

1. Generalidades

Introducción a la Evolución, Historias de Vida y Biología de las Tortugas Marinas	3
<i>A. B. Meylan y P. A. Meylan</i>	
Diseño de un Programa de Conservación	6
<i>K. L. Eckert</i>	
Prioridades para los Estudios sobre la Biología de la Reproducción y de la Anidación	9
<i>J. I. Richardson</i>	
Prioridades para la Investigación en Hábitats de Alimentación	13
<i>K. A. Bjorndal</i>	
Conservación Basada en la Comunidad	16
<i>J. G. Frazier</i>	

2. Taxonomía e Identificación de Especies

Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies	23
<i>P. C. H. Pritchard y J.A. Mortimer</i>	

3. Evaluación de Poblaciones y de Hábitats

Estudios de Hábitat	45
<i>C. E. Diez y J. A. Ottenwalder</i>	
Prospecciones Poblacionales (Terrestres y Aéreas) en Playas de Anidación	51
<i>B. Schroeder y S. Murphy</i>	
Estudios de Poblaciones en Playas de Arribadas	64
<i>R. A. Valverde y C. E. Gates</i>	
Estudios en Hábitats de Alimentación: Captura y Manejo de Tortugas	70
<i>L. M. Ehrhart y L. H. Ogren</i>	
Estudios Aéreos en Hábitats de Alimentación	75
<i>T. A. Henwood y S. P. Epperly</i>	
Estimación del Tamaño de la Población	78
<i>T. Gerrodette y B. L. Taylor</i>	
Identificación de Poblaciones	83
<i>N. FitzSimmons, C. Moritz y B. W. Bowen</i>	

4. Metodologías y Procedimientos para la Colecta de Datos

Definición del Inicio: La Importancia del Diseño Experimental	95
<i>J. D. Congdon y A. E. Dunham</i>	
Sistemas de Adquisición de Datos para el Seguimiento del Comportamiento y la Fisiología de las Tortugas Marinas	101
<i>S. A. Eckert</i>	
Bases de Datos	108
<i>R. Briseño-Dueñas y F. A. Abreu-Grobois</i>	
Factores a Considerar en el Mercado de Tortugas Marinas	116
<i>G. H. Balazs</i>	
Técnicas para la Medición de Tortugas Marinas	126
<i>A. B. Bolten</i>	
Periodicidad en la Anidación y el Comportamiento entre Anidaciones	132
<i>J. Alvarado y T. M. Murphy</i>	
Ciclos Reproductivos y Endocrinología	137
<i>D. Wm. Owens</i>	
Determinación del Tamaño de la Nidada y el Éxito de la Eclosión	143
<i>J. D. Miller</i>	
Determinación del Sexo en Crías	150
<i>H. Merchant Larios</i>	
Estimación de la Proporción Sexual en Playas de Anidación	156
<i>M. Godfrey y N. Mrosovsky</i>	
Determinación del Sexo de Tortugas Marinas en Hábitats de Alimentación	160
<i>T. Wibbels</i>	
Muestreo y Análisis de los Componentes de la Dieta	165
<i>G. A. Forbes</i>	
Medición del Crecimiento en Tortugas Marinas	171
<i>R. P. van Dam</i>	
Redes de Recuperación y Monitoreo de Tortugas Varadas	174
<i>D. J. Shaver and W. G. Teas</i>	
Entrevistas y Encuestas en Mercados	178
<i>C. Tambiah</i>	

5. Reducción de Amenazas

Reducción de las Amenazas a las Tortugas	187
<i>M. A. G. Marcovaldi y C. A. Thomé</i>	
Reducción de las Amenazas a los Huevos y las Crías: Protección <i>In Situ</i>	192
<i>R. H. Boulon, Jr.</i>	

Reducción de las Amenazas a los Huevos y a las Crías: Los Viveros	199
<i>J. A. Mortimer</i>	
Reducción de las Amenazas al Hábitat de Anidación	204
<i>B. E. Witherington</i>	
Reducción de las Amenazas a los Hábitats de Alimentación	211
<i>J. Gibson y G. Smith</i>	
Reducción de la Captura Incidental en Pesquerías	217
<i>C. A. Oravetz</i>	
6. Crianza, Cuidado Veterinario y Necropsia	
La Crianza y Reproducción en Cautiverio de Tortugas Marinas: Una Evaluación de su Uso como Estrategia de Conservación	225
<i>J. P. Ross</i>	
Rehabilitación de Tortugas Marinas	232
<i>M. Walsh</i>	
Enfermedades Infecciosas en Tortugas Marinas	239
<i>L. H. Herbst</i>	
Toma de Muestras de Tejidos y Técnicas para la Necropsia	246
<i>E. R. Jacobson</i>	
7. Legislación e Instrumentación	
Grupos de Interés de las Bases y Legislación Nacional	252
<i>H. A. Reichart</i>	
Colaboración Regional	256
<i>R. B. Trono y R. V. Salm</i>	
Tratados Internacionales de Conservación	260
<i>D. Hykle</i>	
Aspectos Forenses	265
<i>A. A. Colbert, C. M. Woodley, G. T. Seaborn, M. K. Moore and S. B. Galloway</i>	

Identificación de Poblaciones

Nancy FitzSimmons

Applied Ecology Research Group, University of Canberra, ACT 2601 Australia;

Tel: +61 (26) 201 2237; Fax: +61 (26) 201 5305; email: fitzsimmm@aerg.canberra.edu.au

Craig Moritz

Department of Zoology, University of Queensland, Brisbane, Queensland 4072 Australia;

Tel: +61 (73) 365-3382; Fax: +61 (73) 365-1655; email: cmoritz@zoology.uq.edu.au

Brian W. Bowen

Department of Fisheries and Aquatic Sciences, University of Florida, 7922 NW 71st Street,

Gainesville, Florida 32653-3071 USA; Tel: +1 (352) 392-9617 (x280); Fax: +1 (352) 846-1088;

email: bowen@icbr.ifas.ufl.edu

En las última décadas las técnicas usadas en los análisis genéticos han esclarecido varios aspectos de la historia de vida de la tortuga marina. Por ejemplo: ¿las tortugas hembras regresan a anidar en su playa natal? ¿Los machos mantienen una ruta para el flujo de genes entre las colonias anidadoras? ¿Contribuye más de un macho en la fertilización de una nidada? ¿Cuáles son las relaciones evolutivas entre las distintas especies de tortugas marinas? ¿Las “huellas” o “marcas moleculares” del ADN pueden usarse para seguir la pista de las migraciones de las tortugas marinas? Todas estas preguntas han sido respondidas por los estudios de la genética molecular en los últimos años (revisión de Bowen y Avise, 1995; Bowen y Karl, 1996).

Aunque todos los aspectos de historia natural son aplicables a la conservación, quizás las herramientas genéticas más poderosas para el manejo de las tortugas marinas son aquellas que pueden identificar poblaciones reproductoras particulares, encontradas en una o en el conjunto de playas de anidación y sus hábitats de alimentación correspondientes. La resolución de poblaciones (o “stocks”) en tortugas marinas se ve entorpecida por las extensas migraciones que efectúan la mayoría de las especies tanto en sus etapas juveniles como en la de adultos reproductores. Estas migraciones son el punto crítico que resalta la necesidad de identificar la distribución geográfica de los hábitats de alimentación que sostienen a una población reproductora específica y, recíprocamente, evaluar proporciones de diferentes poblaciones

reproductoras presentes en un área de alimentación o sitio de captura particular.

Este capítulo es una revisión del marco de trabajo para usar la información genética en la identificación de poblaciones reproductoras de tortugas marinas. Dos son los temas considerados fundamentales para nuestra discusión: (i) el uso apropiado de información genética requiere que las metas del estudio sean claras e inequívocas y que el diseño de muestreo y los marcadores moleculares empleados sean los apropiados; y (ii) los datos moleculares son muy informativos cuando se integran con estudios de campo, en particular con los estudios de marca-recaptura.

Este capítulo proporciona una descripción breve de los enfoques moleculares y proporciona los protocolos para la recolección de muestras (Apéndice 1), pero no aborda métodos genéticos particulares. Estos últimos se encuentran detallados en Hillis *et al.* (1996) y sus aplicaciones a las tortugas marinas son revisados en Bowen y Witzell (1996) y Bowen y Karl (1996). Para una discusión sobre la identificación de poblaciones reproductoras y las unidades evolutivas ver a Moritz *et al.* (1995). Para una descripción de los procesos genéticos de la población, vea a Hartl y Clark (1997).

Elección de Marcadores Moleculares

El ADN mitocondrial (ADNmt) ha demostrado ser particularmente efectivo para detectar la estructura poblacional en las tortugas marinas. El poder de

Tabla 1. Marcadores moleculares usados para la identificación de tortugas marinas

Marcador	Herencia	Variación Poblacional ¹ dentro/entre
Genoma Nuclear		
electroforesis de proteínas	biparental	baja/baja
copia sencilla anónima	biparental	baja/baja
microsatélites	biparental	alta/baja-moderada
Genoma Mitocondrial		
fragmentos de restricción	materna	baja/baja-alta
secuencias de región control	materna	baja-alta/moderada-alta

¹ Variación relativa dentro y entre agrupaciones regionales de colonias anidadoras

Nota: Para una revisión más completa, ver Bowen y Karl (1996), Bowen y Witzell (1996).

resolución del ADNmt se encuentra condicionado a la metodología empleada; varios estudios han descrito una discriminación incrementada de poblaciones por el uso de la región control. Ésta evoluciona más rápidamente que el genoma completo del que se analiza por fragmentos de restricción (RFLP). Por esta razón, la región control se reconoce como el segmento de ADNmt de elección para los estudios en playas de anidación. La conclusión general de estos estudios es que típicamente las tortugas hembras retornan a su región de origen para reproducirse (conducta “de buscadoras de su origen natal”, o filopatría) pero esas poblaciones reproductoras pueden abarcar varios hábitats conectados a las playas de anidación, distanciados entre sí hasta 100-400 km (Norman, 1996; Bowen y Avise, 1995).

La molécula del ADNmt se transmite por vía materna, significando con esto que las crías del sexo masculino heredan el ADNmt de su madre pero no lo transfieren a las generaciones subsecuentes. En muchas circunstancias, los marcadores heredados por las hembras ofrecen una ventaja distinta porque proporcionan las perspectivas sobre las conductas reproductoras de las hembras que son de importancia suprema para la supervivencia de la especie (Bowen y Avise, 1995). Por otro lado, el ADNmt no produce el escenario completo, y puede puntualizar una interpretación engañosa de aislamiento entre las poblaciones si hay alguna forma de flujo genético a través de los machos, como es el caso probable para las tortugas verdes (Karl *et al.*, 1992; FitzSimmons *et al.*, 1997a,b). Por esta razón, los estudios de la variación de ADN nuclear son muy deseables para complementar los análisis del ADNmt y para proporcionar una explicación más completa de la estructura genética de la población.

Los estudios de poblaciones de ADN nuclear típicamente usan segmentos del genoma que no codifican para productos de proteínas específicas. Estas regiones no-codificadoras acumulan las mutaciones más rápidamente que las regiones que codifican para la producción de proteína, y por eso proporcionan una gran sensibilidad (Tabla 1). Los segmentos de ADN nuclear que son apropiado para los estudios de tortugas marinas incluyen copia anónima únicas de ADN nuclear (ascnDNA; Karl *et al.*, 1992), minisatélites (Peare y Parker, 1996), y microsatélites (FitzSimmons *et al.*, 1997a). Las técnicas para minisatélites y microsatélites, conocidas popularmente como huellas de identificación individual del ADN, también se han usado para evaluar la genealogía y la posibilidad de paternidad múltiple en las nidadas de las tortugas marinas (FitzSimmons, 1998). Esta última metodología está ganando la aceptación como una herramienta estándar en la genética de la conservación, y puede usarse ampliamente para los estudios de poblaciones de tortugas marinas en la próxima década. La serie de técnicas de ADN nuclear están desarrollándose rápidamente, por lo que es probable que análisis adicionales estarán disponibles en el futuro, incluyendo la secuenciación directa de segmentos de ADN nuclear (Karl, 1996).

Evaluación de Stocks en Poblaciones Anidadoras

En la interpretación de la distribución de la variación genética, los investigadores están usando esencialmente el análisis de una sola vía. Si se observa una divergencia significativa entre las poblaciones anidadoras, entonces podemos inferir que el flujo de

genes es bajo y que las cohortes de anidación constituyen poblaciones reproductoras aisladas. Sin embargo, la conclusión inversa no se sostiene invariablemente. Si las frecuencias de los genotipos no son significativamente diferentes entre dos áreas de anidación, entonces no podemos estar seguros que estos sitios de muestreo están unidos en una sola población reproductora distribuida al azar. Este podría ser el caso, sin embargo hay tres razones por qué no puede ser. Primero, podría ser que a la prueba le faltó poder estadístico debido al pequeño tamaño de la muestra (Baverstock y Moritz, 1996). Segundo, podría ser que las poblaciones sólo han divergido recientemente y las diferencias genéticas todavía no se han compilado. Tercero, relativamente pocos migrantes (p. ej., 10 por generación o menos) son suficientes para homogeneizar las frecuencias alélicas, todavía 10 migrantes por generación tendrían un impacto insignificante sobre los procesos demográficos en la mayoría de las poblaciones anidadoras. Consecuentemente, las colonias reproductoras que son genéticamente homogéneas, todavía podrían tener la capacidad de ser demográficamente independientes.

Evaluación de Stocks en Sitios de Alimentación y de Captura

El conocimiento de diferencias genéticas entre las poblaciones anidadoras hace posible determinar qué colonias reproductoras contribuyen a una área particular de alimentación o de captura. Por ejemplo, muestras de la tortuga caguama en las dos principales áreas de anidación en el océano Pacífico, en el sureste de Japón y en Queensland, Australia, se caracterizan

por una diferencia fijada en las secuencias de la región control. De aquí que cada caguama en la región del Pacífico lleva una marca natural de ADNmt que indica el país de origen, con un alto grado de confianza. Estos marcadores se han usado para determinar qué colonias anidadoras son impactadas por la mortalidad de tortuga caguama en las pesquerías que usan redes de deriva o redes palangreras (Bowen *et al.*, 1995). Este enfoque, conocido como el análisis de stocks mezclados, está usándose para evaluar la composición del stock en una variedad de sitios de alimentación y captura para varias especies de tortugas marinas (Broderick y Moritz, 1996; Bowen *et al.*, 1995). El poder de este análisis depende, sin embargo, de hasta qué punto se han caracterizado todas los stocks que potencialmente contribuyen. Esto requiere un muestreo integral de las poblaciones anidadoras en la región, un proceso que ahora está siendo desarrollado para la mayoría de las especies de tortugas marinas. Sin embargo, incluso sin la cobertura completa puede ser posible proporcionar una evaluación cualitativa sobre cuáles poblaciones reproductoras están presentes en las rutas migratorias y los hábitats de alimentación. Se espera que esta aplicación será una herramienta de manejo significativa.

Estrategias de Muestreo y Tamaño de Muestra

Los estudios genéticos moleculares han sido revolucionados por la tecnología de la PCR que permite amplificación de genes específicos a partir de pequeñas cantidades de ADN. Antes del advenimiento de

Glosario de Términos Genéticos

ADNmt- El ADN mitocondrial se transfiere de la madre a sus crías, y de sus crías hembras a la próxima generación. Las variantes son llamadas típicamente haplotipos, y cuando varios haplotipos están presentes entre las poblaciones, se revela la información sobre la estructura del linaje de las hembras.

ADNn-ADN nuclear se hereda de ambos padres. Así, los estudios que usan los marcadores nucleares, proporcionan la información sobre el flujo de genes entre las poblaciones influenciado por hembras y machos.

ascnDNA-copias nucleares únicas anónimas. Éstas son regiones de ADN nuclear únicas (es decir, transcripciones singulares) que pueden utilizarse como marcadores genéticos en las tortugas marinas debido a que los eventos de mutación han generado múltiples alelos (Karl *et al.*, 1992).

Microsatellite loci- regiones de ADN nuclear definidas por la presencia de un segmento o unidad repetitiva de ADN, cada unidad puede tener una longitud de 1-6 pares de base. Estas regiones tienen una tasa de mutación alta y generan alelos de longitudes diferentes. Pueden utilizarse como marcadores genéticos para una resolución de poblaciones a escala fina y en estudios de genealogía.

Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RLFP, por sus siglas en inglés)- La digestión de un segmento de ADN (o el genoma completo del ADNmt) por enzimas de restricción producen fragmentos de una longitud particular dependiendo de la colocación del sitio de restricción (p. ej., la enzima *MseI* corta todos los sitios 'TTAA'). Una mutación a un sitio de restricción, impediría la digestión de la enzima y de esta manera se generarían fragmentos de longitud diferente.

Tabla 2. Cebadores usados para la amplificación de secuencias de ADN en tortugas marinas.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Especies ¹							Longitud Aprox (bp)
		Cc	Cm	Dc	Ei	Lk	Lo	Nd	
región control ADNmit									
TCR5 ²	TTGTACATCTACTTATTTACCAC	++	++	++	++	+	+	++	380
TCR6 ²	CAAGTAAACTACCGTATGCC								
LTCM1 ³	CCCAAAACCGGAATCCTAT	-	++	-	-	-	-	-	510
HDCM1 ³	AGTGAAATGACATAGGACATA								
ADNcsn⁴									
Cm-12R	AGCTGAAGCCAATGAAGAAGAA	+-	++	—	+-	+-	+-	+-	1380
Cm-12L	GCTCAGGTTTAGCTCGAAGGT								
Cm-14R	TAAGCATTATACGTCACGGA	+-	++	—	+-	+-	+-	+	930
Cm-14L	AGTATTTGGGCAGAACAGAA								
Cm28R	TAAATGCCAGGTATGTAATC	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	1400
Cm28L	GATTGCTGGTCTCTGGAAGGCT								
Cm-39R	TGCTAGTTTTGTTAGTTCTGGT	+	++	—	+	+	+	+	1350
Cm-39L	ATAGTGGATTGGAGAAGTTGTT								
Cm-45R	CTGAAAGTGTGTTGAATCCAT	+-	++	+-	+-	+-	+-	+-	1000
Cm-45L	CCGCAAGCAAACATTCTCT								
Cm-67R	GAATATAAGATTTTCATACCCCA	-	++	-	-	-	-	-	1160
Cm-67L	TTTAATTCTGAAAACCTGCTCT								
microsatélites									
Cc7-F ⁵	TGCATTGCTTGACCAATTAGTGAG	++	—	-	-	-	-	++	180-190
Cc7-R ⁵	ACATGTATAGTTGAGGAGCAAGTG								
Cc117-F ⁶	TCTTTAACGTATCTCCTGTAGCTC	++	++	++	++	-	++	++	210-270
Cc117-R ⁶	CAGTAGTGTCAGTTCATTGTTTCA								
Cc141-F ⁷	CAGCAGGCTGTGTCAGTTCTCCA	++	—	-	-	-	-	+-	180-210
Cc141-R ⁷	TAGTACGTCTGGCCTGACTTTC								
Cm3-F ⁶	AATACTACCATGAGATGGGATGTG	+-	++	++	++	-	+-	++	140-200
Cm3-R ⁶	ATTCTTTTCTCCATAAAACAAGGCC								
Cm58-F ⁶	GCCTGCAGTACACTCGGTATTTAT	+-	++	++	++	-	+-	++	120-150
Cm58-R ⁶	TCAATGAAAGTGACAGGATGTACC								
Cm72-F ⁶	CTATAAGGAGAAAGCGTTAAGACA	++	++	+-	++	-	++	++	230-300
Cm72-R ⁶	CCAAATTAGGATTACACAGCCAAC								
Cm84-F ⁶	TGTTTTGACATTAGTCCAGGATTG	++	++	++	++	-	++	++	310-370
Cm84-R ⁶	ATTGTTATAGCCTATTGTTTCAGGA								
Ei8-F ⁶	ATATGATTAGGCAAGGCTCTCAAC	++	+-	++	-	++	++	++	170-250
Ei8-R ⁶	AATCTTGAGATTGGCTTAGAAATC								
DC99 ⁸	CACCCATTTTTTCCCATTG	-	-	++	-	-	-	-	120-140
	ATTTGAGCATAAGTTTTCTGTGG								

¹+ amplifica, variabilidad desconocida, +- amplifica sin variabilidad, ++ amplifica y es variable, - desconocida, —no amplifica

²Norman *et al.* 1994

³Allard *et al.* 1994

⁴Karl *et al.* 1992, Karl 1996

⁵FitzSimmons 1998

⁶FitzSimmons *et al.* 1995

⁷FitzSimmons *et al.* 1996

⁸Dutton 1995

tecnología de la PCR, los análisis genéticos requirieron de tejido fresco o congelado, un impedimento logístico considerable, cuando el organismo del estudio ocupan hábitat tropicales aislados y lejos del laboratorio más cercano. Con la metodología de la PCR, los tejidos pueden guardarse sin refrigeración durante períodos extensos (Apéndice 1). Los tejidos parcialmente degradados, como podría obtenerse de las tortugas muertas, la carne cocinada, o productos procesados de la tortuga, a menudo pueden analizarse.

Los métodos basados en la PCR requieren cebadores específicos, segmentos cortos de ADN sintético, que dirigen la reacción mediada por la enzima. Ahora, se han desarrollado varios cebadores que trabajan sobre el ADN nuclear y ADNmt de la mayoría o todas las especies de tortugas marinas (Tabla 2). Uno de los rasgos más loables de los estudios genéticos en poblaciones de tortuga marina, ha sido que la mayoría de los laboratorios han usado los mismos juegos de cebadores, permitiendo comparaciones directas de la información genética en loci homólogos a través de todo el área de distribución global de las especies. Se espera que esta tendencia se continúe.

¿Qué constituye un tamaño adecuado de la muestra? La respuesta depende de la técnica, nivel de la diferencia genética, y la pregunta bajo consideración. Para definir las poblaciones reproductoras con el ADNmt, el tamaño de la muestra mínimo para las comparaciones estadísticas es de 6-8 *donde hay diferencias grandes*, aunque $N=20$ se recomienda para la mayoría de las evaluaciones de la población. Si se pretende emplear los datos del ADNmit de las colonias reproductora como una base para la evaluación en la áreas de alimentación, entonces el tamaño de muestra deseable es de $N > 30$ para obtener estimaciones más exactas de las frecuencias de los alelos. Para los estudios de ADN nuclear en poblaciones anidadoras, particularmente cuando se usan los microsátélites, es deseable tomar más muestras de la población ($N = 30-50$) debido a que el número de alelos detectados es mayor. Para establecer la escala geográfica de la distribución de una población reproductora, es apropiado diseñar un esquema de muestreo jerárquico, en donde las muestras abarquen varios de los hábitats de anidación dentro de una región (p. ej., primero entre playas de anidación distanciadas unos cuantos cientos de km), y después, varias regiones separadas entre sí por distancias que oscilen entre 100 a 1,000 km.

El tamaño de la muestra en la áreas de

alimentación o de captura (cuando se realiza una evaluación en stocks mezclados) depende del número de poblaciones fuente que se consideren como candidatas viables y el nivel de diferenciación entre las colonias reproductoras (Broderick y Moritz, 1996). En un sitio de alimentación típico, la muestra debe incluir por lo menos a 100 individuos (aunque una muestra más pequeña puede ser informativa en un sentido cualitativo) y puede ser apropiado estratificar las muestras según la edad, sexo, y año. Las muestras de una $N > 100$ están justificadas cuando existen varias colonias reproductoras candidatas que pueden contribuir a las cohortes o cuando hay un número grande de alelos, como puede ser el caso de los microsátélites (vea a Chapman, 1996). La combinación de estudios del piloto con simulaciones de estimaciones de máxima probabilidad (p. ej., Broderick y Moritz, 1996) son importantes para evaluar (i) si las preguntas propuestas pueden ser respondidas dentro de las limitaciones logísticas, y (ii) que tamaño de muestra será necesaria.

Sinergia entre los Estudios de Genética los de Marcaje

Hemos intentado sintetizar las mayores fortalezas y limitaciones de datos moleculares para la evaluación de los stocks. De lo anterior, debe ser obvio que nosotros no consideramos los estudios genéticos como una panacea para la identificación de poblaciones. Sin embargo con un muestreo apropiado y la integración de estudios ecológicos (vea debajo), estos métodos pueden proporcionar conocimientos valiosos.

Los datos genéticos y la información de la recaptura de marcas pueden actuar recíprocamente de tres maneras. Primero, los estudios de marcado generan hipótesis acerca de patrones de migración que son probadas con los datos genéticos.

En varias especies de tortugas marinas, las hipótesis sobre las migraciones con fines reproductivos de estas especies, formulados en base a los estudios de marca - recaptura, han sido evaluados con los estudios genéticos (Bowen *et al.*, 1992, 1994; Broderick y Moritz, 1996; FitzSimmons, 1997a). Segundo, los datos de marcaje pueden usarse para probar si las poblaciones anidadoras que parecen estar unidas por un extenso flujo de genes (basado en los datos genéticos) también muestre un intercambio frecuente de anidadoras dentro de una escala temporal contemporánea. Por ejemplo, los datos de recaptura

confirman un intercambio frecuente de tortugas hembras entre hábitats de anidación adyacentes que son genéticamente homogéneos (Limpus *et al.*, 1992; Norman, 1996). Tercero, los datos moleculares pueden proporcionar nuevas perspectivas que pueden probarse subsecuentemente a través de los programas de marcado. Por ejemplo, los datos genéticos pueden indicar que una población reproductora se extiende más allá de las fronteras de sitios donde se realizan estudios de marcaje intensivos -esta inferencia puede probarse extendiéndose los estudios de marca-recaptura en una escala geográfica más amplia. Finalmente, los datos genéticos pueden demostrar eventos raros de colonización desde una gran distancia, que son difíciles de documentar con estudios de marcaje exclusivamente (Bowen *et al.*, 1992, 1995; Dutton, 1995).

Literatura Citada

- Allard, M. W., M. M. Miyamoto, K. A. Bjorndal, A. B. Bolten y B. W. Bowen. 1994. Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. *Copeia* 1994:34-41.
- Baverstock, P. R. y C. Moritz. 1996. Project design, p.17-27. *In:* D. M. Hillis, C. Moritz, y B. K. Mable (Editores), *Molecular Systematics*, Segunda Edición. Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts.
- Bowen, B. W. y J. C. Avise. 1995. Conservation genetics of marine turtles, p.190-237. *In:* J. C. Avise y J. L. Hamrick (Editores), *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York.
- Bowen, B. W. y S. A. Karl. 1996. Populations genetics, phylogeography, and molecular evolution, p.29-50. *In:* P. L. Lutz y J. Musick (Editores), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bowen, B. W. y W. N. Witzell (Editores). 1996. Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U.S. Department of Commerce.
- Bowen, B. W., A. B. Meylan, J. P. Ross, C. J. Limpus, G. H. Balazs y J. C. Avise. 1992. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46:865-881.
- Bowen, B. W., N. Kamezaki, C. J. Limpus, G. R. Hughes, A. B. Meylan y J. C. Avise. 1994. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution* 48:1820-1828.
- Bowen, B. W., F. A. Abreu-Grobois, G. H. Balazs, N. Kamezaki, C. J. Limpus y R. J. Ferl. 1995. Trans-Pacific migrations of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:3731-3734.
- Broderick, D. y C. Moritz. 1996. Hawksbill breeding and foraging populations in the Indo-Pacific region, p.119-128. *In:* B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U.S. Department of Commerce.
- Chapman, R. W. 1996. A mixed stock analysis of the green sea turtle: the need for null hypotheses, p.137-146. *In:* B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U.S. Department of Commerce.
- Dutton, P. H. 1995. Molecular evolution of sea turtles with special reference to the leatherback, *Dermochelys coriacea*. Ph.D. dissertation. Texas A&M University, College Station.
- Dutton, P. 1996. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies, p.17-24. *In:* B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U.S. Dept. Commerce
- FitzSimmons, N. N. 1998. Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology* 7:575-584.
- FitzSimmons, N. N., C. Moritz y S. S. Moore. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 2:432-440.
- FitzSimmons, N. N., C. Moritz, C. J. Limpus, J. D. Miller, C. J. Parmenter y R. Prince. 1996. Comparative genetic structure of green, loggerhead and flatback populations in Australia based on variable mt DNA and nDNA regions, p.25-32. *In:* B. Bowen y W. Witzell (Editores.), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U. S. Department of Commerce.

- FitzSimmons, N. N., C. Moritz, C. J. Limpus, L. Pope y R. Prince. 1997a. Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics* 147:1843-1854.
- FitzSimmons, N. N., A. R. Goldizen, J. A. Norman, C. Moritz, J. D. Miller y C. J. Limpus. 1997b. Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 94:8912-8917.
- Hartl, D. L. y A. G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*, Tercera Edición. Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts.
- Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (Editores). 1996. *Molecular Systematics*, Segunda Edición. Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts.
- Karl, S. A. 1996. Hybridization and taxonomy of marine turtles: anonymous nuclear DNA sequence analyses, p.99-108. *In*: B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U.S. Dept. Commerce.
- Karl, S. A., B. W. Bowen y J. C. Avise. 1992. Global population structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. *Genetics* 131:163-173.
- Limpus, C. J., J. D. Miller, C. J. Parmenter, D. Reimer, N. McLachlan y R. Webb. 1992. Migration of green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) turtles to and from eastern Australian rookeries. *Wildlife Research* 19:347-58.
- Moritz, C., S. Lavery y R. Slade. 1995. Using allele frequency and phylogeny to define units for conservation and management. *American Fisheries Society Symposium* 17:249-262.
- Norman, J. A., C. Moritz y C. J. Limpus. 1994. Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Molecular Ecology* 3:363-373.
- Norman, J. A. 1996. Conservation genetics of the green turtle *Chelonia mydas*. Ph.D. Thesis, University of Queensland, Brisbane.
- Peare, T. y P. G. Parker. 1996. The use of multilocus DNA fingerprinting to examine local genetic structure within green turtle rookeries, p.87-94. *In*: B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. U.S. Department of Commerce.

Apéndice

Protocolos de Muestreo para el Análisis Genético vía PCR

El muestreo de hembras anidadoras, crías, y tortugas capturadas en el mar puede realizarse sin problema, obteniendo sangre o tejido, teniendo el cuidado necesario para evitar infección de individuos o contaminación cruzada de muestras. En animales vivos, la superficie dónde la sangre o tejido será extraído deberá limpiarse con una solución de detergente, 70% etanol, o isopropanol. También deben limpiarse los instrumentos completamente entre los muestreos sucesivos (o desecharlos), y los tubos de la muestra deben ser nuevos (no de re-uso), limpios y apropiadamente etiquetados.

Colecta de Sangre

Normalmente, la sangre se extrae de los senos cervicales dorsales del cuello y en cualquier de los lados de la columna vertebral, siguiendo el protocolo de Dutton (1996). En las tortugas adultas este seno puede encontrarse entre 1-3 cm debajo de la superficie de la piel. El muestreo es más fácil si el animal se coloca en un ángulo ligero para aumentar el flujo de sangre a la región de la cabeza, y a la vez se tira de la cabeza para estirar y relajar los músculos del cuello. Aunque el muestreo de sangre es una técnica simple y robusta, se recomienda tener cautela en lo siguiente. Primero, esta técnica no debe intentarla personal sin experiencia, ya que los errores pudieran ocasionar dañar en los vasos sanguíneos o al tejido del nervio protegido por la columna vertebral, sobre todo en las crías. Segundo, la obtención de sangre en hembras anidadoras se limita al intervalo de la puesta de la nidada (o cuando ella retorna al mar) y puede ser difícil si su cabeza se encuentra en posición ascendente y con flujo sanguíneo reducido. Para las tortugas laúd, la alternativa es obtener la sangre de las aletas traseras (Dutton, 1996).

Materiales

- Buffer lítico: 100 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM EDTA, pH 8, 10 mM NaCl; 1.0% (w/v) SDS (dodecil sulfato de sodio)
- Jeringa y aguja (o tubos al vacío equipados con agujas “vacutainers”) sin el tratamiento anticoagulante.
- Tubos con tapa de rosca, u otros recipientes para almacenamiento de la muestra perfectamente sellada.

Métodos

1. Colecte la sangre con una jeringa nueva, de acuerdo a Dutton (1996), usando una aguja nueva para cada muestra. La cantidad de sangre extraída y el tamaño de la aguja debe ser proporcional al tamaño de la tortuga: es decir, para adultos tome una muestra de 0.5-1.0 ml de sangre, usando una aguja calibre 20-22 x 38mm, y para las crías, tome una muestra de 0.02-0.1 ml de sangre usando una aguja calibre 28-30 x12.7mm. Para las tortugas laúd se recomienda una aguja de 18 x 76mm (Dutton, 1996).
2. Agregue la sangre inmediatamente al tubo etiquetado con el buffer lítico en una proporción aproximada sangre-buffer de 1:10.
3. Invierta suavemente el tubo varias veces para mezclar los ingredientes.
4. Las muestras, pueden guardarse a la temperatura ambiente durante un año por lo menos. Evite la exposición al calor o la luz del sol.

Nota: el buffer lítico no es tóxico y puede guardarse por largos períodos a la temperatura del ambiente.

Colecta a Partir de Otros Tejidos

Muestras de tejido de 0.1-0.2 gramos puede removerse sin riesgo de un animal adulto, siempre y cuando se acaten los procedimientos de técnicas estériles. Dutton (1996) recomienda remover tejido con un sacabocados de la superficie dorsal de las patas traseras, y otros investigadores han obtenido buenos resultados con muestras de la piel de la región del cuello/hombros (< 1cm²) tomado con un escalpelo u otra herramienta para biopsias. Si la muestra es en crías, también es posible conseguir una buena muestra de ADN, haciendo una muesca pequeña (2mm) removida del borde posterior del carapacho con una hoja del escalpelo (FitzSimmons, datos sin publicar). En la colecta de muestras de animales muertos, recomendamos tomar el tejido del músculo debajo de la piel. Tejidos que se han mantenido congelados previamente son aceptables. Los tejidos secos e incluso el hueso también puede trabajar.

Si los huevos son la fuente de tejido a obtener, o el embrión entero o una muestra de tejido suave de los embriones en estado avanzado de desarrollo, pueden utilizarse para muestra. Para embriones muy jóvenes, la blastula o embrión en desarrollo puede usarse. Si se colectan huevos puestos por las tortugas

recientemente, recomendamos dejar que el embrión se desarrolle durante unos días hasta que pueda identificarse la blastula. Si esto no es posible, entonces una porción de la membrana de la yema puede proporcionar ADN suficiente.

Materiales

- Solución DMSO de preservación: DMSO al 20% (dimetil sulfoxido) en agua saturada con la sal (NaCl).
- Tubos con tapón de rosca u otros recipientes para almacenar la muestra perfectamente sellada.
- Hoja de navaja de afeitar, escalpelo, o sacabocados para la biopsia.
- Guantes desechables (recomendado).

Métodos

1. Colecte el tejido apropiado a sus condiciones de trabajo. Limpie completamente todos los instrumentos entre cada colecta para evitar contaminación cruzada entre muestras.
2. Corte el tejido varias veces con una hoja de la navaja de afeitar o el bisturí para incrementar la penetración de buffer.
3. Agregue el tejido al tubo que contiene la solución de DMSO. La proporción de tejido/buffer debe mantenerse entre 1:5 y 1:10. Asegúrese que la etiqueta del tubo o frasco conteniendo la muestra se mantenga firmemente adherida.
4. Las muestras pueden guardarse a la temperatura del ambiente durante por lo menos un año. Evite la exposición al calor o la luz del sol.

Para hacer un litro de solución salina/DMSO saturada:

1. Agregue NaCl (aproximadamente 200 g) a 750 ml de agua destilada, hasta que la sal ya no se disuelve.
2. Agregue 200 ml DMSO.
3. Agregue el agua destilada necesaria para completar un volumen de 1 litro volumen. La presencia de sal precipitada indica que la solución esta saturada.

Nota: Debe tenerse cuidado con el manejo del DMSO ya que se impregna rápidamente en la piel y puede

ser irritante a la piel, ojos, y el sistema respiratorio. La solución salina saturada/DMSO no es inflamable, y puede guardarse indefinidamente a la temperatura del ambiente. Durante el almacenamiento, puede salirse una poca de sal. Esto no indica que el preservativo ha expirado.

Alternativas

Los tejidos pueden guardarse convenientemente en etanol al 70-95%, o en una concentración similar de isopropanol, en lugar del DMSO. En la ausencia de otros conservadores, las muestras pueden cortarse en pedazos pequeños (< 0.5 cm) y empaquetar en sal. El material secado al sol también puede ser útil.

Diseño del Muestreo y del Proyecto

Colonias Anidadoras

Para colonias anidadoras, debe tenerse cuidado en coleccionar sólo una muestra por cada hembra. La muestra puede ser de sangre de la hembra reproductora, o de un huevo o cría del nido. Tomando en cuenta que las hembras típicamente ponen más de un nido por temporada, todas las muestras deben colectarse dentro del mismo intervalo anidación; es decir, en un periodo máximo de dos semanas, o en su caso, las hembras deber marcarse para prevenir un muestreo de la misma tortuga o su progenie.

Genealogía y Paternidad Múltiple

Para los análisis de genealogía o paternidad múltiple, se recomienda un proyecto piloto que incluiría el muestreo de 10-20 a crías por nidada de 5-10 hembras. Un muestreo más extenso podría incluir 10-20 hembras y un 50% de las crías de cada nidada, incluso de embriones sin eclosionar, y de nidadas múltiples depositadas por hembras individuales (FitzSimmons, 1998).

Muestras de Sitios de Alimentación

El muestreo para las tortugas capturadas en el mar, debe seguirse de acuerdo a los protocolos para sangre o tejido, registrar el tamaño y sexo, y marcarlas antes de regresarlas al mar. Esto disminuirá la posibilidad de un re-muestreo al mismo animal, y la recuperación de la marca puede proporcionar datos importantes para corroborar los resultados basados en los marcadores genéticos.