

Relaciones filogenéticas del género *Chelonia*

Erica Urbiola-Rangel y Omar Chassin-Noria✉

Facultad de Biología-CMEB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Francisco J. Mújica S/N, Morelia Michoacán, 58030. México

Resumen

A la fecha existe una controversia con respecto a la validez del reconocimiento de la tortuga negra *Chelonia agassizii* como una especie distinta a la tortuga verde *C. mydas*. En general las evidencias moleculares han aportado información que niega la validez de *C. agassizii* como especie, basándose en un tamaño de muestra pequeño ($n < 8$) de las principales poblaciones anidadoras de la tortuga negra distribuidas en la costa del estado de Michoacán. Los análisis realizados con caracteres fenotípicos y de distribución, concluyen como válida la asignación de *C. agassizii* como una especie distinta a *C. mydas*. En este trabajo se presentan análisis filogenéticos incluyendo nuevos haplotipos de la región control del ADN mitocondrial, obtenidos de 135 muestras de tortugas negras del estado de Michoacán, para compararse con secuencias de toda el área de distribución del género *Chelonia*. Se concluye que *C. agassizii* no puede considerarse una especie. Sin embargo, se reconoce que es necesario realizar un análisis exhaustivo de toda la información biológica, no solo de evidencia molecular para esclarecer esta controversia, y hasta que esto no sea realizado, es prioritario mantener los esfuerzos de conservación sobre las poblaciones de la tortuga negra.

Palabras clave: Genética, *Chelonia*, Taxonomía.

Abstract

We present a new analysis to contribute to the discussion on the taxonomy of the genus *Chelonia*. We do a phylogenetic analysis using the haplotypes found in 135 samples gathered from black turtle populations from the main rookeries of black turtle (a.k.a. *Chelonia agassizii*) in Michoacán, together with published haplotypes from other populations of the genus in the Atlantic and Pacific oceans, concluding that there are no molecular evidence to support the status of species for black turtle, but due the lack of holistic analyses for clarifying the taxonomic position of black turtle, the conservation efforts must be maintained in order to guarantee the persistence of this unique turtle population.

Keywords: Genetics, *Chelonia*, Taxonomy

Introducción

Es deseable que la clasificación taxonómica refleje las relaciones filogenéticas de los organismos vivos, con la finalidad de comprender el proceso y las rutas evolutivas de los eventos de especiación (Wiley 1981). Sin embargo, existen diversas complicaciones que afectan la identificación del inicio y terminación de estos eventos; es decir, cómo se puede definir objetivamente el límite entre una especie y otra. Existen múltiples conceptos de especie que hacen énfasis en diversos atributos de los organismos, Futuyma (1998) plantea que existen al menos siete definiciones de especie, de manera que no siempre es posible que una especie sea considerada como tal bajo todas las definiciones.

Mientras que no es un objetivo de este artículo hacer una revisión sobre los diversos conceptos de especie, es indispensable mencionar que el *Concepto Biológico de Especie* propuesto por Mayr (1942) es el que se emplea comúnmente (aunque no es aplicable a todas las formas vivas p. ej. en organismos con reproducción asexual) y hay otros conceptos como el *Evolutivo* propuesto por Simpson (1951) que define a la especie como “un linaje de poblaciones de organismos que mantienen su identidad de otros linajes y tienen su propia tendencia evolutiva y destino histórico”, o el *Filogenético* propuesto por Cracraft (1989) y de Queiroz y Donaghue (1990) para el que la especie “es el grupo de organismos más pequeño diagnosticable, en el que hay un

patrón de ancestría-descendencia” que presumiblemente tienen una aplicación más universal y objetiva.

Actualmente, la situación taxonómica de la tortuga negra es motivo de controversia. Algunos autores sugieren que la tortuga negra, es una especie independiente (*Chelonia agassizii*; Bocourt 1868), mientras que otros autores sugieren que es una población regional o una subespecie de la tortuga verde (*Chelonia mydas*; Linnaeus 1756). La controversia se debe a que existen evidencias a favor y en contra de la asignación de especie para la tortuga negra:

Se ha encontrado que *C. agassizii* y *C. mydas* son especies que ocurren de manera simpátrica en algunas localidades (Islas Galápagos y Nueva Guinea) sin que a la fecha se tenga evidencia de eventos reproductivos entre estas, por lo que Pritchard (1997) considera que existe aislamiento reproductivo y por consiguiente es válida la existencia *C. agassizii* como especie.

La tortuga negra es diferente en cuanto a forma, tamaño y coloración del caparazón, de acuerdo a un trabajo en el que se comparan tortugas del estado de Michoacán (México, océano Pacífico) y de la playa Tortuguero, (Costa Rica, océano Atlántico) (Figueroa y Alvarado 1990).

Kamezaki y Matsui (1995) analizaron medidas craneales en siete playas de anidación, dos del Atlántico y 5 del Pacífico, concluyendo que la diferenciación morfológica que ellos encuentran entre *C. mydas* y *C. agassizii* es suficiente para clasificar a esta última como subespecie: *C. mydas agassizii*.

Bowen *et al.* (1992) analizaron el DNAm con enzimas de restricción sobre muestras de 15 colonias dentro de la área de

✉ **Autor de correspondencia:** Facultad de Biología-CMEB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Francisco J. Mújica S/N, Morelia Michoacán, 58030. México. email: ochassin@umich.mx

distribución global del género *Chelonia*, encontrando una clara distinción entre las poblaciones del Indo-Pacífico con respecto a las del Atlántico y Mediterráneo. Sin embargo, no encontraron evidencia, para considerar que la tortuga negra forme un linaje independiente con respecto a las demás tortugas de este género, por lo tanto no se apoya la asignación de especie independiente.

Karl *et al.* (1992) analizaron genes nucleares de copia única, con enzimas de restricción para evaluar la diferenciación genética entre tortuga negra y verde. En su análisis filogenético no se apoya la asignación de especie para *C. agassizii*.

Dutton *et al.* (1996) secuenciaron dos segmentos mitocondriales de tortuga negra y verde (ND4 y región control) sin que el análisis filogenético demuestre una distinción clara de la tortuga negra con respecto a la tortuga verde.

Karl y Bowen (1999) secuenciaron 1,341 pares de bases de tres loci usados por Karl *et al.* (1992), sin observar que las tortugas negras analizadas formen un grupo monofilético distinto al resto de las *Chelonias*.

Los trabajos previamente realizados para definir la situación taxonómica de la tortuga negra tienen tamaños de muestra pequeños (n < 8) para las poblaciones de Michoacán donde se encuentran las principales playas de anidación para la tortuga negra. En este trabajo se incrementó significativamente el tamaño de muestra (n = 135), para tener mejor representada a esta población y realizar un nuevo análisis para discutir la situación taxonómica dentro del género *Chelonia*.

Materiales y métodos

Las secuencias de la región control del ADN mitocondrial empleados para este análisis (Tabla 1) son: Cinco haplotipos, publicados en (Chassin-Noria *et al.*, 2004) obtenidos en las poblaciones anidadoras de tortuga negra en la costa michoacana y uno publicado por Dutton *et al.* (1996) (Pacífico Oriental Mexicano) (seis haplotipos). Haplotipos de playas de anidación del género *Chelonia*, provenientes de: Dos haplotipos de colonias del Pacífico central, uno de colonias del Pacífico occidental, y cuatro haplotipos encontrados en poblaciones del Atlántico. Se eligió también una secuencia

de tortuga caguama *Caretta caretta* y tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* como grupo externo del género *Chelonia*.

Con las 14 secuencias seleccionadas se realizó el alineamiento, con ClustalV para PC versión 1.7 (Higgins 1991) y se revisó a ojo sobre la visualización de las secuencias proporcionadas por el programa GeneDoc para PC versión 2.2.0 (Nicholas *et al.*, 1997). Este paso es crucial para el establecimiento de relaciones filogenéticas, durante este proceso se forman hipótesis de homología (táxica o transformacional *sensu* De Luna y Mishler 1996). El alineamiento obtenido se presenta en la figura 1.

Relaciones de similitud del género Chelonia

Con el alineamiento mostrado en la Figura 1 se realizó un “bootstrap” (mil replicas) con SEQBOOT (PHYLIP 3.5 Felsenstein 1993) y posteriormente se generaron las matrices de distancias genéticas empleando el programa DNADIST de PHYLIP 3.5 (Felsenstein 1993). Las distancias se calcularon con el modelo de Kimura de dos parámetros con una proporción de transición : transversión de 14:1 propuesto por Karam (1997). Con las matrices de distancias se generaron los fenogramas empleando el algoritmo de NEIGHBOR

de PHYLIP 3.5 (Felsenstein 1993 basado en el procedimiento “Neighbor Joining” de Saitou y Nei 1987). Con los fenogramas obtenidos se realizó un consenso, para determinar las relaciones de similitud entre los 15 haplotipos. El árbol obtenido se editó empleando Treeview versión 1.5.2. (Page 1996).

Relaciones filogenéticas del género Chelonia

Para la reconstrucción filogenética se usó el mismo alineamiento presentado en la Figura 1. Se realizaron varios análisis. En primera instancia una búsqueda heurística del cladograma más parsimonioso usando Winclada como interfase para Nona (Nixon, 1999). Posteriormente se realizó una Bootstrap (mil replicas) con un análisis heurístico de cada una de las matrices, y a partir de los cladogramas obtenidos se generó un cladograma consenso. Finalmente se le realizó un análisis para obtener el índice de decaimiento “decay index” con SEPAL Versión 1.4. (Salisbury 2001).

Resultados

Las relaciones de similitud del género *Chelonia* se presentan en el fenograma de la Figura 2a. Se observa que los haplotipos del Pacífico y Atlántico se agrupan en

Tabla 1. Haplotipos empleados en la reconstrucción filogenética, océano de origen y referencia.

Especie	Secuencia	Localización	Fuente
Tortuga negra <i>Chelonia agassizii</i>	he	Pacífico oriental México (Michoacán)	Chassin-Noria <i>et al.</i> , 2004
	hf		
	hh		
	hi		
	hm		
	CA/Dutton		Dutton <i>et al.</i> , 1996
Tortuga verde <i>Chelonia mydas</i>	CMHAW/Nor	Pacífico central Hawaii	Norman <i>et al.</i> , 1994
	CMPA/Dutt		Dutton <i>et al.</i> , 1996
	CMJVAa/No	Pacífico occidental Java	Norman <i>et al.</i> , 1994
	CM2/Encal	Atlántico occidental Florida	Encalada 1996
	CM10/Encal	Atlántico occidental Isla Ascensión	Encalada 1996
	CM12/Encal	Atlántico occidental Brasil	Encalada 1996
	CM13/Encal	Mediterráneo Chipre	Encalada 1996
Golfina <i>L. olivacea</i>	Olivacea	Grupo externo	Dutton <i>et al.</i> 1996
Caguama <i>C. caretta</i>	Caretta	Grupo externo	Dutton <i>et al.</i> 1996

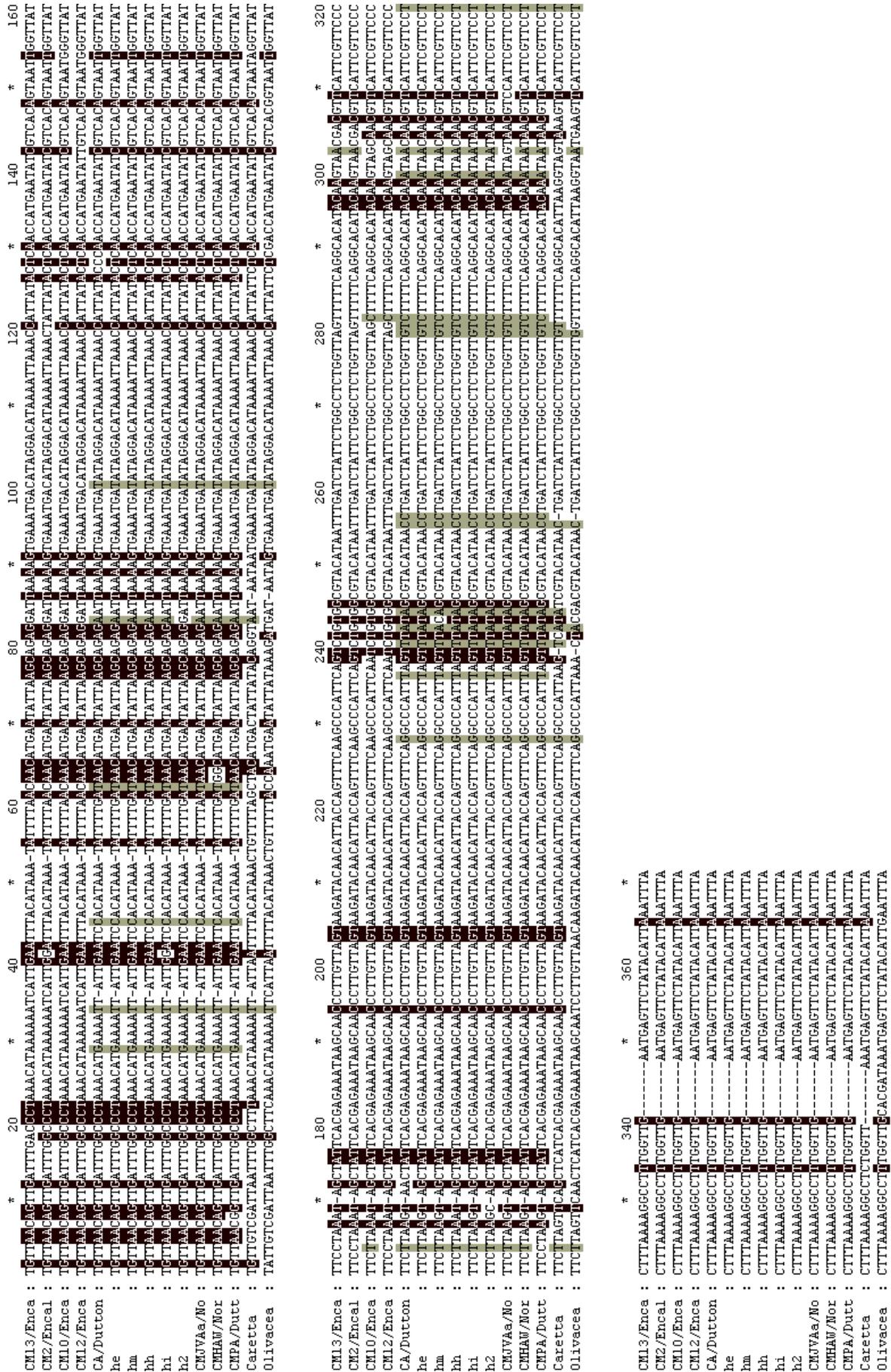


Figura 1. Alineamiento de los 15 haplotipos empleados para la reconstrucción filogenética, los haplotipos E, F, H, J, M y CA/Dutton corresponden a tortuga negra. Los 7 haplotipos siguientes fueron obtenidos de poblaciones de *C. mydas* y los dos últimos, *Caretta* y *Olivacea*, son grupos externos de *Caretta caretta* y *Lepidochelys olivacea* respectivamente.

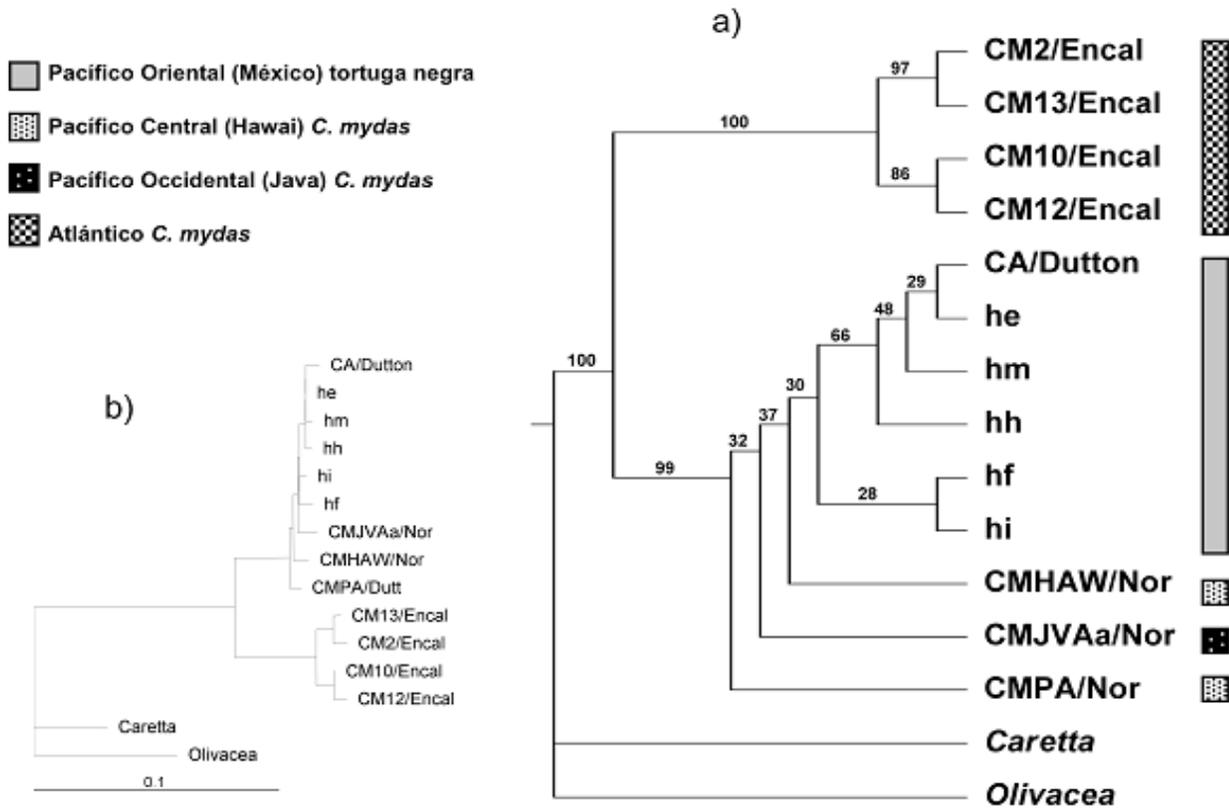


Figura 2. a) Fenograma obtenido a partir de las distancias genéticas de Kimura dos parámetros entre haplotipos de *Chelonia* en colonias del Pacífico y Atlántico. Los números en las ramas representa el porcentaje de aparición de las mismas en un análisis de bootstrap (1000 replicas). . b) Fenograma obtenido a partir de las distancias genéticas entre haplotipos y construido mediante "Neighbor joining". La escala es en unidades de distancia genética de Kimura.

distintas ramas. Los haplotipos de tortuga negra marcados en gris se encuentran muy cercanos en distancia con los haplotipos de *C. mydas* del Pacífico.

Las relaciones filogenéticas del género *Chelonia* se presentan en el cladograma de la **Figura 3**. Se observa que los haplotipos de tortuga negra (marcados con rectángulo gris) forman un grupo polifilético dentro del clado de poblaciones de *C. mydas* del Pacífico central (marcados con rectángulo de puntos negros y fondo blanco) y de las poblaciones de *C. mydas* del Pacífico occidental (rectángulo de puntos blancos fondo negro). Aparte, en otro clado, se encuentran los haplotipos de *C. mydas* del océano Atlántico (marcados con rectángulo de cuadros pequeños blanco y negro).

Los valores de Índice de consistencia (CI) son una medida que determina el nivel de homoplasias en una filogenia, un índice de consistencia igual a uno representa una filogenia que no tiene caracteres homoplásicos. El valor de índice de consistencia obtenido en esta filogenia es bueno (CI > 0.8) (Siebert 1994). Se ha observado que el valor del índice de consistencia se encuentra negativamente correlacionado con el número de taxa terminales (OTUs) y el número de datos. Esto limita su uso particularmente cuando se pretende comparar este valor obtenido en cladogramas con distinto número de OTUs y caracteres (Siebert 1994).

El índice de retención es una medida de soporte de los clados formados con respecto al CI y representa la fracción de

aparentes sinapomorfías en los caracteres que son retenidas como sinapomorfías en el cladograma final (Lipscomb, 1998). El índice de retención posee la ventaja sobre el índice de consistencia en el sentido de que los caracteres no-informativos, autapomorfías, ni simplesiomorfías no lo hacen crecer. El valor obtenido de índice de retención indica que una alta proporción (0.85) de las sinapomorfías en los datos se mantienen como sinapomorfías en el cladograma.

En el análisis de decaimiento de la filogenia generada (**Figura 4**.) se presenta sobre las ramas el número de pasos (mutaciones) que puede relajarse un clado sin colapsarse (Salisbury 1999). Esto es, si un grupo monofilético está presente en todos los cladogramas mayores en 5 pasos con respecto al cladograma más parsimonioso, pero no en los cladogramas de 6 pasos, entonces ese grupo monofilético tiene un índice de decaimiento de 6. En la figura se observan politomías que no se mantienen si se aumenta el número de pasos.

El cladograma obtenido después de mil replicas bootstrap (**Figura 5**) presenta los mismos clados obtenidos en el análisis de decaimiento, esta evidencia aunada a los valores de IC, IR, sugieren que la reconstrucción filogenética es robusta.

Discusión

En este trabajo se realizaron análisis fenéticos y cladistas dado que en las simulaciones realizadas para determinar que metodología

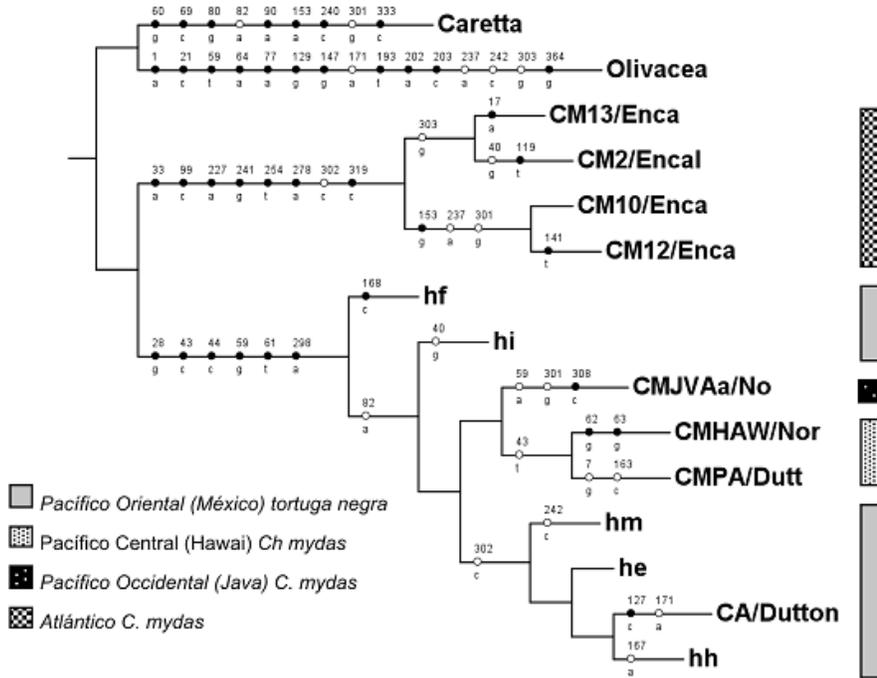


Figura 3 Cladograma obtenido de los 15 haplotipos. Largo del cladograma = 103 índice de consistencia = 0.81 índice de retención = 0.85. Los círculos negros representan cambios no homoplásicos (sinapomorfias o autapomorfias) y círculos blancos representan caracteres homoplásicos. Los números arriba de los círculos representan la posición en la que se encuentran los cambios, y la letra debajo de las ramas representa el estado de carácter.

es más robusta los resultados no son concluyentes (Hillis *et al.*, 1994). Algunos autores han planteado que el desempeño de los algoritmos es similar en el sentido de que logran la reconstrucción de la historia evolutiva con un alto grado de exactitud (Hillis *et al.*, 1994), otros autores plantean que los algoritmos basados en matrices de distancia (fenéticos) son más robustos

(Sourdis y Nei 1988). Sin embargo Crisci y López (1983) han planteado que las relaciones obtenidas con métodos fenéticos no siempre son congruentes con las relaciones genealógicas base de las especies.

Cuando se trabaja con similitud para reconstruir la filogenia se corre el peligro de interpretar de manera errónea

las relaciones filogenéticas, dado que no siempre los individuos más similares están más estrechamente relacionados desde el punto de vista filogenético. Debido a la existencia de caracteres homoplásicos resultado de convergencias, paralelismos y reversiones (Crisci y López 1983).

De los análisis obtenidos por métodos fenéticos (**figura 2**) y cladísticos (**figura 3**, 4 y 5) se puede discutir lo siguiente.

Si la tortuga negra se hubiera diferenciado como especie independiente como propone Pritchard (1997, 1999) se esperaría que los haplotipos de ésta se agruparan aparte del resto de los haplotipos del genero *Chelonia*, por el patrón de sinapomorfias constituyendo un grupo monofilético.

En los cladogramas obtenidos (**figura 3**, 4, 5) y el fenograma (**figura 2**) se observa que las tortugas del género *Chelonia* del Atlántico y Pacífico se encuentran, efectivamente, en clados diferentes manteniendo un patrón congruente con la separación geográfica de las poblaciones. Sin embargo no puede observarse un patrón filogeográfico perfecto cuando se observan los haplotipos de las tortugas del Pacífico.

El resultado del presente análisis no apoya la asignación de especie (*sensu* Concepto Filogenético de Especie Cracraft 1989; De Queiroz y Donaghue 1990) debido a que la tortuga negra forma un grupo monofilético con los haplotipos de tortuga verde del Pacífico y los haplotipos de tortugas verdes del Atlántico se agrupan en un grupo monofilético distinto. En la sistemática actual no se duda que las *C. mydas* de ambas cuencas oceánicas pertenecen a una misma especie. Una asignación de especie independiente a la tortuga negra requeriría que esta se encontrara en un grupo monofilético independiente separado del grupo de haplotipos de tortuga verde tanto del Atlántico como del Pacífico. El resultado respecto a la situación taxonómica de la tortuga negra es el mismo en los análisis realizados con el método fenético o cladístico (ver figuras 2, 3, 4 y 5).

Actualmente, la evidencia proporcionada por la sistemática molecular genera una hipótesis de trabajo que será mejorada cuando se realice un análisis de evidencia total considerando no sólo datos moleculares, logrando

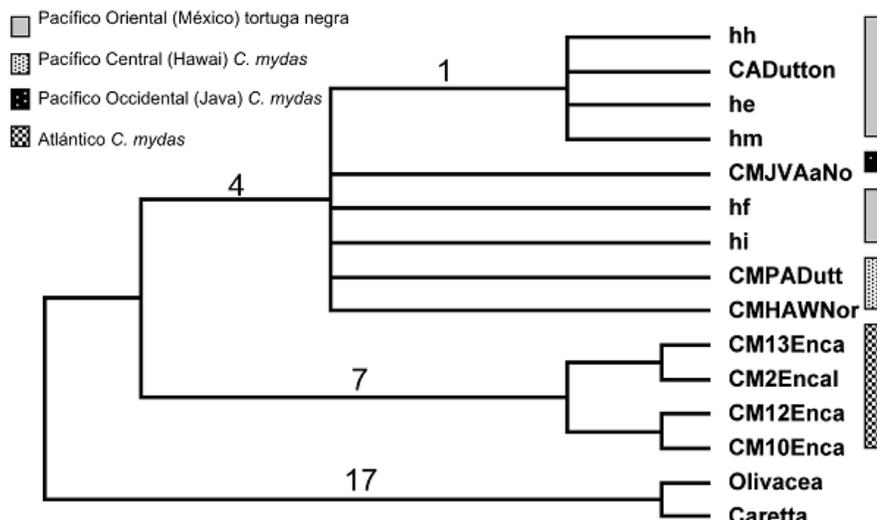


Figura 4. Cladograma en el que se muestra el análisis de decaimiento. Los números sobre las ramas son los valores de decaimiento. Las politomias se encuentran agrupando OTUs que no se mantienen al incrementar el número de pasos en el árbol.

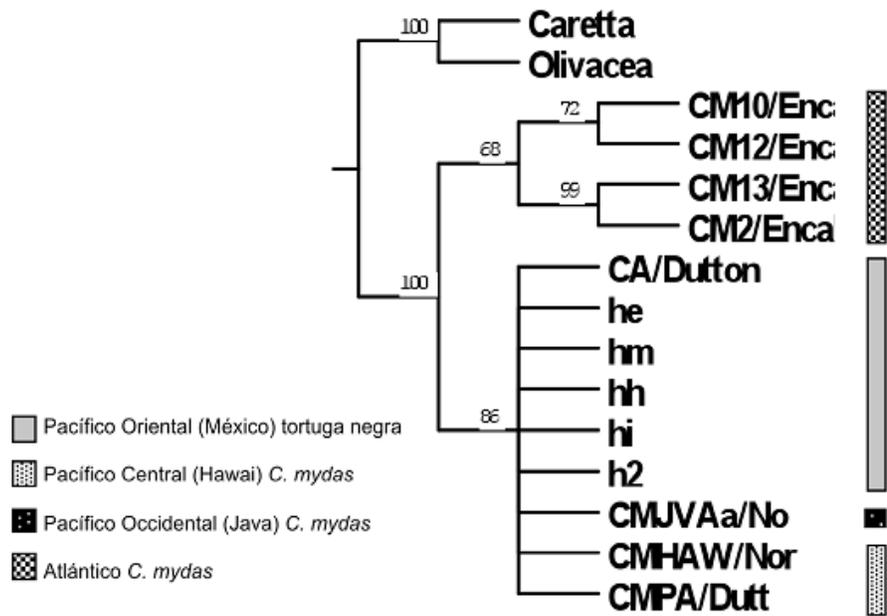


Figura 5. Cladograma de consenso estricto de mil bootstrap. Los valores arriba de los clados representan su porcentaje de aparición en los mil cladogramas analizados.

entonces, definir la situación taxonómica del complejo *Chelonia*.

Con respecto a la evidencia existente en contra y en favor de la asignación de especie de la tortuga negra se discute a continuación lo pertinente para cada una de ellas.

Pritchard, 1997 indica que *C. mydas* y *agassizii* son simpátricas en algunas localidades (Islas Galápagos y Nueva Guinea). Esto implica que ambas “especies” comparten una misma localidad pero no se reproducen. Sin embargo a la fecha no existe un estudio en el que se demuestre que las *C. agassizii* se aparean con las *C. mydas* sin producir descendencia pero tampoco existe evidencia de que no lo pueden realizar, por lo tanto este argumento no es relevante hasta que se tenga alguna evidencia concreta.

Los trabajos realizados por Figueroa y Alvarado (1990) y por Kamezaki y Matsui (1995), presentan evidencia morfológica de forma y tamaño del caparazón y cráneo respectivamente. Figueroa y Alvarado (1990) proponen que la tortuga negra es una especie, mientras que Kamezaki y Matsui (1995) la consideran una subespecie. El trabajo de Kamezaki y Matsui fue realizado con base a muestras de siete playas de anidación, dos del Atlántico y cinco del Pacífico; Alvarado y Figueroa consideran muestras de dos

sitios de anidación, Colola, Michoacán en el Pacífico y Tortuguero, Costa Rica en el Atlántico. Es evidente que hace falta obtener información morfológica del área de distribución del género *Chelonia* para que estos análisis sean más robustos. Información molecular de toda el área de distribución del género *Chelonia* se encuentra disponible.

El trabajo de Bowen *et al.* (1992) ha sido criticado por los defensores del status de especie para la tortuga negra (Pritchard 1999) por la aparente incongruencia obtenida en los árboles de similitud en los que los haplotipos de Michoacán son más similares a los de Omán del océano Índico que a los de las Islas Galápagos. Karl y Bowen (1999) responden de la siguiente manera “La información genética (y no la morfológica) han vislumbrado el único patrón zoogeográfico de esta especie que tiene sentido: la separación de las poblaciones del Atlántico-Mediterráneo e Índico-Pacífico en una escala de un par de millones de años. La similitud de dos colonias ampliamente separadas (del océano Índico y Pacífico) no es sorprendente en el contexto de los recientes estudios que demuestran que las tortugas marinas cruzan regularmente las cuencas oceánicas (Bowen *et al.*, 1995)”

Se ha criticado a los trabajos de sistemática molecular con tortugas marinas porque en un principio se

realizaron trabajos únicamente con DNAmT, pero en la actualidad existen trabajos con secuencias de marcadores nucleares (Dutton *et al.* 1996; Karl y Bowen 1999) y la evidencia aportada por estos trabajos es congruente con el DNAmT, en el sentido de que la tortuga negra está más estrechamente relacionada con las tortugas verdes del océano Pacífico que las tortugas verdes del Pacífico con las del Atlántico, de manera que no se soporta la asignación de especie a la tortuga negra.

Karl y Bowen (1999) proponen que a la tortuga negra se le considere una especie geopolítica definida como un grupo de individuos confinados a un área geográfica o políticamente definida que han recibido el status de especie independientemente de los criterios, morfológicos, genéticos o de aislamiento reproductivo. Evidentemente, esta definición carece de valor biológico, pero es relevante si se considera en el marco de los esfuerzos de conservación.

Una crítica que no se ha realizado en particular en la discusión de la posición taxonómica de esta tortuga es que en el caso de las filogenias realizadas con genomas mitocondriales es que es posible que estemos reconstruyendo un árbol de genes y no árbol de especies (Li 1997). Sin embargo para evitar este problema se sugiere usar varios genes, y en los análisis moleculares de la posición sistemática se han empleado genes nucleares y mitocondriales.

Definir la importancia para la conservación de una población de acuerdo con su situación taxonómica es inadecuado. A la fecha entre los defensores y opositores de que la tortuga negra sea una especie independiente existe consenso con respecto a que: la tortuga negra es peculiar en cuanto a composición genética (sus haplotipos solo se encuentran en la tortuga negra) y características morfológicas y es posible que esta población se encuentre en proceso de especiación. Lo más importante sin duda es que preocuparse por la definición de la posición taxonómica de la tortuga negra es absurdo si esta población continúa disminuyendo en tamaño, por lo que en este caso a estas poblaciones se les ha de considerar como una prioridad de conservación manteniendo los esfuerzos de conservación realizados desde hace más de tres décadas.

Agradecimientos

A las comunidades indígenas de la costa Michoacana, que permitieron la colecta de muestras necesarias para la obtención de las nuevas secuencias usadas en este trabajo. A CONACYT por la beca de maestría E Urbiola-Rangel quien desarrolla este manuscrito como parte de la asignatura optativa de posgrado "Genética en sistemas marinos".

Referencias

- Bowen WB, Meylan AB, Ross JP, Limpus CJ, Balazs GH y Avice CJ** (1992) Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution*. 46:865-881
- Chassin-Noria O, Abreu-Grobois A, Dutton PH, y Oyama K** (2004) Conservation genetics of the east Pacific green turtle (*Chelonia mydas*) in Michoacan, Mexico. *Genetica*. 121: 195–206
- Cracraft J** (1989) Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and process of differentiation. En D Otte y JA Endler (eds), *Speciation and its consequences*. Sinauer Associates. pp 29-59
- Crisci JV y Lopez FA** (1983). Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. OEA-Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Washington D.C. 133 pp
- De Luna E y Mishler BD** (1996) El concepto de homología filogenética y la selección de caracteres taxonómicos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 59:131-146
- De Queiroz K Y Donaghue MJ** (1990) Phylogenetic systematics or Nelson's version of cladistics?. *Cladistics*. 6:61-75
- Dutton PH, Davis TG y Owens D** (1996b) Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-Leucine tRNA and control region of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 5:511-521
- Encalada SE, Lahanas PN, Bjordnal KA, Bolten AB, Miyamoto MM y Bowen BW** (1996) Phylogeography and population structure of Atlantic and Mediterranean green turtle (*Chelonia mydas*): a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology*. 5:473-484
- Felsenstein J** (1993) *Phylogeny inference package (PHYMLIP)*. Version 3.5. University of Washington, Seattle.
- Figueroa A y Alvarado J** (1990) Morphometric comparison of the *Chelonia* populations of Michoacán, Mexico and Tortuguero, Costa Rica. En Richardson JI (ed), *Proceedings of the Tenth Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Tec. Mem. NMFS-SEFC. pp 179-182
- FitzSimmons N** (1998) Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology*. 7:575-584
- Futuyma JD** (1998) *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates. 763 pp
- Higgins DG, Bleasby AJ y FuchsR** (1991) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS*. 8:189-191.
- Hillis DM, Huelsenbeck JP y Cunningham CW** (1994) Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science*. 264:671-677
- Kamezaki N y Matsui M** (1995) Geographic variation in the skull morphology of the green turtle, *Chelonia mydas*, with a taxonomic discussion. *Journal of Herpetology* 29: 1-60
- Karam MS** (1997) *Patrones de sustitución nucleotídica de la región de control del DNA mitocondrial de tortugas marinas*. Tesis Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México; pp 72
- Karl SA, Bowen BW y Avice JC** (1992) Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. *Genetics* 131:163-173
- Karl SA y Bowen WB** (1999) Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: Molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology*. 13:990-999
- Li W-H** (1997) *Molecular Evolution*. Sinauer. 487 pp
- Lipscomb D** (1998) *Basics of cladistic analysis*. George Washington University. Washington D.C. 75 pp
- Mayr E** (1942) *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press.
- Miller DJ** (1997) Reproduction in sea turtles. En L Lutz y AJ Musick (eds), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press. pp 51-81
- Nicholas KB y Nicholas HB** (1997) *GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments*. Distribuido por el autor.
- Nixon KC** (1999) *Winclada (BETA) ver. 0.9.9* Published by the author, Ithaca, NY.
- Norman JA, Moritz C y Limpus CJ** (1994) Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Molecular Ecology*. 3:363-373
- Page RD** (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358
- Pritchard PC** (1997) Evolution, phylogeny, and current status. En L Lutz y AJ Musick (eds), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press. pp. 1-28.
- Pritchard PC** (1999) Status of the black turtle. *Conservation Biology*. 13:1000-1003
- Saitou N y Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425
- Salisbury BA** (1999) Strongest evidence: maximum apparent phylogenetic signal as a new cladistic optimality criterion. *Cladistics*. 48:137-149
- Salisbury BA** (2001) Strongest evidence and parsimony analyzer. Version 1.4. Mayo, 2001. e-mail: ben@aya.yale.edu disponible en: <http://jkim.eeb.yale.edu/salisbur/>
- Siebert JD** (1994) Tree statistics; trees and "confidence"; consensus trees; alternatives to parsimony; character weighting; character conflict and its resolution. En PL Forey, ChJ Humphries, IJ Kitching, RW Scotland, DJ Siebert, y DM Williams (eds), *Cladistics: a practical course in systematics*. Oxford. pp 73-88
- Simpson GG** (1951) The species concept. *Evolution*. 5:258-289.
- Sourdis J y Nei M** (1988) Relative efficiencies of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution*. 5:298-311
- Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680
- Wiley EO** (1981) *Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematics*. John Wiley and Sons. 489 pp