

Análisis de haplotipos de la tortuga cabezona *Caretta caretta* (*Testudines: Cheloniidae*) en dos playas del Caribe colombiano¹

Carolina Franco Espinosa², Javier Hernández Fernández³

Resumen

Introducción. La tortuga *Caretta caretta* habita los mares tropicales y subtropicales. Es una especie en vía de extinción que anida las playas en Colombia y hace extensas migraciones. Los haplotipos mitocondriales de esta tortuga se han utilizado para estudios de genética poblacional, filogeografía y estado de las especies con el objetivo de desarrollar planes de conservación de la especie. **Objetivo.** Identificar haplotipos mitocondriales en tortugas cabezonas anidantes del Caribe colombiano. **Materiales y Métodos.** Se recolectaron muestras de sangre periférica de esta especie en dos sitios del Caribe colombiano: Don Diego (playa de anidación) y la Isla San Martín de Pajarales (localidad de alimentación). El ADN total fue extraído a partir de las células sanguíneas, y utilizado para amplificar por PCR la región control mitocondrial (398 pb). Estos productos fueron purificados y secuenciados. Se realizó un alineamiento básico buscando regiones de similitud local entre las secuencias obtenidas y las descritas previamente para la especie. Se hicieron análisis filogenéticos utilizando los criterios de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML). **Resultados.** Se identificaron tres haplotipos, CC-A1 y CC-A2 comúnmente encontrados en poblaciones reproductivas de México, el Mediterráneo y el sudeste de Estados Unidos, y un nuevo haplotipo CC-SM1 en la playa Don Diego (Magdalena). Los árboles filogenéticos muestran relación de una porción de los individuos anidantes y de forrajeo de las agregaciones del Caribe colombiano con las súper-agregaciones del Atlántico y el Mediterráneo, sugiriendo que estas podrían ser algunas de las fuentes importantes de

individuos presentes en Colombia. **Conclusiones.** Es necesario estudiar una muestra más grande para poder confirmar hipótesis planteadas. Se identificó un nuevo haplotipo denominado CC-SM1. Este es el primer estudio sobre haplotipos mitocondriales de *C. caretta* realizado en Colombia.

Palabras clave: *caretta caretta*, nuevo haplotipo, máxima parsimonia, región control.

Analysis of haplotypes of the loggerhead turtle, *Caretta caretta* (*Testudines: Cheloniidae*), on two beaches of the Colombian Caribbean

Abstract

Introduction. The *Caretta caretta* turtle inhabits tropical and subtropical seas. It is an endangered species that nests on Colombian beaches and makes long migrations. The mitochondrial haplotypes of this turtle have been used for population genetics, phylogeography and species status studies with the aim of developing species conservation plans. **Objective.** Identify mitochondrial haplotypes in nesting loggerhead turtles from the Colombian Caribbean. **Materials and Methods.** Peripheral blood samples from this species were collected in two sites of the Colombian Caribbean: Don Diego (nesting beach) and San Martín de Pajarales island (feeding ground). The total DNA was extracted from blood cells and used to amplify the mitochondrial

1 Artículo derivado del proyecto de investigación titulado "Caracterización genética de tortugas marinas en Colombia", financiado por la Universidad Jorge Tadeo Lozano y realizado entre 2013 y 2017.

2 Bióloga Marina, Ms. Ciencias del Mar y Limnología. Trabaja en genética y biología molecular de organismos marinos.

3 Profesor Asociado II Universidad Jorge Tadeo Lozano, Líder Grupo de Investigación "Genética, Biología Molecular & Bioinformática". Investigador Senior (Colciencias). MSc genética y biología molecular, candidato a Doctor en Ciencias Naturales.

control region by PCR (398 bp). These products were purified and sequenced. A basic alignment was performed looking for local similarity regions between the sequences obtained and those previously described for the species. Phylogenetic analyses were conducted by using the maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) criteria. **Results.** Three haplotypes were identified: CC-A1 and CC-A2, which are commonly found in breeding populations in Mexico, the Mediterranean and southeast U.S.; and a new haplotype, CC-SM1, on the Don Diego beach (Magdalena). The phylogenetic trees show a relationship between a portion of the nesting and feeding individuals from the Colombian Caribbean aggregations and the Atlantic and Mediterranean super-aggregations, suggesting that these could be some of the important sources for individuals inhabiting Colombia. **Conclusions.** It is necessary to study a larger sample to be able to confirm the proposed hypotheses. A new haplotype called CC-SM1 was identified. This is the first study on *C. caretta* mitochondrial haplotypes conducted in Colombia.

Key words: *caretta caretta*, new haplotype, maximum parsimony, control region.

Análise de haplotipos da tartaruga cabeça-de-cara, *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) em duas praias do Caribe colombiano

Resumen

Introdução. A tartaruga *Caretta caretta* habita os mares tropicais e subtropicais. É uma espécie em via de extinção que enraiza as praias na Colômbia e faz extensas migrações. Os haplotipos mitocondriais

desta tartaruga se há utilizado para estudos de genética populacional, filogeografia e estado das espécies com o objetivo de desenvolver planos de conservação da espécie. **Objetivo.** Identificar haplotipos mitocondriais em tartarugas cabeça-de-cara enraizada no Caribe colombiano. **Materiais e Métodos.** Se coletaram amostras de sangue periférica desta espécie em dois lugares do Caribe colombiano: Don Diego (praia de enraizamento) e a Ilha San Martín de Pajarales (localidade de alimentação). O DNA total foi extraído a partir das células sanguíneas, e utilizado para amplificar por PCR a região controle mitocondrial (398 pb). Estes produtos foram purificados e sequenciados. Se realizou um alinhamento básico buscando regiões de semelhança local entre as sequências obtidas e as descritas previamente para a espécie. Se fez análise filogenéticas utilizando os critérios de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilitude (ML). **Resultados.** Se identificaram três haplotipos, CC-A1 e CC-A2 comumente encontrados nas populações reprodutivas do México, o Mediterrâneo e o sudeste de Estados Unidos, e um novo haplotype CC-SM1 na praia Don Diego (Magdalena). As árvores filogenéticas mostram relação de uma porção dos indivíduos enraizados e de forragem das agregações do Caribe colombiano com as super-agregações do Atlântico e o Mediterrâneo, sugerindo que estas poderiam ser algumas das fontes importantes de indivíduos presentes na Colômbia. **Conclusões.** É necessário estudar uma amostra maior para poder confirmar hipótese proposta. Se identificou um novo haplotype denominado CC-SM1. Este é o primeiro estudo sobre haplotipos mitocondriais de *C. caretta* realizado na Colômbia.

Palavras chave: *caretta caretta*, novo haplotype, máxima parcimônia, região controle.

Introducción

La tortuga cabeza-de-cara, *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) es una especie marina distribuida mundialmente en zonas tropicales y subtropicales que anida en líneas costeras adyacentes a corrientes cálidas y que realiza extensas migraciones relacionadas con actividades reproductivas y de alimentación (Eckert, Bjørndal, Abreu-Grobois, & Donnelly, 2000). Los huevos y la carne de *C. caretta* han sido utilizados como fuente de proteína para alimentación humana; el caparazón y su piel, para producir artesanías. Esta explotación se realiza en poblaciones de hembras anidantes en las playas y también en poblaciones de juveniles y adultos en las áreas de forrajeo y

reproducción en el océano. Actividades antrópicas sumadas a la dinámica oceanográfica de las costas son las principales causas del riesgo de extinción en el que se encuentra actualmente esta especie marina (IUCN, 2014).

Los haplotipos son secuencias nucleotídicas que representan la versión de un alelo (The international HapMap Consortium, 2003). En tortugas marinas los haplotipos mitocondriales (ADNmt) han sido de mucha utilidad en la identificación de colonias anidantes y su relación con zonas de forrajeo. Estas colonias han sido definidas por uno o más cambios en un par de bases nucleotídicas de las secuencias obtenidas por secuenciación automática. De forma histórica, los

primeros haplotipos para la tortuga cabezona estaban definidos como perfiles de restricción, en los cuales el ADNmt era reconocido y cortado con endonucleasas; estos perfiles variaban entre poblaciones y fueron de utilidad para reconocer haplotipos de diferentes regiones geográficas; sin embargo, al aparecer la secuenciación automática con una resolución mucho mayor a la de los marcadores RFLP aumentó el número de haplotipos y la precisión de los mismos (Bowen et al., 2004).

Los marcadores genéticos heredados por línea materna (ADNmt) han revelado una fuerte estructura poblacional entre colonias anidantes de *C. caretta* (Bowen & Karl 2007; Bowen et al., 2004). Las diferentes poblaciones de hembras adultas están caracterizadas por la presencia de uno o más haplotipos con una alta frecuencia que permite asociar a estos individuos con ciertas regiones geográficas y, por lo tanto, es posible distinguir a las hembras de cada una de estas poblaciones teniendo en cuenta la información de los linajes maternos obtenido de los marcadores mitocondriales (Hatase et al., 2002; Nobetsu, Minami, Matsunaga, Kiyota & Yokota, 2004).

Los análisis más completos basados en la variabilidad de la región control (D-loop) de colonias anidantes de *C. caretta* se han realizado en Brasil (Reis et al. 2009), en el sudeste de Estados Unidos (Francisco, Bass & Bowen, 1999), en el Atlántico-Mediterráneo (Encalada et al., 1998) y el Pacífico (FitzSimmons et al., 1996; Hatase et al., 2002; Nobetsu et al., 2004). También se han realizado estudios con haplotipos mitocondriales en donde se describen aspectos importantes de la filogeografía de *C. caretta* y su filopatría (natal homing) en las principales playas de anidación en el norte y sur de la Florida (E. U. A.), Yucatán (México), Brasil, Islas Azores y Madeira (Portugal), Grecia, Japón y Australia; como también, estudios de linajes maternos en el Atlántico y el Pacífico (Bowen & Karl, 2007; Bowen et al., 2004; Eckert et al., 2000).

Las poblaciones de *C. caretta* presentes en zonas de forrajeo oceánicas y neríticas también han sido evaluadas con el fin de conocer la estructura genética utilizando marcadores mitocondriales; estas evaluaciones se han realizado en agregaciones presentes en el Mediterráneo y en las Islas oceánicas del Atlántico Norte (Carreras et al., 2006; Casale, Freggi, Gratton, Argano & Oliverio, 2008; Maffucci, Kooistra & Bentivegna, 2006), sudeste de Estados Unidos (Bass, Epperly & Braun-McNeill, 2004; Reece, Ehrhart & Parkinson, 2006; Roberts et al. 2005; Witzell, Bass, Bresette, Singewald & Gorham, 2002) y el Caribe (Engstrom, Meylan & Meylan, 2002). Para este análisis se ha utilizado la técnica análisis de stock mixto (MSA) que utiliza las frecuencias haplotípicas

de colonias anidantes cercanas a estas zonas de forrajeo, y realiza una comparación entre estas, para determinar si los individuos que se encuentran en las zonas de alimentación comparten haplotipos con las poblaciones anidantes cercanas.

En el Caribe colombiano, los estudios en esta especie se han enfocado en el análisis demográfico y morfométrico de las hembras, cuantificación de las nidadas y dinámica costera de las playas de anidación, entre otros (Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial 2002). No existen registros de estudios genéticos ni moleculares en esta especie para la región; por lo tanto, es necesario promover la generación de información que revele la estructura poblacional de esta especie y apoye las medidas de conservación pertinentes.

El objetivo de esta investigación fue identificar algunos de los haplotipos presentes en el Caribe colombiano y proponer hipótesis sobre la relación de una muestra de individuos de *C. caretta* que utilizan playas como zona de alimentación en San Martín de Pajarales (Bolívar) y anidación en Don Diego (Magdalena) con otras colonias del Atlántico y del Mediterráneo. Se discuten rutas migratorias, patrón filogeográfico y la filopatría al sitio natal (natal homing). Se identificó un nuevo haplotipo en el mundo. Este es el primer trabajo en Colombia en donde se describen haplotipos mitocondriales de *C. caretta* y se resalta el carácter de modelo debido al bajo número de individuos utilizados en la presente investigación. Esta información puede servir de línea base para futuros estudios de estructura genética poblacional de la tortuga cabezona en el Caribe colombiano.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Se recolectaron ocho muestras de sangre periférica de individuos de la especie *C. caretta* en buen estado de salud (buena movilidad y sin anomalías físicas evidentes), presentes en dos zonas del Caribe colombiano que corresponden a la playa de anidación Don Diego en el departamento del Magdalena (11° 16' N, 73° 45' O) y la Isla San Martín de Pajarales (10° 11' N, 75° 47' O), Parque Nacional Corales del Rosario y San Bernardo en el departamento de Bolívar (figura 1). Las alícuotas de sangre fueron extraídas de la región dorsal del seno cervical de juveniles y adultos de acuerdo con la metodología descrita previamente (Dutton, 1996), e inmediatamente después de su obtención, las muestras fueron colocadas en tubos con Tris-EDTA buffer para evitar la coagulación. Las muestras se transportaron en neveras de icopor con geles refrigerantes hasta el Laboratorio de

Biología Molecular de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (sede Bogotá) y se guardaron a 4° C para su preservación antes de los análisis. Se obtuvo información haplotípica de colonias de anidación y zonas de alimentación previamente descritas para

C. caretta al nivel global en publicaciones y bases de datos especializadas (GenBank y el Centro de Conservación de Tortugas Marinas de la Universidad de la Florida, E. U. A.).

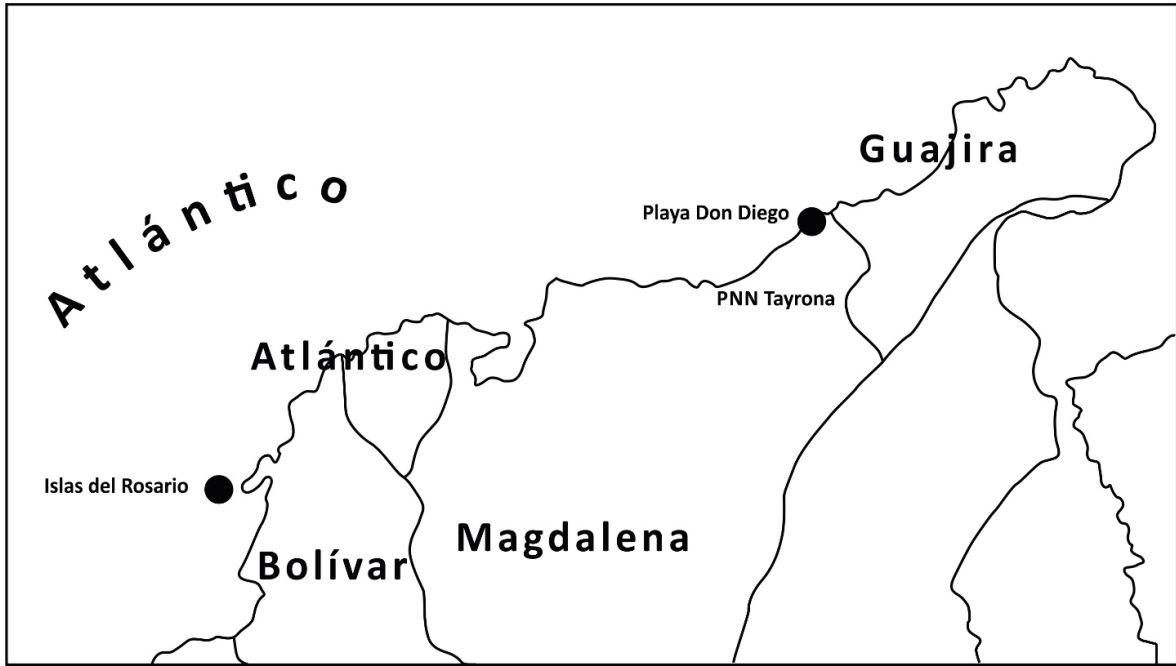


Figura 1. Zona muestreada para tortugas cabezonas, *Caretta caretta* (Linnaeus 1758), presentes en el Caribe colombiano. A. Playa de anidación Don Diego (11° 16' N, 73° 45' O), ubicada en el departamento del Magdalena; B. Zona de alimentación, Isla San Martín de Pajarales (10° 11' N, 75° 47' O) ubicada en el Parque Natural Corales del Rosario y San Bernardo (PNNCRSB), departamento de Bolívar.

Fuente: Modificado de IGAC (2012)

Extracción de ADN. La extracción de ADN total de los individuos se realizó utilizando el Kit comercial UltraClean™ Tejidos y Células de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial fabricante (MO BIO Laboratories Inc, California, E. U. A.). El ADN se reveló después de una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio (2 µg / ml). El gel se fotografió empleando el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System, y se analizó con el programa VisionWorks LS Image Acquisition and Analysis Software (UVP Upland, E. U. A.). Seguidamente, se determinó la concentración del ADN con el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer y se registró con el programa ND-1000 v3.7.1 (Thermoscientific Denver, E. U. A.).

Amplificación de la región control (D-loop) por PCR. Para la amplificación de la región control

(D-loop) se utilizaron los oligonucleótidos TCR-5 (5'- TTGTACATCTACTTATTTACCAC-3') y TCR-6 (5'-GTACGTACAAGTAAACTACCGTATGCC-3') publicados previamente (Norman, Moritz & Limpus, 1994). La reacción de PCR se realizó en un termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Madison, E. U. A.) en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción incluyó: 1 X tampón de PCR (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8 a 25 °C], 0,1 % Tween-20) (Bioline, E. U. A.) 2,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de dNTP's, 0,4 µM de oligonucleótidos, 92,7 ng de ADN y 2,5 U de Taq polimerasa. La reacción consistió en una desnaturalización inicial de 1 min a 94 °C, seguido por 25 ciclos de 94 °C por 45 s, 52 °C por 30 s, 72 °C por 45 s y una extensión final de 72 °C por 2 min (Bass, Clinton &, Bowen, 1998).

Para la determinación de la calidad de los productos de PCR, se mezclaron 2 µl del producto amplificado por PCR con 2 µl de solución tampón de carga (glicerol 30 % y azul de bromofenol 0,0 5% w/v) y se sirvió en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Se realizó la electroforesis con TBE 0,5 X a 100 V. Se verificó la amplificación de la región control mediante la presencia de una banda única de ~380 pb mediante comparación con el marcador de peso molecular Hyperladder II (Bioline Inc., California, E. U. A.) y el análisis con el programa VisionWorks LS (aplicación 1 D Analysis Plugin). El registro fotográfico se realizó con el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System (UVP Upland, E. U. A.).

Purificación de los productos de PCR. Los productos amplificados fueron purificados utilizando el kit comercial Axyprep™ DNA Gel Extraction (Axigen Scientific Inc., California, E. U. A.). Como paso previo al protocolo de purificación, se realizó una electroforesis con las mismas condiciones a la realizada para la verificación de la amplificación de PCR, pero en este caso se utilizó todo el producto de PCR (~ 23 µl). Posteriormente, se cortaron los fragmentos amplificados del gel de agarosa y se purificaron de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial fabricante del kit.

Secuenciación automática. Veinticinco µl de cada uno de los ocho productos de PCR purificados previamente fueron secuenciados. La secuenciación consistió en una amplificación bajo condiciones de termociclado tipo BigDye™, empleando un secuenciador automático 3730XL (Applied Biosystem).

Inferencia filogenética. Las secuencias obtenidas del D-loop de *C. caretta* fueron ensambladas utilizando el programa CLC DNA Workbench (CLC Bio, Dinamarca). Se realizó un alineamiento de las secuencias utilizando la herramienta BLAST-Alineamiento Básico Local de Secuencias (NCBI, National Center for Biotechnology Information). En este estudio se utilizó esta herramienta para identificar los haplotipos de cada uno de los individuos analizados por comparación con otras secuencias descritas previamente para *C. caretta* en el Atlántico y el Mediterráneo. Para el análisis se tuvieron en cuenta los porcentajes de similitud y el árbol de distancia, según el criterio de Neighbor-Joining (vecino más cercano).

Se realizó un alineamiento múltiple de los haplotipos de *C. caretta* descritos en el Atlántico y en el Mediterráneo utilizando los programas BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0 (Hall 1999) y ClustalW (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) (Thompson, Higgins & Gibson, 1994) (N = 65). Estas

secuencias se encontraban consignadas en bases de datos especializadas (GeneBank y el Centro Archie Carr para la conservación de tortugas marinas de Universidad de la Florida, E. U. A.). Se incluyó el D-loop de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) como grupo externo.

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando los programas PAUP 3.0 (Swofford & Berlocher, 1987) y Cipress 2.0 (Ciberinfraestructura para investigación filogenética [www.phylo.org]). En el primero de ellos se empleó la metodología de máxima parsimonia (MP) donde el número total de cambios evolutivos L sobre un árbol es simplemente la suma de cambios de estados de carácter li (p. ej. sustituciones) de cada sitio variable, teniendo en cuenta la siguiente fórmula (Ecuación 1):

$$k \\ L = \sum li \\ i = 1$$

El árbol consenso de MP se obtuvo según el criterio MAJRULE 50 % (Consenso mayoritario) que permite encontrar grupos en cierto porcentaje de árboles en conflicto, a diferencia de otros criterios como el estricto. Frecuentemente el porcentaje fijado para el consenso mayoritario es del 50 %; por lo tanto, este consenso retendrá grupos que se encuentran en más de la mitad de los árboles en conflicto (Swofford & Berlocher, 1987).

Se obtuvo la aplicación RaxML, máxima verosimilitud (ML) utilizando el programa Cipress 2.0 (Stamatakis, Ott & Ludwig, 2005) teniendo en cuenta los parámetros del modelo de sustitución nucleotídica TrN+G (Tamura-Nei + Gamma) obtenido del programa jModeltest (Posada, 2008), y la filogenia T, generados de acuerdo con una distribución conocida previamente según a la siguiente fórmula (Ecuación 2):

$$P(D/T) = \int P(D/T, \theta) d\Phi(\theta/T) (2)$$

Para el soporte estadístico en las redes de MP y ML se aplicó el análisis de bootstrap, utilizando para MP 100 réplicas y para ML 1.000 réplicas.

Resultados

EIADN genómico obtenido a partir de tejido sanguíneo de individuos de *C. caretta* fue de buena calidad, registrando concentraciones entre 19,15 ± 0,86 y

203 ± 0,79 ng /µl. Se obtuvieron amplificaciones con buena concentración evidenciada por la intensidad en las bandas del gel de agarosa con el peso esperado

para la región control (398,67 ± 10,14 pb) en los ocho individuos de *C. caretta* evaluados (figura 2).

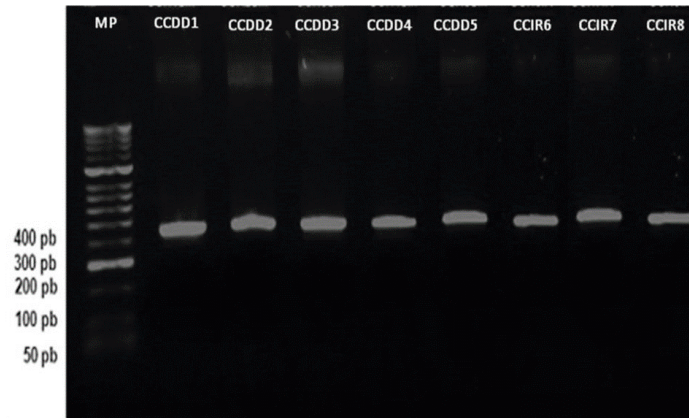


Figura 2. Productos de amplificación por PCR de la región de control (D-loop mitocondrial) de ocho muestras de ADN de la *Caretta caretta* (Linnaeus 1758), presentes en el Caribe colombiano. Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.

Fuente: Franco & Hernández (2015)

Identificación haplotípica por secuenciación directa. A partir de las secuencias de la región control obtenidas de los ocho individuos evaluados, se identificaron 2 haplotipos descritos previamente para el Atlántico: CC-A1 (N = 4), presentes en colonias anidantes de América del Norte, Carolina del Sur, Georgia y Florida NE (E. U. A.) con frecuencias muy altas (> 80%) y CC-A2 (N = 3) correspondientes a colonias de anidación del sur de la Florida, Quintana Roo (México) y Cuba, donde es el haplotipo más común (Ruiz-Urquiola et al., 2010). Se identificó un nuevo haplotipo CC-

SM1 en un individuo anidante de la playa Don Diego (Magdalena), Caribe colombiano. Esta secuencia fue comparada con todas las descritas para *C. caretta* en la base de datos GenBank (BLAST) y se observó una similitud mayor al 90 % con el haplotipo CC-A1; las diferencias consistieron en 7 inserciones presentes en la secuencia del posible nuevo haplotipo (figura 3). Se evidenció la cercanía de otras secuencias muy parecidas a CC-A1 (CC-A21, CC-A22 y CC-A17) que se diferencian de esta, en una sola posición nucleotídica.

```

CCA1 ----- TAGCATATGATCAGTAATGTTGTCGATTAATTG
CCSM1 TTATTTGTTCTTCTTATTACCCTAGCATATGATCAGTAATGTTGTCGATTAATTG
*****
CCA1 GCTTTAAACATAAAAATTTAATTTACATAAACTGTTTAGTTAC-ATGACTATTAT
CCSM1 GCTTTAAACATAAAAATTTAATTTACATAAACTGTTTAGTTACATGACTATTAT
*****
CCA1 AC-AGGTAATAAGAATGAAATGATATAGGACATAAAATTAACC-ATTATTCTCAACC-A
CCSM1 ACAGGTAATAAGAATGAAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATTCTCAACC
** ***** *
CCA1 TGAATATCGTCGC-AGTAATAGGTTATTTCTTAGTTTCAGCTCATCACGAGAAATAAGCAA
CCSM1 TGAATATCGTCGCATGTAATAGGTTATTTCTTAGTTTCAGCTCATCACGAGAAATAAGCAA
*****
CCA1 CCCTGTTAGTAAGATACAAC-ATTACCAGTTTCAGGCC-ATTAAGTCATATCGTACAT
CCSM1 CCCTGTTAGTAAGATACAACIATTACCAGTTTCAGGCCATTAAAGTCATATCGTACAT
*****
CCA1 AACTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTTTTTCAGGCACATTAAGATAATAAAGTTCACT
CCSM1 AACTGATCTATTCTGGCCTCTGGTTGTTTTTCAGGCACATTAAGATAATAAAGTTCACT
*****
CCA1 CGTTCCTTTAAAAGGCCTCTGGTTAAATGAGTTCTATACATTA
CCSM1 CGTTC-----
*****

```

Figura 3. Alineamiento de las secuencias CCA1 [haplotipo común en poblaciones de *Caretta caretta* (Linnaeus 1758), presentes en el Caribe colombiano] y CCSM1 (posible nuevo haplotipo para el Caribe colombiano) utilizando la aplicación CLUSTALW (Thompson et al. 1994) Se observan siete cambios nucleotídicos subrayados y señalados como espacios en blanco en la secuencia CCSM1.

Fuente: Franco & Hernández (2015)

Se obtuvieron árboles consenso usando los criterios de máxima verosimilitud y máxima parsimonia (figuras 4 A y 4 B), que muestran agrupaciones de las poblaciones de *C. caretta* muy similares. Para la reconstrucción filogenética por MP se tuvieron en cuenta 388 caracteres en total, de los cuales 288 fueron constantes, 62 variables no informativos y 38 informativos. El árbol se construyó luego de 145 pasos evolutivos, mostrando un índice de retención (RI) del 92,87 %, el cual representa la cantidad de caracteres derivados compartidos (Swofford & Berlocher, 1987).

En la filogenia generada, las secuencias haplotípicas de la agregación anidante, playa Don Diego (N = 5) se asociaron con otras colonias anidantes del sur de la Florida (E. U. A.), México (CC-A1, CC-A11) y Grecia (CC-A27, CC-A47) (Fig. 4 A y 4 B). Los individuos de la agregación de la zona de forrajeo, playas de Islas del Rosario (N = 3) se asociaron con haplotipos de zonas de forrajeo del Atlántico norte, Mediterráneo (España e Italia), así como con colonias anidantes del norte de la Florida (CC-A2), Carolina del Norte y Georgia (E. U. A.) (CC-A3, CC-A4, CC-A5, CC-A7) y México (CC-A8, CC-A9) (figura 4 B).

Discusión

Tortugas *C. caretta* anidantes de la playa Don Diego y forrajeadores de Islas del Rosario presentes en el Caribe colombiano pueden, al parecer, hacer parte de una metapoblación del Atlántico Norte (Florida N. E., Carolina del Sur, Georgia - E. U. A., y Quintana Roo en México). Los haplotipos CC-A1 y CC-A2 fueron los más observados en zonas de alimentación y anidación, pero estos individuos pueden estar recibiendo aportes en menor proporción por haplotipos poco comunes o desconocidos. A esto, están asociados tres haplotipos denominados CC-33, CC-35 y CC-58, los cuales están descritos como secuencias huérfanas en la base de datos del Centro de Investigación de Tortugas Marinas Archie Carr (ACCSTR), pero su origen es desconocido (Reis et al., 2009).

Los haplotipos CC-A1 y CC-A2 también se han encontrado con alta frecuencia en zonas de alimentación del Mediterráneo donde aproximadamente el 50 % de juveniles en etapa oceánica pertenecen a colonias del Atlántico Norte (Florida, E. U. A.) (Encalada et al., 1998). También se evaluaron poblaciones del Atlántico, presentes en cuatro playas de anidación en Brasil, y una zona de alimentación oceánica; además, se describen individuos con los haplotipos CC-A1 y CC-A2 en la agregación de forrajeo conocida como Elevação do Rio Grande (Reis et al., 2009).

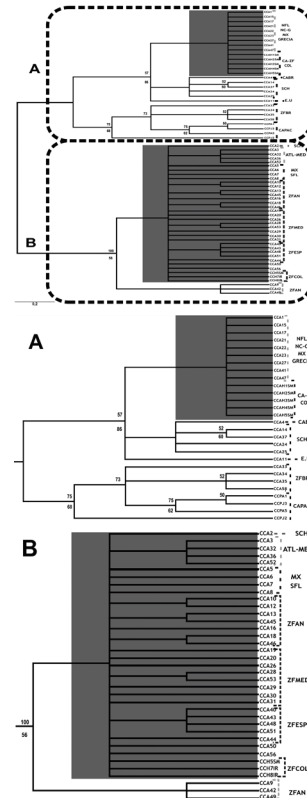


Figura 4. Árbol consenso obtenido con el método de máxima parsimonia (MP; A) y máxima verosimilitud (ML; B) de individuos de la especie *Caretta caretta* presentes en el Caribe colombiano. Se muestra la relación de la agregación anidante del Caribe colombiano con otras poblaciones importantes del Atlántico y del Mediterráneo. A. Valores del bootstrap del árbol consenso obtenido con el método de máxima parsimonia (MP) de individuos de la especie *Caretta caretta*. Se indica la procedencia de los haplotipos mediante las siguientes abreviaturas: NFL, CAN, GEO y MEX [respectivamente, norte de la Florida, Carolina del Norte y Georgia (E. U. A.), México]; COL MIX (haplotipos de colonias anidantes y zona de forrajeo en este estudio, Colombia); BRA (haplotipos de poblaciones de Brasil); DES (secuencias desconocidas o huérfanas) y E. U. A. (Estados Unidos). B. Los valores del bootstrap del árbol consenso obtenido con el método de máxima verosimilitud (ML) de individuos de la especie tortuga cabezona, *Caretta caretta*. Se indica la procedencia de los haplotipos mediante las siguientes abreviaturas: AN-MED (haplotipos de colonias de Atlántico Norte y Mediterráneo); MEXSFL [respectivamente, México, sur de la Florida (E. U. A.)]; ESP (España); COL (haplotipos este estudio, Colombia).

Fuente: Franco & Hernández (2015).

Estudios como la telemetría satelital (Cejudo et al., 2006) y datos de marcaje-recaptura (Avens, Braun-McNeill, Epperly & Lohmann, 2003, Hopkins-Murphy, Owens & Murphy, 2003) han demostrado que los juveniles de la tortuga cabezona efectivamente realizan largas migraciones desde sus playas natales en la costa sudeste de Norteamérica hacia hábitats oceánicos del Atlántico norte en Portugal (Azores y Madeira) y España (Islas Canarias).

Teniendo en cuenta estos antecedentes podemos sugerir, como posible explicación a la presencia de los haplotipos CC-A1 y CC-A2 en el Caribe colombiano, que las colonias más pequeñas como las de la playa Don Diego e Islas del Rosario en Colombia reciben aportes de estos grandes stocks del Atlántico norte, las cuales representan el 90 % del esfuerzo reproductivo de esta especie con 50.000-70.000 nidos por año (Meylan, Schroeder & Mosier, 1995).

Adicionalmente, las corrientes marinas del Caribe, Golfo y Giro del Atlántico norte han ayudado a estos procesos de dispersión de la tortuga cabezona en la zona de estudio. Los juveniles de *C. caretta* tienen dos fases: una oceánica, donde abandonan la playa donde nacieron y viajan al Atlántico oriental (Portugal y España), para luego cambiar a una fase nerítica (alimentación bentónica) en aguas someras del Atlántico occidental, donde una vez alcanzada la madurez sexual las hembras inician las migraciones reproductivas hacia su playa natal. Estos patrones de circulación oceánica podrían ser responsables de la colonización de playas pequeñas y zonas de forrajeo menores por parte de individuos provenientes de agregaciones más abundantes (sur de Florida, E. U. A.). También pueden recibir aportes de agregaciones pequeñas como México e islas del Caribe como Cuba, donde los haplotipos CC-A1 y CC-A2 son los más comunes (Norman et al., 1994).

El registro de un nuevo haplotipo (CC-SM1) para el Caribe colombiano, representado por un individuo de la playa Don Diego (Magdalena), puede considerarse como indicador de una población local aislada, debido a que esta playa mantiene su forma y estructura en condiciones aptas para la anidación de las tortugas marinas (MAVDT 2002). Este hecho ha sido explicado por la teoría de natal homing y facilitación social (Carr, 1967; Hendrickson, 1958), la cual plantea que las hembras de tortugas marinas migran a su playa natal una vez alcanzan la madurez sexual para aparearse y anidar. Sin embargo, este comportamiento también se ha observado en juveniles, los cuales regresan a hábitats de alimentación cercanos a su playa natal cuando cambian de hábitos alimenticios oceánicos a costeros, pero su estructura poblacional es mucho más débil que en poblaciones adultas. Como consecuencia del comportamiento de natal homing

mediado por las hembras, la mayoría de poblaciones anidantes se distingue por diferencias fijas en las frecuencias de haplotipos mitocondriales; esto implica que unidades reproductivas genéticamente distantes son demográficamente independientes (Bolten et al., 1998; Bowen & Karl, 2007; Encalada et al., 1998; Reece et al., 2006).

Es posible que la aparición de este nuevo haplotipo se deba a otros eventos evolutivos, como mutaciones espontáneas sin implicación de aislamiento demográfico. Para comprobar estas hipótesis es necesario realizar un estudio extensivo de esta población con un número de muestra mayor.

En caracterizaciones de poblaciones genéticas previas de *C. caretta* se han descrito haplotipos nuevos con frecuencias menores al 1 %, como CC-A18 y CC-A19 en el Caribe, muy similar al haplotipo CC-A2 (Bass et al., 2004; Engstrom et al., 2002). Asimismo, se identificaron los haplotipos CC-A27, CC-A32, CC-A50, CC-A35 también con frecuencias muy bajas (Casale et al., 2008). Estos haplotipos nuevos han sido descritos con diferencias en un solo par de bases nucleotídicas; por ejemplo, en dos haplotipos desconocidos descritos en una zona de alimentación en Italia, el CC-A31 difiere del altamente frecuente CC-A2 en una sola transición en la posición 210, y el CC-A32 difiere de CC-A3 en un solo cambio (indel) en la posición 319, y fueron encontrados en un solo individuo cada uno.

Adicionalmente, el anidamiento en otras playas del Atlántico en la costa Caribe de Centroamérica, Cuba, Jamaica, Puerto Rico puede estar contribuyendo a las zonas de alimentación en el Caribe colombiano, por lo que se hace necesario extender el muestreo y evaluación de playas de anidación lo cual permitirá identificar el origen de tortugas que poseen este nuevo haplotipo y determinar si las playas pequeñas contribuyen de alguna manera a las áreas de alimentación del Caribe (Encalada et al., 1998).

En conclusión, el posible origen de los individuos caracterizados en este estudio puede haber sido el resultado de eventos de colonización reciente a partir de súper-agregaciones como las presentes en E. U. A. (Bowen & Karl, 2007), ayudados por el fuerte comportamiento migratorio de la especie y las corrientes marinas del Caribe, Golfo y Giro del Atlántico Norte. No se descarta que puedan estar recibiendo aportes de colonias pequeñas del Caribe y el mar Mediterráneo. La presencia de un nuevo haplotipo para la tortuga cabezona en el Caribe colombiano puede ser considerada como un indicio de la teoría de natal homing y facilitación social, pero también de procesos como la mutación.

Agradecimientos

Agradecemos a la profesora Aminta Jauregui de la UJTL sede Santa Marta, al capitán Francisco Ospina Navia (q. e. p. d.), propietario del Acuario y Museo del Mar El Rodadero en la ciudad de Santa Marta y a Rafael Vieira, propietario del Oceanario CEINER en la Isla San Martín de Pajarales (PNNCRSB) por su colaboración logística y facilitación de las muestras de sangre de adultos y juveniles de la tortuga cabazona *C. caretta* para el desarrollo de esta investigación. Este estudio se desarrolló bajo los permisos de investigación concedidos por el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial (N.º 24, de 22 de junio de 2012) y el Contrato de Acceso a los Recursos Genéticos (N.º 64, de 23 de abril de 2013).

Financiación

Este estudio fue financiado por la Dirección de Investigación, Creatividad e Innovación de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

Conflictos de intereses

Los autores no presentan conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Avens, L.; Braun-McNeill, J.; Epperly, S. & Lohmann, K. J. (2003). Site fidelity and homing behavior in juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Marine Biology*, 143(2), 211-220.
- Bass, A. L., Epperly, S. P. & Braun-McNeill, J. (2004). Multi-year analysis of stock composition of a loggerhead turtle (*Caretta caretta*) foraging habitat using maximum likelihood and Bayesian methods. *Conservation Genetics*, 5(6), 783-796.
- Bass, A., Clinton, M. & Bowen, B. W. (1998). Loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in Florida Bay: An assessment of origin based on genetic markers. Department of Fisheries and Aquatic Sciences.
- Bolten, A. B.; Bjorndal, K. A.; Martins, H. R.; Dellinger, T.; Bischoff, M. J.; Encalada, S. E. & Bowen, B. W. (1998). Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecological Applications*, 8(1), 1-7.
- Bowen, B. W. & Karl, S. A. (2007). Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology*, 16(23), 4886-4907.
- Bowen, B. W.; Bass, A. L.; CHOW, S. M.; Bostrom, M.; Bjorndal, K. A.; Bolten, A. B. & Dutton, P. H. (2004). Natal homing in juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology*, 13(12), 3797-3808.
- Carr, A. (1967). *So Excellent a Fish: A Natural History of Sea Turtles*. N. Y.: Scribner, 248 pp.
- Carreras, C.; Pont, S.; Maffucci, F.; Pascual, M.; Barcelo, A.; Bentivegna, F. & Aguilar, A. (2006). Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns. *Marine Biology*, 149(5), 1269-1279.
- Casale, P.; Freggi, D.; Gratton, P.; Argano, R. & Oliverio, M. (2008). Mitochondrial DNA reveals regional and interregional importance of the central Mediterranean African shelf for loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Scientia Marina*, 72(3), 541-548.
- Cejudo, D.; Varo-Cruz, N.; Liria, A.; Castillo, J. J.; Bellido, J. J. & López-Jurado, L. F. (2006). Transatlantic migration of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta* L.) from the Strait of Gibraltar. *Mar Turtle News*, 114, 9-11.
- Eckert, K. L.; Bjorndal, K. A.; Abreu-Grobois, F. A.; & Donnelly, M. (2000). Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas. Grupo especialista en tortugas marinas UICN/CSE Publicación, 4.
- Encalada, S. E.; Bjorndal, K. A.; Bolten, A. B.; Zurita, J. C.; Schroeder, B.; Possardt, E. & Bowen, B. W. (1998). Population structure of loggerhead turtle (*Carettacaretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Marine Biology*, 130(4), 567-575.
- Engstrom, T. N.; Meylan, P. A. & Meylan, A. B. (2002). Origin of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in a tropical developmental habitat in Caribbean Panama. *Animal Conservation*, 5(02), 125-133.
- FitzSimmons, N. N.; Moritz, C.; Limpus, C. J.; Miller, J. D.; Parmenter, C. J. & Prince, R. (1996). Comparative genetic structure of green, loggerhead, and flatback populations in Australia based on variable mtDNA and nDNA regions. In *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle*

- Conservation Genetics. Miami, Florida: NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-396 (pp. 25-32).
- Francisco, A. M.; Bass, A. L. & Bowen, B. W. (1999). Genetic characterization of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) nesting in Volusia County. Unpublished report. Department of Fisheries and Aquatic Sciences, University of Florida, Gainesville.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In Nucleic acids symposium series (Vol. 41, pp. 95-98).
- Hatase, H.; Kinoshita, M.; Bando, T.; Kamezaki, N.; Sato, K.; Matsuzawa, Y. & Sakamoto, W. (2002). Population structure of loggerhead turtles, *Caretta caretta*, nesting in Japan: bottlenecks on the Pacific population. *Marine Biology*, 141(2), 299-305.
- Hendrickson, J. R. (1958). The green sea turtle, *Chelonia mydas* (Linn.) in Malaya and Sarawak. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 130(4), 455-535).
- Hopkins-Murphy, S. R.; Owens, D. W. & Murphy, T. M. (2003). Ecology of immature loggerheads on foraging grounds and adults in interesting habitat in the eastern United States. *Loggerhead sea turtles*, 1, 79-92.
- Hutson, A. M.; Spitzenberger, F.; Aulagnier, S.; Coroiu, I.; Karataş, A.; Juste, J. & Benda, P. (2008). The THE IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. Disponible en <www.iucnredlist.org>
- Maffucci, F.; Kooistra, W. H. & Bentivegna, F. (2006). Natal origin of loggerhead turtles, *Caretta caretta*, in the neritic habitat off the Italian coasts, Central Mediterranean. *Biological Conservation*, 127(2), 183-189.
- Meylan, A. B.; Schroeder, B. A. & Mosier, A. (1995). Sea turtle nesting activity in the state of Florida, 1979-1992. Florida marine research publications (USA).
- Nobetsu, T.; Minami, H.; Matsunaga, H.; Kiyota, M. & Yokota, K. (2004). Nesting and post-nesting studies of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) at Omaezaki, Japan.
- Norman, J. A.; Moritz, C. & Limpus, C. J. (1994). Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Molecular Ecology*, 3(4), 363-373.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-1256.
- Reece, J. S.; Ehrhart, L. M.; & Parkinson, C. L. (2006). Mixed stock analysis of juvenile loggerheads (*Caretta caretta*) in Indian River Lagoon, Florida: implications for conservation planning. *Conservation Genetics*, 7(3), 345-352.
- Reis, E. C.; Soares, L. S.; Vargas, S. M.; Santos, F. R.; Young, R. J.; Bjorndal, K. A. & Lôbo-Hajdu, G. (2010). Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conservation Genetics*, 11(4), 1467-1477.
- Roberts, M. A.; Anderson, C. J.; Stender, B.; Segars, A.; Whittaker, J. D.; Grady, J. M. & Quattro, J. M. (2005). Estimated contribution of Atlantic coastal loggerhead turtle nesting populations to offshore feeding aggregations. *Conservation Genetics*, 6(1), 133-139.
- Ruiz-Urquiola, A.; Riverón-Giró, F. B.; Pérez-Bermúdez, E.; Abreu-Grobois, F. A.; González-Pumariega, M.; James-Petric, B. L. & Espinosa-López, G. (2010). Population genetic structure of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) based on mitochondrial DNA sequences, with an emphasis on rookeries from southwestern Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas*, 31, 33-52.
- Stamatakis, A.; Ott, M. & Ludwig, T. (2005). Raxml-omp: An efficient program for phylogenetic inference on smps. In *Parallel Computing Technologies* (pp. 288-302). Springer Berlin Heidelberg.
- Swofford, D. L. & Olse, S. H. (1990). Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. *Systematic Biology*, 39(1), 41-51.
- Gibbs, R. A.; Belmont, J. W.; Hardenbol, P.; Willis, T. D.; Yu, F.; Yang, H. & Zhang, H. (2003). The international HapMap project. *Nature*, 426(6968), 789-796.

- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Witzell, W. N.; Bass, A. L.; Bresette, M. J.; Singewald, D. A. & Gorham, J. C. (2002). Origin of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) at Hutchinson Island, Florida: evidence from mtDNA markers. *Fishery Bulletin*, 100(3), 624-631.