

**HAPLOTIPOS DE LA TORTUGA CABEZONA *CARETTA CARETTA* (TESTUDINES:
CHELONIIDAE): PRIMER ESTUDIO EN INDIVIDUOS DE LAS PLAYAS DON DIEGO
(MAGDALENA) E ISLA SAN MARTIN DE PAJARALES (BOLIVAR), CARIBE
COLOMBIANO**

CAROLINA FRANCO ESPINOSA

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
2010**

**HAPLOTIPOS DE LA TORTUGA CABEZONA *CARETTA CARETTA* (TESTUDINES:
CHELONIIDAE): PRIMER ESTUDIO EN INDIVIDUOS DE LAS PLAYAS DON DIEGO
(MAGDALENA) E ISLA SAN MARTIN DE PAJARALES (BOLIVAR), CARIBE
COLOMBIANO**

CAROLINA FRANCO ESPINOSA
Artículo Científico para optar al título de
Bióloga Marina

Director
JAVIER HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
Profesor Asociado II
Universidad Jorge Tadeo Lozano

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
2010

HAPLOTIPOS DE LA TORTUGA CABEZONA *CARETTA CARETTA* (TESTUDINES: CHELONIIDAE): PRIMER ESTUDIO EN INDIVIDUOS DE LAS PLAYAS DON DIEGO (MAGDALENA) E ISLA SAN MARTIN DE PAJARALES (BOLIVAR), CARIBE COLOMBIANO

Franco-Espinosa Carolina y Javier Hernández-Fernández

Estudiante-tesista, Biología Marina, Facultad de Ciencias Naturales Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Programa de Biología Marina, "GENBIMOL" Genética, Biología Molecular y Bioinformática, Carrera 4 No. 22-61, Bogotá, Colombia.

Email: carofrancoe@gmail.com

RESUMEN

La tortuga cabezona (*Caretta caretta*) es una especie marina circumtropical, su compleja historia de vida y las actividades antropogénicas han ocasionado la drástica disminución de sus poblaciones y actualmente es una especie en peligro de extinción. Teniendo en cuenta esta problemática y la carencia de información en el Caribe Colombiano se realizó una caracterización haplotípica en individuos de *C. caretta* de dos regiones del Atlántico Colombiano: Playa Don Diego (zona de anidación) e Isla San Martin de Pajarales (zona de alimentación) mediante RFLPs y secuenciación directa. Se amplificó por PCR, la región control (D-loop mitocondrial) y se realizó un análisis de restricción experimental con las enzimas *AluI* y *HpyCH4III*, por otro lado los haplotipos mas comunes para esta zona (CCA1-CCA10) fueron sometidos a un corte *in silico* con estas mismas enzimas, donde *HpyCH4III* generó un patrón específico que permitió desarrollar una metodología para identificar el haplotipo CCA1, uno de los más frecuentes en el Atlántico y Mediterráneo.

El análisis experimental con la endonucleasa *AluI* generó dos perfiles de restricción, el Perfil 1, mostró dos bandas claramente separadas con pesos de 236 y 209 pb (N=3) en tortugas de las dos playas estudiadas, similares a las secuencias descritas para el Sur de la Florida, Brasil y Mediterráneo. El Perfil 2,

mostró dos bandas de 225 y 205 pb similares al patrón generado para poblaciones anidantes del Norte de la Florida (EE.UU.), México y Atlántico Norte. La secuenciación nucleotídica de la región control identificó dos haplotipos: CCA1 y CCA2 descritos para las poblaciones anidantes de México, Mediterráneo y Sudeste de Estados Unidos. Se identificó adicionalmente un nuevo haplotipo CCDD1 (*C. caretta* -Playa Don Diego) con ~90% de similitud con el haplotipo CCA1. Los arboles filogenéticos generados por Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML) muestran una relación de los individuos anidantes y de forrajeo en Colombia con las súper agregaciones del Atlántico y Mediterráneo, sugiriendo que estas puedan ser la fuente de los individuos presentes en Colombia, este hecho pudo haberse presentado a través de eventos de colonización reciente, ayudados por el fuerte comportamiento migratorio de la especie y las corrientes marinas del Golfo, Caribe y Giro Atlántico Norte. La presencia de un nuevo haplotipo en la playa anidante de Don Diego puede ser estar asociados a migraciones reproductivas y de desarrollo (*natal homing*), así como a procesos de microevolución como mutaciones puntuales.

PALABRAS CLAVE: *C. caretta*, ADN mitocondrial, Máxima parsimonia, Región control

**HAPLOTYPES OF THE LOGGERHEAD TURTLE *CARETTA CARETTA*
(TESTUDINES: CHELONIIDAE): FIRST STUDY OF DON DIEGO BEACH
(MAGDALENA) AND SAN MARTIN DE PAJARALES ISLAND (BOLIVAR)
INDIVIDUALS, COLOMBIAN CARIBBEAN**

Loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*), is a circumtropical marine species, its complex life story traits and anthropogenic activities has led to drastic collapse of its populations and is currently considered as an endangered species. Considering this problematic and the lack of information for the Colombian Caribbean, a haplotypic characterization of *C. caretta* individuals was performed in two regions of the Colombian Atlantic; Don Diego beach (nesting beach) and San Martin de Pajarales Island (feeding ground) using RFLPs and direct sequencing. Control region (mitochondrial D-loop) was PCR amplified,

and a restriction analysis was performed using endonucleases *AluI* and *HpyCH4III*, also most common haplotypes reported for this area (CCA1-CCA10) were submitted for an *in silico* analysis with the enzymes *AluI* and *HpyCH4III*, the latter generated a pattern that allowed the development of an identification method for loggerhead turtle haplotype, specifically CCA1 one of the most frequent sequences in Atlantic and Mediterranean sea.

Experimental analysis using *AluI* generated two restriction profiles, Profile 1 displayed two separated bands with molecular weights of 236 and 209 bp (N=3), from nesting and feeding individuals in Colombia, showing similarity to reported sequences from South Florida, Brazil and Mediterranean sea. Furthermore, Profile 2 exhibited two joined bands with 225 and 205 bp molecular weights, resembling the pattern for nesting populations in Northern Florida (U.S.A), Mexico and North Atlantic. Two haplotypes (CCA1 and CCA2) were identified using nucleotidic sequencing, previously described for nesting populations in Mexico, Mediterranean sea, Brazil and Southeast U.S.A.

A new haplotype CCDD1 (*C. caretta* - Don Diego beach) was found, showing ~90% of similarity with reported haplotype CCA1. The Maximum Parsimony (MP) and Maximum Likelihood (ML) phylogenetic trees indicates a relationship of the nesting and feeding individuals of Colombia with Atlantic and Mediterranean sea superaggregations, suggesting that these populations might be the sources for the Colombian loggerhead turtles, through recent events of colonization, assisted by the strong migratory behavior of this species and marine currents such as Gulf Stream, Caribbean and North Atlantic Gyre. The presence of a new haplotype on the Don Diego nesting beach can be a result of the species behavior associated to developmental and breeding migrations (*natal homing*) and also microevolutionary processes like point mutations.

KEYWORDS: *C. caretta*, mitochondrial DNA, Maximum Parsimony, Control region

INTRODUCCIÓN

La tortuga cabezona, *Caretta caretta*, es una especie marina distribuida mundialmente en zonas tropicales y subtropicales, anida en líneas costeras adyacentes a corrientes cálidas y realiza extensas migraciones relacionadas con actividades reproductivas y de alimentación (Eckert *et al.*, 2002). *C. caretta* ha sido explotada para la extracción de alimentos, tales como: aceites, proteína y derivados como: hueso, cuero y concha, estas acciones antrópicas traducidas en saqueos constantes durante las temporadas de cada año, captura de juveniles y adultos en las áreas de forrajeo y reproducción, incluso, eventos naturales como la dinámica oceanográfica de las costas, son las principales causas del riesgo de extinción en el que se encuentra actualmente esta especie marina (IUCN, 2010).

Los haplotipos son secuencias nucleotídicas que representan la versión de un alelo, en tortugas marinas los haplotipos mitocondriales (ADNmt) han sido de mucho utilidad en la identificación de colonias anidantes y su relación con zonas de forrajeo, son definidos por uno o mas SNPs (cambios en un par de bases nucleotídicas). La primera técnica implementada para el análisis de secuencias mitocondriales fue el marcador RFLP'S (Polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción), el cual se refiere a secuencias de nucléotidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción y varían entre individuos, en el caso de *C. caretta* se ha empleado esta herramienta en la identificación parcial de linajes maternos asociados a haplotipos mitocondriales cuando no se cuenta con métodos de mayor resolución como la secuenciación directa (6 veces mayor), además esta técnica sido de gran utilidad en la filogeografía global de la tortuga cabezona ya que permitió generar las primeras hipótesis sobre su historia evolutiva, patrones migratorios y biogeografía teniendo en cuenta información de los linajes maternos (Bowen *et al.* 1994).

Los marcadores genéticos heredados por línea materna (ADN mitocondrial) muestran una fuerte estructura poblacional entre colonias anidantes (Bowen *et al.*, 2005), es decir, que la composición genética de las hembras en edad reproductiva está dada por la presencia de un haplotipo con una alta frecuencia que permite asociar a estos individuos a ciertas zonas de anidación, y por lo tanto estas colonias anidantes van a estar aisladas en términos de linajes maternos (ADNmt) (Bowen and Karl, 2007). Los análisis más completos basados en la variabilidad de la región control de colonias anidantes de *C. caretta* se han realizado en Brasil (Reis *et al.*, 2009), en el Sudeste de Estados Unidos (Francisco *et al.*, 1999), en el Atlántico - Mediterráneo (Encalada *et al.*, 1998) y el Pacífico (FitzSimmons *et al.*, 1996, Nobetsu *et al.*, 2004 y Hatase *et al.*, 2002). También se han realizado estudios con haplotipos mitocondriales en donde se describen aspectos importantes de la filogeografía de *Caretta caretta*, y su filopatría (natal homing), en las principales playas de anidación: Norte Florida- EE.UU., Sur de la Florida-EE.UU., 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 *et al.*, 2004, Bowen and Karl, 2007).

Los estudios de estructura genética (ADNmt) de *C. caretta* en poblaciones presentes en zonas de forrajeo se han llevado a cabo en el Mediterráneo e Islas oceánicas del Atlántico Norte (Casale *et al.*, 2008, Carreras *et al.*, 2006, Maffucci *et al.*, 2006 y Bolten *et al.*, 1998), Sudeste de Estados Unidos (Reece *et al.*, 2006, Roberts *et al.*, 2005, Bass *et al.*, 2004, Witzell *et al.*, 2002 y Bass *et al.*, 1998) y el Caribe (Engstrom *et al.*, 2002) usando la técnica MSA (Análisis de Stock Mixto) que utiliza las frecuencias haplotípicas de colonias anidantes como marcadores genéticos naturales para determinar el origen de las poblaciones en zonas de forrajeo, aunque estas sean mezclas de tortugas de diferentes colonias anidantes. Este análisis reveló una alta frecuencia de las secuencias CCA1 y CCA2 en estas zonas, que indica, aporte en gran medida de las colonias grandes del Atlántico a las zonas neríticas de alimentación para esta especie y en menor proporción de colonias pequeñas representadas por haplotipos poco comunes,

En el Caribe colombiano, los estudios de esta especie han estado dirigidos principalmente a las poblaciones que llegan a las playas de anidación, incluyendo análisis demográfico y morfométrico de las hembras, cuantificación de las nidadas, entre otros (MAVDT, 2002), presentándose una ausencia total de estudios genético-moleculares de la tortuga cabezona, generando así, una fuerte necesidad de complementar el conocimiento de esta especie con información que apoye su conservación en nuestro país. El presente trabajo tuvo como objetivo proponer un modelo para determinar la relación de ocho individuos de *Caretta caretta* que utilizan el Caribe colombiano como zonas de alimentación y anidación en los bajos de Islas del Rosario (Cartagena) y Don Diego (Magdalena) respectivamente, con otras colonias del Atlántico y Mediterráneo. Se proponen hipótesis de rutas migratorias y el patrón filogeográfico, basados en la información de linajes maternos suministrada por haplotipos mitocondriales disponibles a nivel global. Adicionalmente, se buscó evaluar la hipótesis de caracterización genética de *C. caretta* relacionadas con la filopatría al sitio natal (*natal homing*). Se logró la identificación de un nuevo haplotipo a nivel mundial y se propuso una metodología basada en análisis con enzimas de restricción que podría utilizarse como un paso previo a la secuenciación para la identificación de los haplotipos en tortugas de la especie *Caretta caretta* en diferentes regiones geográficas específicas, ya que es una técnica rápida, sencilla y menos costosa que la secuenciación directa y podría ser útil para realizar una aproximación sobre el origen de los haplotipos evaluados. Es importante anotar, que 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, la cual puede considerarse como un paso preliminar para estudios de estructura genética y filogeografía de la tortuga cabezona en el Caribe Colombiano y por lo tanto en este caso no serían representativos de las poblaciones.

AREA DE ESTUDIO

La playa de anidación Don Diego en el departamento del Magdalena (11°16'N y 73°45'W) (Figura 1), se caracteriza por ser de gran amplitud, pudiendo llegar hasta los 70 metros de zona media. La vegetación más notoria son plantas rastreras como *Ipomoea pescapre*, *Canavalia marítima*, uvo de playa (*Coccoloba uvifera*) y en la zona alta algunas palmeras *Coco nucifera* y *Terminalia catappa*. Aunque su dinámica es bastante alta y algunos tramos de playa desaparecen por períodos cortos de tiempo, en general estas playas mantienen su forma y estructura en condiciones aptas para la anidación de las tortugas, en el Departamento del Magdalena (Ceballos *et al.*, 2003). Se obtuvieron muestras de cinco individuos (N=5) provenientes de poblaciones naturales de esta playa (no hay endogamia), los cuales se encuentran actualmente haciendo parte de un proyecto de levante en cautiverio (head-starting) en el Acuario y Museo del Mar El Rodadero (AMM El Rodadero) y luego son liberados cuando alcanzan aproximadamente los dos años de edad.

La segunda zona corresponde a la isla de San Martín de Pajarales- Oceanario CEINER departamento de Bolívar (10° 11' N, 75° 47' W), PNNCRSB (Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo) (Figura 1), en esta isla no hay anidación de tortugas; sin embargo, se observan tortugas en aguas aledañas probablemente alimentándose, desplazándose o simplemente en refugio. Tres especies: *Eretmochelys imbricata*, *Chelonia mydas* y *Caretta caretta* ocurren en baja cantidad. En el pasado eran más abundantes, especialmente las tortugas carey (*E. imbricata*) y cabezona (*C. caretta*). Los bajos donde se avistan tortugas marinas son Tesoro, Tortuga, Isabelito y el Peñón, la especie más avistada es la carey, incluyendo neonatos en parches flotantes de pasto que se mueven con la corriente, juveniles y adultos a veces en cópula, también se observan juveniles y adultos de tortuga verde y cabezona todo el año en particular en los meses de Mayo y Agosto. El fondo de estos bajos es duro, con rocas y corales principalmente, *Montastrea annularis*, *Diploria labyrinthiformis*, *Siderastrea siderea*, *Porites porites*, *Agaricia tenuifolia*, *Millepora complanata*, *Acropora palmata* y *Acropora Cervicornis*; algas de las especies *Dictyota* spp., *Padina* spp., y *Halimeda opuntia*; y peces como Ronco catire (*Haemulon*

sciurus), cirujano (*Acanthurus* spp.), viejita azul (*Thalassoma bifaciatum*), salmonete (*Mulloidichtys martinicus*) peje perro (*Bodianus rufus*), mariposa de cuatro ojos (*Chaetodon capistratus*), loro viejo (*Sparisoma viride*), cofre (*Lactophrys triqueter*), picuda (*Sphyraena barracuda*), y cojinúa (*Caranx* spp.) (Ceballos *et al.*, 2003), en el presente estudio se obtuvieron muestras de tres individuos de *C. caretta* (N=3) provenientes de esta zona de forrajeo.

Se obtuvo información haplotípica de colonias de anidación y zonas de alimentación previamente descritas para *C. caretta* a nivel global en publicaciones y bases de datos (GenBank y ACCSTR) (Figura 2).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Se recolectaron ocho muestras de sangre periférica de individuos de la especie *Caretta 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 y la Isla San Martín de Pajarales, Parque Nacional Corales del Rosario y San Bernardo en el departamento de Bolívar. Las alícuotas de sangre fueron extraídas de la región dorsal del seno cervical de juveniles y adultos de acuerdo a la metodología de Dutton (1996) e inmediatamente después de su obtención fueron colocadas en tubos con Tris-EDTA buffer, (Greiner Bio-one®, Kremsmünster, Austria) para evitar la coagulación de las muestras. 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.

Extracción de ADN

La extracción de ADN total de los individuos se realizó utilizando el Kit comercial UltraClean™ Tejidos y Células de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial fabricante (MO BIO Laboratories, Inc,

California, EE.UU.). 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, EE.UU.). 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, EE.UU.).

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

Para la amplificación de la región control (D-loop) se utilizaron los oligonucleótidos-primers TCR-5 (5'-TTGTACATCTACTTATTACCAC-3') y TCR-6 (5'-GTACGTACAAGTAAACTACCGTATGCC-3') previamente publicados por Norman *et al.* (1994). La reacción de PCR se llevo a cabo en un termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Madison, EE.UU.) en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción incluyó: 1X tampón de PCR (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8.8 a 25°C], 0.1% Tween-20, Bioline, EE.UU.) 2.5 mM de MgCl₂, 0.16 mM de dNTP's, 0.4 µM de oligonucleótidos-primers, 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 seg, 52°C por 30 seg, 72°C por 45 seg y una extensión final de 72°C por 2 min, de acuerdo a las condiciones publicadas previamente por Bass *et al.* (2002).

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 0.05% w/v) y se sirvió en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Se realizó la electroforesis con TBE 0.5X a 100V. 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, EE.UU.) y el análisis con el programa VisionWorks LS (aplicación 1D Analysis Plugin). El registro fotográfico se realizó con el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System (UVP, Upland, EE.UU.).

Purificación de los productos de PCR

Los productos amplificados fueron purificados utilizando el kit comercial AxyprepTM DNA Gel Extraction (Axigen, Scientific, Inc. California, EE.UU.). 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 μ l). Posteriormente se cortaron los fragmentos amplificados del gel de agarosa y se purificaron de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial fabricante del kit.

Análisis *in silico* y experimental del D-loop mitocondrial por RFLPS

Se realizó un análisis *in silico* con las enzimas de restricción *HpyCH4III* y *AluI*, utilizando las secuencias nucleotídicas de los diez haplotipos mas comunes para las poblaciones anidantes y de forrajeo en el Atlántico y el mar Mediterráneo de la tortuga *C. caretta* previamente descritas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y en la base de datos ACCSTR (<http://accstr.ufl.edu>). Para realizar el análisis se utilizó el programa NEBCUTTER v.2.0 (Vincze *et al.*, 2003), el cual permite cortar con enzimas de restricción específicas una región de ADN conocida y seguidamente predice el corrido electroforético mostrando el perfil de bandas producido. Este perfil *in silico* producido fue utilizado para realizar comparaciones con el perfil experimental obtenido.

A los productos de amplificación obtenidos experimentalmente por PCR se les realizó una restricción enzimática con la enzima *AluI* de acuerdo al protocolo propuesto por la casa comercial fabricante (FERMENTAS INC., Maryland, EE.UU.). El producto obtenido se reveló en un gel de agarosa al 2%, registrando las bandas reveladas con el fotodocumentador UVP GelDoc-ItTM System y el programa VisionWorks LS (aplicación 1D Analysis plugin). Por último se comparó la información *in silico* con los patrones obtenidos *in vitro*, teniendo en cuenta el número de bandas generadas y el peso de las mismas.

Secuenciación Automática

Veinticinco μ l de cada uno de los ocho productos de PCR purificados previamente y los primers TCR-5 y TCR-6 (diluidos en agua tipo 1) en una concentración de 60 ng/ μ l fueron enviados a la empresa MACROGEN Inc. (Seúl, Korea) para su secuenciación automática. La secuenciación consistió en una amplificación bajo las condiciones de termociclado tipo BigDye™, empleando un secuenciador automático 3730XL (Applied Biosystem).

Inferencia Filogenética

Las secuencias obtenidas de la región control (D-loop) de *C. caretta* fueron ensambladas y organizadas 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). Esta aplicación hace inferencias evolutivas y funcionales entre secuencias e identifica miembros de familias de genes. En este estudio se utilizó 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 mas cercano) suministrado por esta aplicación.

Las 65 secuencias nucleotídicas de la región control (D-loop) que representan los haplotipos mitocondriales de la tortuga cabeza previamente descritos en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y en la base de datos ACCSTR (<http://accstr.ufl.edu>) para el Atlántico, Mediterráneo, las secuencias del presente estudio y el grupo externo, (tortuga golfinia *Lepidochelys olivacea*), fueron alineadas utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0 (Hall, 1999). Se utilizó también el alineamiento automático ClustalW (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK) (Thompson *et al.*, 1994) para proceder al análisis.

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando los programas PAUP 3.0 (Swofford, 1991) 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:

$$L = \sum_{i=1}^k li$$

El árbol consenso de MP se obtuvo según el criterio MAJRULE 50% (Consenso mayoritario), el cual permite encontrar grupos en cierto porcentaje de arboles 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 arboles en conflicto (Swofford, 1991).

Se determinó la aplicación RaxML (Máxima Verosimilitud) utilizando el programa Cipress 2.0 (Stamatakis *et al.*, 2005) teniendo en cuenta los parámetros del modelo de sustitución nucleotídica TrN+G (Tamura-Nei + Gamma), y la filogenia T generados de acuerdo a una distribución conocida previamente de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Para el soporte estadístico en las redes de MP y ML se utilizó el análisis de bootstrap desarrollado por Felsenstein (1985), utilizando para MP 100 replicas y para ML 1000 replicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ADN genómico extraído a partir de tejido sanguíneo de individuos de *Caretta caretta* en el Caribe Colombiano fué de buena calidad, registrando concentraciones entre $19,15 \pm 0,86$ y $203 \pm 0,79$ ng/ μ l correspondiendo a la muestra CCDD2 el valor más bajo y a CCIR7 el valor más alto (Tabla1). Se obtuvieron amplificaciones claras y de buena concentración de la región control (D-loop) mitocondrial para los ocho individuos de *C. caretta* evaluados con un peso molecular aproximado de $398,67 \pm 10,14$ pares de bases (Figura 3).

Identificación haplotípica

El objetivo de este análisis *in silico* era lograr la identificación de los haplotipos CCA1 y CCA2 de forma específica, ya que son los haplotipos más comunes para el Atlántico y el Mediterráneo correspondiendo a ~90% de secuencias identificadas en estudios en zonas de forrajeo y de anidación (Bowen and Karl, 2007). Las secuencias nucleotídicas que identifican los 10 haplotipos mas comunes para el Atlántico y Mediterráneo, descritas previamente, fueron sometidas a una restricción enzimática con la enzima *HpyCH4III* evidenciándose un patrón electroforético idéntico en los haplotipos CCA2 a CCA10 pero diferente para el haplotipo CCA1 (Fig. 4a), de esta forma se predice, que utilizando la enzima *HpyCH4III* se diferencia tortugas *C. caretta* que tengan haplotipo CCA1 de los otros nueve haplotipos. Seguidamente se realizó la segunda restricción con la enzima *AluI*, produciéndose de nuevo un perfil electroforético único para CCA1, pero en este caso no era posible diferenciar a CCA2 de los haplotipos restantes ya que presentan el mismo perfil electroforético (Fig 4b). En síntesis, el análisis *in silico* predice, que la utilización de la enzima *HpyCH4III* permite identificar el haplotipo CCA1, pero la identificación específica de la secuencia CCA2 no es posible con la utilización de estas enzimas (Figuras 4a y 4b).

El análisis experimental realizado con la enzima *AluI* generó un resultado positivo para 5 de los individuos, en los cuales fueron observados dos perfiles de restricción diferentes. El perfil 1 con dos bandas claramente separadas entre sí (Figura 5a), que registraron pesos de 236 y 209 pb, que corresponden

a individuos provenientes de Don Diego e Islas del Rosario (N=3), los cuales muestran similitud con el perfil de restricción *in silico* de haplotipos descritos en el Sur de la Florida (CCA1), Brasil (CCA4) y Mediterráneo (CC10) (Figura 5b). El perfil 2 exhibió una banda muy gruesa y brillante, posiblemente por la unión de dos bandas con pesos promedios de 225 y 205 pb, agrupando a un individuo de Don Diego y uno de Islas del Rosario, este patrón de bandas fue parecido a los cortes generados *in silico* de haplotipos de poblaciones anidantes de Norte de la Florida, EE.UU. (CCA2, CCA5 y CCA7), México (CCA8 y CCA9) y zonas de forrajeo en el Atlántico Norte (CCA10) (Figura 5a y 5b). Estos resultados muestran una aproximación sobre el origen geográfico de las secuencias del Caribe Colombiano debido a su similitud en el patrón de restricción con colonias anidantes del Caribe y Mediterraneo.

Identificación haplotípica por secuenciación directa

A partir de las secuencias de la región de control obtenidas de los ocho individuos evaluados, se identificaron 2 haplotipos descritos previamente para el Atlántico: CCA1 (50%- N=4) presente en colonias anidantes del Sur Florida (EE.UU), México, Mediterráneo y CCA2 (37,5%- N=3) correspondientes a colonias de anidación del Norte de la Florida, Georgia y Carolina del Sur (EE.UU). Se identificó un nuevo haplotipo CCDD1 (12.5%) (Tabla 2) en un individuo anidador de la playa Don Diego (Magdalena), Caribe Colombiano. Este haplotipo nuevo fue comparado con todas las secuencias descritas para *C. caretta* en la base de datos GenBank (BLAST) observándose una similitud mayor al 90% con el haplotipo CCA1, esta herramienta generó un árbol de distancia de NeighborJoining (vecino mas cercano), este criterio es utilizado para la reconstrucción filogenética basados en secuencias de ADN y proteínas, en este caso nos esta indicando que existe poca distancia genetica entre los alineamientos pareados entre pares de taxa, es decir que las secuencias CCA1, CCA21, CCA22 y CCA17 presentan pocas diferencias nucleotidicas con respecto al haplotipo CCDD1 (uno o dos SNPs), adicionalmente la posicion basal del árbol del haplotipo CCA1 puede estar indicando que esta es la probable secuencia ancestral a partir de la cual se originaron las demás (Figura 6).

Así mismo, se encontró una alta similitud a partir del alineamiento de secuencia múltiple realizado con Clustalw, donde se observan cambios en 7 posiciones (in/del) de un total de 380 pb con respecto al haplotipo CCA1 (Figura 7) (Thompson *et al.*, 1994).

Se obtuvieron árboles consenso usando los criterios de Máxima Verosimilitud (ML-Maximum Likelihood en inglés) y Máxima Parsimonia (MP) (Figura 8), que muestran agrupaciones de las poblaciones de *C. caretta* muy similares, basado en estos resultados, se realizó el análisis filogenético de MP, mostrando en los nodos los valores de bootstrap según los dos criterios (MP y ML). 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, 1991).

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 (EE.UU.), México (CCA1, CCA11) y Grecia (CCA27, CCA47) (Figura 8). 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 algunas secuencias asociadas a colonias anidantes del Norte de la Florida (CCA2) y Carolina del Norte (EE.UU.), Georgia (EE.UU.) (CCA3, CCA4, CCA5, CCA7) y México (CCA8, CCA9) (Figura 8) sugiriendo que los individuos anidantes de la playa Don Diego y forrajeadores de playas de Islas del Rosario presentes en el Caribe Colombiano hacen parte de una metapoblación del Atlántico y Mediterráneo, siendo los haplotipos CCA1 y CCA2 los que aportan más individuos a zonas de alimentación y anidación pequeñas, como las de las playas evaluadas, pero que pueden estar recibiendo aportes en menor proporción de otras poblaciones representadas por haplotipos poco comunes o desconocidos. Es importante resaltar que dentro de este clado están asociados tres haplotipos denominados como **CC33**, **CC35** Y **CC58** los cuales están reportados en la base de datos del

Centro de Investigación Archie Carr (ACCSTR) pero su origen es desconocido, y son denominados como secuencias huérfanas por Reis *et al.*(2009), quien los reporta en individuos presentes en una zona de forrajeo oceánica de *C. caretta* en el Sudeste de Brasil pero argumenta igualmente que desconoce el origen de los mismos.

Este evento ha sido descrito igualmente para zonas de alimentación del Mediterráneo donde aproximadamente el 50% de juveniles en etapa oceánica pertenecen a colonias del Atlántico Norte (Florida, USA) (Encalada *et al.*, 1998), también se ha registrado para zonas de forrajeo en Brasil, donde Reis *et al.* (2009) evaluaron poblaciones del Atlántico presentes en 4 playas de anidación en Brasil (Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia y Sergipe) y una zona de alimentación oceánica, donde se describe la fijación del haplotipo CCA4 para todas las zonas de anidación de esta región, y se describen individuos con los haplotipos CCA1 y CCA2 en la agregación de forrajeo conocida como Elevação do Rio Grande. Adicionalmente otras metodologías como la telemetría satelital (Cejudo *et al.*2006) y datos de marcaje-recaptura (Avens *et al.* 2003, Hopkins-Murphy *et al.* 2003) han demostrado que los juveniles de la tortuga cabezona efectivamente realizan estas migraciones desde su hábitat oceánico que regularmente se encuentra cientos de km de su playa anidante, hacia su región de origen.

Teniendo en cuenta estos antecedentes podemos sugerir, como hipótesis de trabajo, que las colonias más pequeñas como las de la playa Don Diego e Islas del Rosario en Colombia, son aportadas por estos grandes stocks del Atlántico Norte, las cuales representan el 90% del esfuerzo reproductivo de esta especie en el Atlántico, con 50.000-70.000 nidos por año (Meylan *et al.*, 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 esta zona (Figura 9). Los juveniles de *C. caretta* tienen dos fases; una oceánica donde abandonan la playa donde nacieron y viajan al Atlántico oriental (Portugal- Islas Azores y Madeira e Islas Canarias) 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 (Figura 9). Estos patrones de circulación oceánica en las tortugas cabezonas del Atlántico Norte se conoce Giro Atlántico Norte el cual puede explicar como playas pequeñas y zonas de forrajeo menores pueden ser colonizadas por individuos provenientes de agregaciones más abundantes (Sur Florida, SC y NC, EE.UU), pero pueden recibir aportes de agregaciones pequeñas como México e Islas del Caribe. Así mismo, de sitios mas distantes como poblaciones anidantes del Mediterráneo (Grecia, España e Italia) (Figura 9), lo cual probablemente este aportando individuos provenientes de diferentes sectores del Atlántico a las zonas de alimentación y playas de anidación de Colombia.

Nuevo Haplotipo en el Caribe Colombiano

El registro de un haplotipo nuevo para el Caribe Colombiano, representado por un individuo etiquetado como CCDD1 anidante en la Playa Don Diego, (Magdalena) puede deberse a la visita frecuente de hembras a las áreas de alimentación, y las condiciones favorables de esta playa para la anidación (Ceballos *et al.*, 2003), ya que esta playa mantiene su forma y estructura en condiciones aptas para la anidación de las tortugas. Adicionalmente, esta playa se ha caracterizado históricamente por ser de alta anidación, particularmente de la tortuga cabezona, seguido de tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*) y verde (*Chelonia mydas*) (MAVDT, 2002).

Es posible explicar la presencia del nuevo haplotipo como consecuencia de varios factores, en primer lugar podría argumentarse 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 regresean a hábitats de alimentación cercanos a su playa natal cuando cambian de hábitos alimenticios oceánicos a costeros, pero su estructura poblacional es mucho mas debil que en poblaciones adultas(Bowen *et al.* 2005).

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. Aunque esta teoría ha sido ampliamente probada en estudios de poblaciones anidantes de *C. caretta* (Bolten *et al.*, 1998; Encalada *et al.*, 1998; Reece *et al.*, 2005; Bowen y Karl, 2007). Adicionalmente, es posible que la aparición de este nuevo haplotipo se deba a otros eventos evolutivos, como cambios espontáneos de las secuencias (mutación) sin implicación de aislamiento demográfico de la colonia de Don Diego en términos de linajes maternos. Para comprobar estas hipótesis es necesario realizar un estudio extensivo de esta población con un número muestral mayor.

En previas caracterizaciones genéticas de poblaciones de *Caretta caretta* se han descrito haplotipos nuevos con frecuencias menores al 1%, como las secuencias CCA18 y CCA19 en el Caribe, muy similar al haplotipo CCA2 (Bass *et al.*, 2004, Engstrom *et al.*, 2002). Así mismo, se identificaron los haplotipos CCA27-CCA32 (Carreras *et al.*, 2006), CCA50 (Casale *et al.*, 2008), CCA35 (Reece *et al.*, 2006) también con frecuencias muy bajas. Estos haplotipos nuevos han sido reportados con diferencias en un solo par de bases nucleotídicas, por ejemplo dos haplotipos desconocidos reportados en una zona de alimentación en Italia: 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, como es el caso del haplotipo nuevo reportado en este estudio (Mafucci *et al.* 2006). Adicionalmente, a las playas de anidación principales de EE.UU., México y el Mediterráneo, el anidamiento en otras playas del Atlántico en la Costa Caribe de Centroamérica, Cuba, Jamaica, Puerto Rico, pueden 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 anidamiento lo cual permitirá identificar el origen de tortugas que poseen estos nuevos haplotipos y determinar si las playas pequeñas contribuyen de alguna manera a las áreas de alimentación del Caribe (Encalada *et al.*, 1998).

Por último, la proximidad genética del haplotipo CCDD1 con el CCA1 sugiere que la colonización de las agregaciones de la playa Don Diego (Magdalena) puede provenir de las grandes agregaciones del Sudeste de EE.UU., basado en la presencia de estos haplotipos en la mayoría de estudios en el Gran Caribe, Atlántico Norte y Mediterráneo. Como se plantea anteriormente estas son las probables secuencias ancestrales que están generando nuevos haplotipos por eventos de colonización recientes en agregaciones de anidación menores como la presente en la playa de Don Diego en el departamento de Magdalena (Figura 6 y 8).

CONCLUSIONES

El posible origen de la agregación anidante evaluada en el Caribe colombiano, puede haber sido el resultado de eventos de colonización reciente a partir de superagregaciones como las presentes en EE.UU. (Bowen y Karl, 2007), ayudados por el fuerte comportamiento migratorio de la especie y las corrientes marinas del Caribe, Golfo y Giro del Atlántico Norte pero 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 considerado como un indicio de la teoría de *natal homing* y facilitación social, pero también de procesos como la mutación.

Se logró desarrollar una metodología usando RFLP's *in silico* que permite identificar de forma específica uno de los haplotipos más frecuentes en el Atlántico y Mediterráneo (CCA1) con el uso de la enzima de restricción *HpyCH4III*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Capitán ® Francisco Ospina Navia 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 los adultos y juveniles de la tortuga cabezona *Caretta caretta* para el desarrollo de esta investigación. Adicionalmente queremos agradecer la asesoría bioinformática de los investigadores Nelson Manrique y Néstor Ardila del grupo BIOMMAR de la Universidad de los Andes, y finalmente a Maylin Gonzalez del Instituto Humoldt y Jaime

BIBLIOGRAFÍA

- Avens L, Braun-McNeill J, Epperly S, Lohmann KJ (2003) Site fidelity and homing behavior in juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Marine Biology*, **143**, 211–220.
- Awise, J.C. 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conserv. Biol*, 9: 686-690.
- Francisco, A., Bass, A. and B. Bowen. 1999. Genetic Characterization of loggerhead turtles nesting in Volusia County. NOAA-Department of Fisheries and Aquatic Sciences Inform.
- Bass, A., Epperly, S. and J. Braun-Mcneill. 2004. Multi-year analysis of stock composition of a loggerhead turtle (*Caretta caretta*) in a foraging habitat using maximum likelihood and bayesian methods. *Conserv. Genet.*, 5: 783-796.
- Bolten, A., Bjorndal, K., Martins, H., Dellinger, T., Biscoito, M., Encalada, S. and B. Bowen .1998. Transatlantic Developmental Migrations of Loggerhead Sea Turtles Demonstrated by mtDNA Sequence Analysis. *Ecol. Appl.*, 8(1): 1-7.
- Bowen, B. W., Abreu-Grobois, F., Balazs, G. , Kamezaki, N., Limpus, C. y R. Ferl.1995. Trans-Pacific Migrations of the Loggerhead Turtle (*Caretta caretta*) Demonstrated with Mitochondrial DNA Markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9): 3731-3734.
- Bowen, B.W., Bass, A., Soares, L y R. Toonen.2005. Conservation implication for complex population structure : Lessons from loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology* 14: 2389-2402.

Bowen, B., Kamezaki, N., Limpus, C., Hughes, G., Meylan, A y J. Avise. 1994a. Global Phylogeographic of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotipos. *Evolution*, 48(6): 1820-1828.

Bowen, B.W., Bass, A., Chow, S., Bostrom, M., Bjorndal, K., Bolten, A., Okuyama, T., Bolker, B., Epperly, S., Lacasella, E., Shaver, D., Dodd, M., Hopkinsmurphy, S., Musick, J., Swingle, M., Rankin-Baransky, K., Teas, W., Witzell, W. and P. Dutton. 2004. Natal homing in juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Mol. Ecol.*, 13: 3797-3808.

Bowen, B.W. and S.A Karl. 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Mol. Ecol.* 16: 4886-4907.

Carr, A. 1967. So Excellent a Fish: A Natural History of Sea Turtles. Ed. Scribner, New York. 248 pp.

Carreras, C., Pont, S., Maffucci, F., Pascual, M. Barceló, A., Bentivegna, F., Cardona, L., Alegre, F., Sanfélix, M., Fernandez, G. and A. Aguilar. 2006. Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns. *Mar. Biol.*, 149: 1269-1279.

Casale, P., Freggi, D., Gratton, P., Argano, R. and M. Oliveiro. 2008. Mitochondrial DNA reveals regional and interregional importance of the central Mediterranean African shelf for loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Scientia*, 72(3): 541-548.

Ceballos, C. 2003. Distribución de playas de anidación y riesgos para la conservación de las tortugas marinas en el Caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 33: 79-99.

Cejudo, D., Varo-Cruz, N., Liria, A., Castillo, J., Bellido, J & L. López-Jurado. 2006. Transatlantic Migration of Juvenile Loggerhead Turtles (*Caretta caretta* L.) from the Strait of Gibraltar. *MTN* : 114: 9-11

Dutton, P. 1996. Methods for collection and preservation of sample for sea turtle genetic studies, p. 17-24. En: B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtles Conservation Genetics*, NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-396.173.

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. Fitzsimmons, N., Moritz, C. y B. Bowen.

Encalada, S., Bjorndal, K., Bolten, A., Zurita, J., Schroeder, B., Possardt, E., Sears, C. and B. Bowen. 1998. Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Mar. Biol.*, 130: 567-575.

Engstrom, T., Meylan, P. and A. Meylan. 2002. Origin of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in a tropical developmental habitat in Caribbean Panamá. *Anim. Cons.*, 5: 125-133.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits in phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791.

Fitzsimmons, N., Moritz, C., Limpus, C., Miller, J., Parmenter, C. and R. Prince. Comparative genetic structure of green, loggerhead, and flatback populations in Australia based on variable mtDNA and nDNA regions: pp.25. 1996. En: Bowen, B. W. and W. N. Witzell (Eds). *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-396. 173 p.

Francisco, A., Bass, A. and B. Bowen.1999. Genetic Characterization of loggerheads turtles (*Caretta caretta*) nesting in Volusia County. Department of Fisheries and Acuatic Sciences.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98.

Hatase,H., Kinoshita,M., Bando,T., Kamezaki,N., Sato,K. Matsuzawa,Y., Goto,k., Omuta,K., Nakashima,Y., Takeshita,H. y W. Sakamoto. 2002. Population structure of loggerhead turtles, *Caretta caretta*, nesting in Japan: bottlenecks on the Pacific population. *Marine Biology* 141: 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: 455-535.

Holmes, S. 2003. Bootstrapping Phylogenetic Trees: Theory and Methods. *Stat. Sci.* 18(2):241-255.

Hopkins-Murphy S., Owens D., Murphy T.2003. Ecology of immature loggerheads on foraging grounds and adults in internesting habitat in the eastern United States. In: *LoggerheadSea Turtles* (eds Bolten AB, Witherington BE), pp. 79-92. SmithsonianBooks, Washington, D.C.

Maffucci,F., Kooistra, W y F. Bentivegna. 2006. Natal origin of loggerhead turtles, *Caretta caretta*, in the neritic habitat off the Italian coasts, Central Mediterranean. *Biol. Cons.* 127: 183-189.

Meylan, A., Schroeder, B. y A. Mosier. 1995. Sea turtle nesting activity in the state of Florida. *Florida Mar. Res. Pub.*, 52: 1-51.

Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial. 2002. Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales en Colombia. Ministerio del Medio Ambiente, primera edición, 63 pp.

Nobetsu, T., Minami, H., Matsunaga, H., Kiyota, M., Yokota, K., Kimura, N. y H. Nakano. Nesting and post-nesting studies of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) at Omaezaki, Japan. *National Research Institute of Far Seas Fisheries, Fisheries Research Agency* p 30-33.

Norman, J.A., Moritz, C. and C.J Limpus. 1994. Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Mol. Ecol.* 3: 363-374.

Pritchard, P. and P. Trebbau.1984. The turtles of Venezuela. Society for the Study of Amphibians and Reptiles- Contrib. Herp.

Reece,J., Ehrhart,L. and C. Parkinson.2006. Mixed stock analysis of juvenile loggerheads (*Caretta caretta*) in Indian RiverLagoon, Florida: implications for conservation planning. Conserv. Genet.

Reis, E. C., Soares, L. S., Vargas, S. M., Santos, F. R., Young R. J., Bjorndal, K. A., Bolten, A. B. and G. Lôbo-Hajdu. 2009. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. Conserv . Genet. Publicado en línea.

Roberts,M., Anderson,C., Stender,B., Segars,A., Whittaker,J., Grady,J. and Joseph M. Quattro. 2005. Estimated contribution of Atlantic Coastal loggerhead turtle nesting populations to offshore feeding aggregations. Conserv. Genet. 6: 133–139, 2005.

Stamatakis, A., Ott, M. y T. Ludwig. 2005 RAXML-OMP: An Efficient Program for Phylogenetic Inference on SMPs". In Proceedings of 8th International Conference on Parallel Computing Technologies (PaCT2005), Lecture Notes in Comp. Sci., 3506:288-302, Springer Verlag.

Swofford, D. L. 1991. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1 Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.

Thompson, J.D., Higgins D.G and T.J. Gibson.1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680.

Vincze, T., Posfai, J. and R.J, Roberts. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res. 31: 3688-3691.

Witzell,W., Bass,A., Bressete,M., Singewald,D. and J. Gorham. 2002. Origin of immature loggerhead turtles at Hutchinson Island, Florida: Evidence from mtDNA markers. Fish. Bull. 100: 624-631.

IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. www.iucnredlist.org. Consultado el 25 Mayo 2010.

TABLAS Y FIGURAS



Figura 1. Ubicación geográfica de las dos localidades del Caribe colombiano de las cuales provenían las tortugas *Caretta caretta* muestreadas en el presente estudio. (A): Playa de anidación Don Diego ($11^{\circ}16'N$ y $73^{\circ}45'W$), ubicada en el departamento del Magdalena y (B): Zona de Alimentación, Isla San Martín de Pajarales ($10^{\circ} 11' N$, $75^{\circ} 47' W$) ubicada en el Parque Natural Corales del Rosario y San Bernardo (PNNCRSB), Departamento de Bolívar. (Modificado de IGAC, 2010).

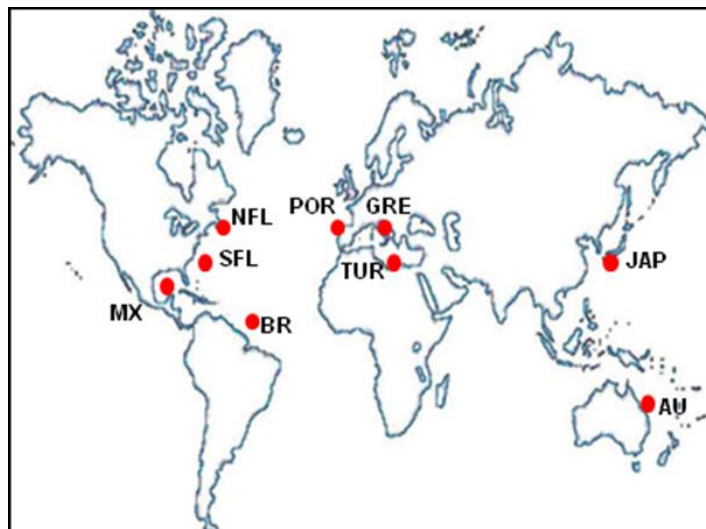


Figura 2. Origen geográfico de las secuencias haplotípicas de *C. caretta* recopiladas de bases de datos GenBank y ACCSTR para el análisis filogenético del presente estudio (NFL), Florida - Carolina del Norte, EE.UU. (SFL), Sur de la Florida, EE.UU., (MX), México, (BR), Brasil (POR), Islas Azores y Madeira, Portugal (GRE) Bahía Kiparissia, Grecia, (TUR) Turquía, (JAP), Japón, (AU), Queensland, Australia (Bolten et al., 1998; Laurent et al., 1998; Bowen et al., 2004).

Tabla 1. Promedios de concentración de ADN genómico obtenido para ocho individuos de la tortuga caguama *C. caretta* a partir de tejido sanguíneo.

Muestra	Concentración de DNA (ng/μl)	Desviación Estándar	Playa de procedencia
CCDD1	74,3	0,5	Don Diego
CCDD2	19,15	0,86	Don Diego
CCDD3	78	0,43	Don Diego
CCDD4	110,5	0,43	Don Diego
CCDD5	66,8	0,61	Don Diego
CCIR1	147	0,53	Isla San Martin
CCIR2	203	0,79	Isla San Martin
CCIR3	43,15	0,25	Isla San Martin

Tabla 2. Haplotipos basados en la región control (D-loop mitocondrial) identificados en el presente estudio. Se registró un nuevo haplotipo (CCDD1) en la Playa Don Diego en Magdalena, Caribe colombiano.

Haplotipo	Frec.Colombia	Colonias anidantes
CC-A1	50%	SFL , MX,BRA, MT
CC-A2	37,5%	NFL, CS,GA
CCDD1	12,5%	Colombia

(SFL= Sur Florida, EE.UU., MX= México, BRA= Brasil, MT= Mediterráneo, NFL= Norte Florida (EE.UU.), CS =Carolina del Sur, EE.UU., GA = Georgia, EE.UU.) (Encalada *et al.*,1998)

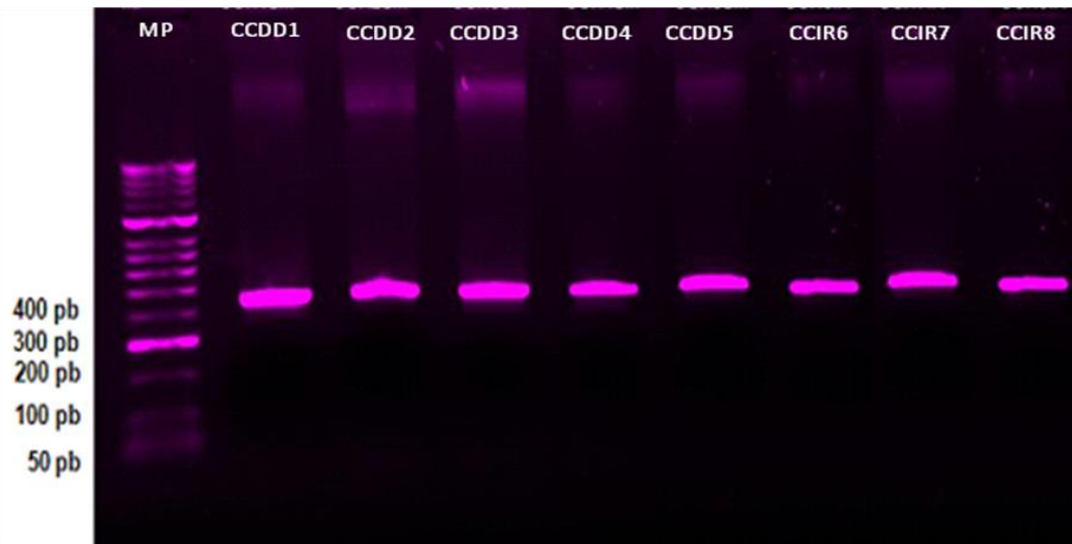


Figura 3. Productos de amplificación de la región de control (D-loop mitocondrial) de la tortuga *Caretta caretta*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

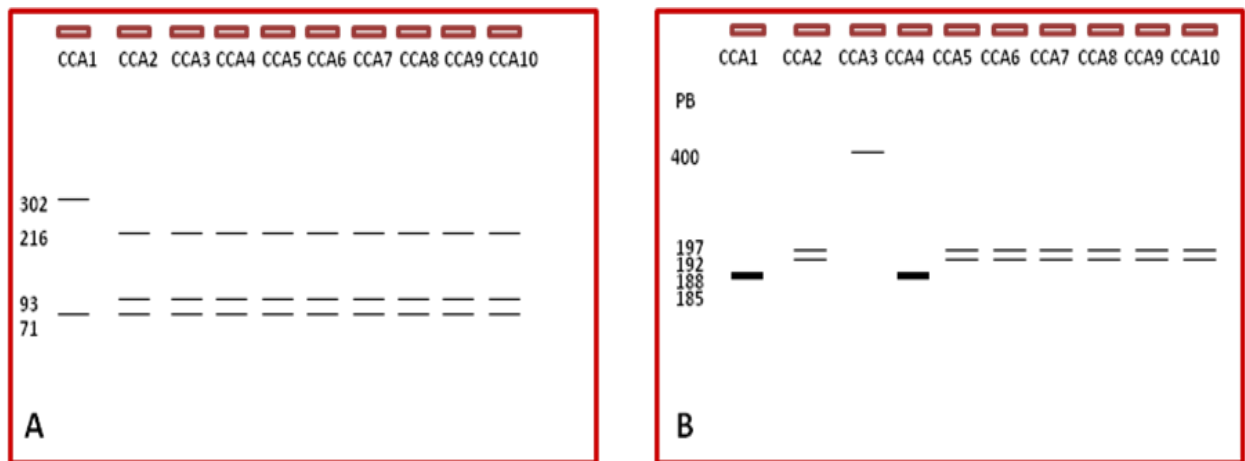


Figura 4. Patrón de restricción *in silico* de las enzimas *HpyCH4III* (A) y *AluI* (B) para los haplotipos más comunes, CCA1 al CCA10, (secuencias del D-loop mitocondrial) del Atlántico y Mediterráneo. Como se observa la enzima *HpyCH4III* (A) produce un bandeo único para el haplotipo CCA1, identificándolo. En B) la enzima *AluI* no corta el haplotipo CCA3, ya que no existen sitios de restricción para esta enzima, pero si corta el haplotipo CCA2 produciendo un bandeo diferente al haplotipo CCA1, identificándolo. Los haplotipos CCA4 al CCA10 producen bandeos idénticos, por lo que la metodología no permite su identificación.

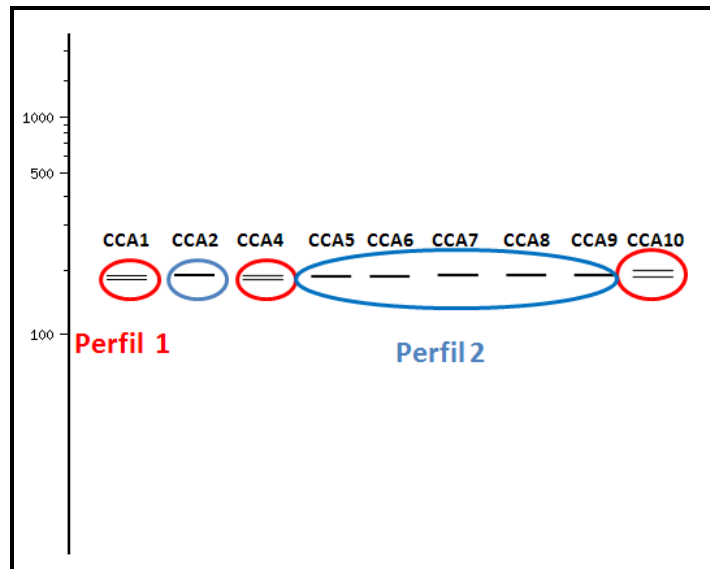
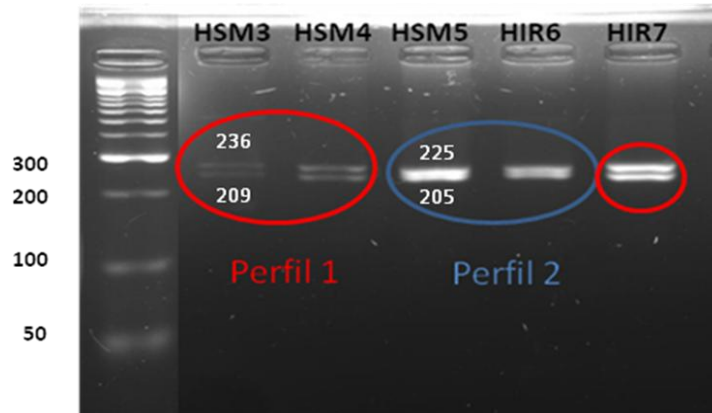


Figura 5. Comparación entre perfiles electroforéticos obtenidos *in vitro* Vs perfiles obtenidos *in silico* de la región control (D-loop mitocondrial) con la enzima *AluI* a) Patrón de restricción *in vitro* para las cinco tortugas juveniles de *C. caretta* provenientes de la playa Don Diego y zona de alimentación Islas del Rosario. Se produjeron dos perfiles distintos. b) Perfiles de Restricción *in silico* para 9 haplotipos de poblaciones de la tortuga cabezona en el Atlántico. El haplotipo CCA3 no tiene sitios de reconocimiento para esta enzima.

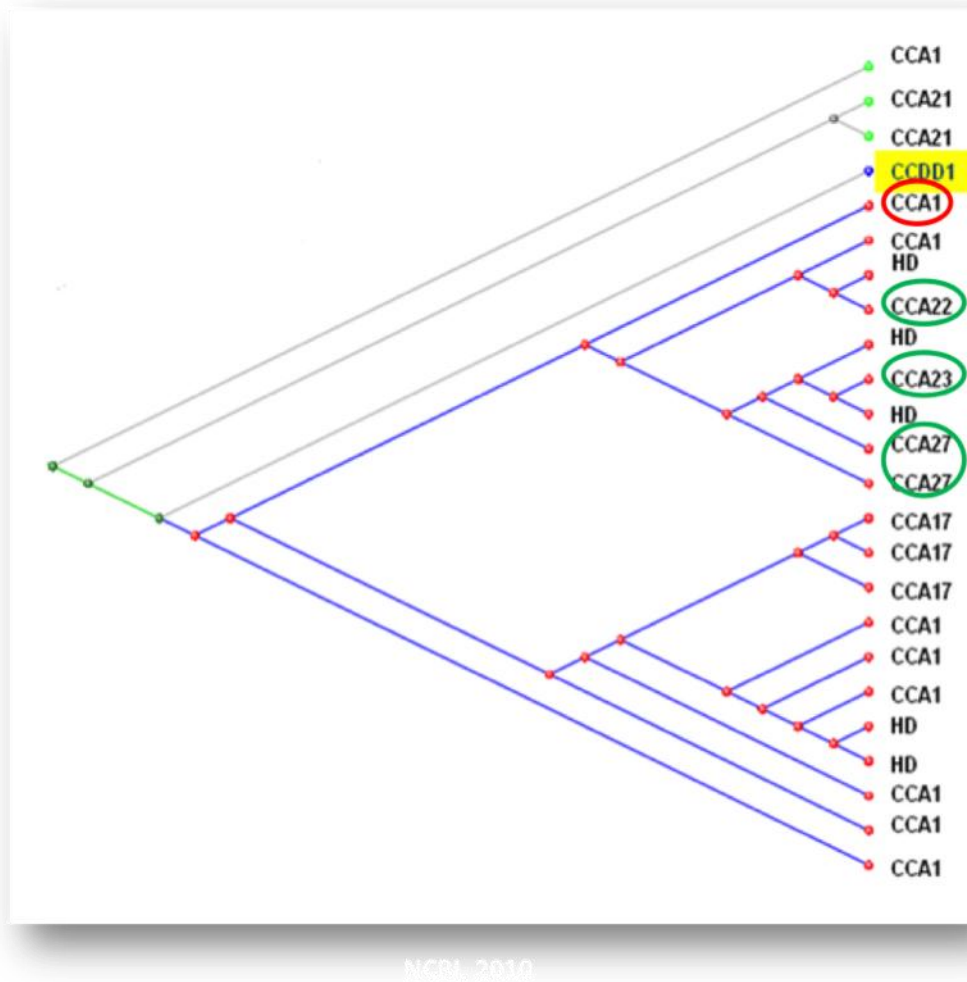


Figura 6. Árbol filogenético de distancia basado en el criterio de Neighbor-Joining teniendo en cuenta el alineamiento pareados en la herramienta BLAST- buscando las relaciones del haplotipo nuevo CCDD1 con las secuencias reportadas, mostrando una proximidad genética con el haplotipo CCA1 y un grupo de secuencias similar a esta.



Figura 7. Alineamiento múltiple secuencia de los haplotipos CCA1 y CCDD1 (Nuevo haplotipo descrito en este estudio) utilizando la aplicación CLUSTALW (Thompson et al., 1994), los asteriscos indican posiciones idénticas en las dos secuencias, y los espacios en blanco indican diferencias nucleotídicas entre estas posiciones.

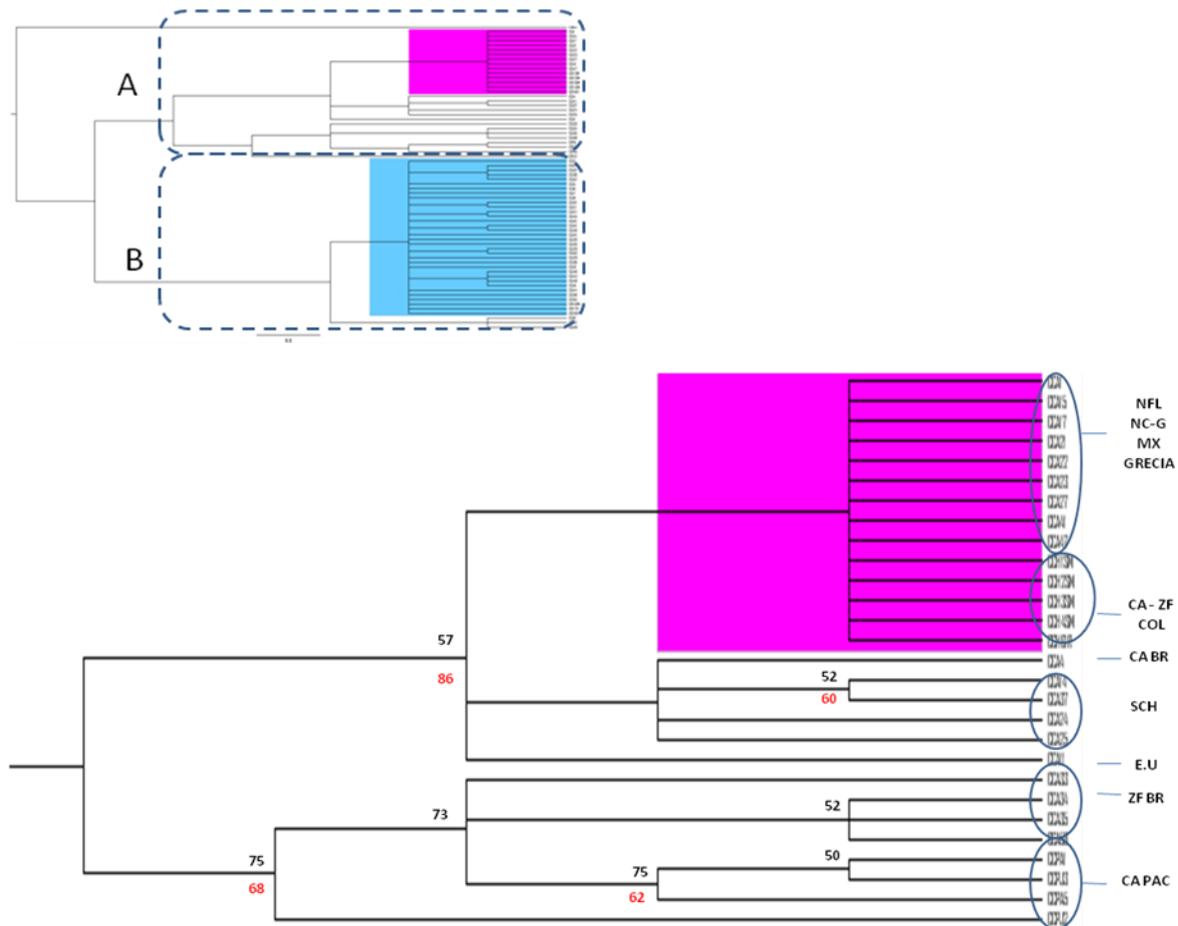


Figura 8a. Árbol consenso obtenido bajo el método de MP. Se muestra la relación de la agregación anidante del Caribe colombiano con otras poblaciones importantes del Atlántico y Mediterráneo. En color negro se indica el valor bootstrap obtenido por el método de MP y en rojo el valor obtenido por ML. (SFL MX GR= Colonias anidantes del Sur Florida (EE.UU.), México y Grecia, CA COL = Colonia anidante Colombia, SCH= Secuencias huérfanas, EE.UU.= Colonia anidante Estados Unidos, CA BR= Colonia anidante Brasil, CA PAC = Colonias anidantes del Pacífico (Japón y Australia) ZF AN= Poblaciones de zonas de forrajeo del Atlántico Norte, ZF BR = Poblaciones de forrajeo en Brasil, ZF MED= Zona de forrajeo Italia, ZF ESP= Zona Forrajeo España, ATL-MED= Secuencias compartidas entre poblaciones del Mediterráneo y Atlántico, ZF COL= Agregación zona forrajeo Caribe colombiano).

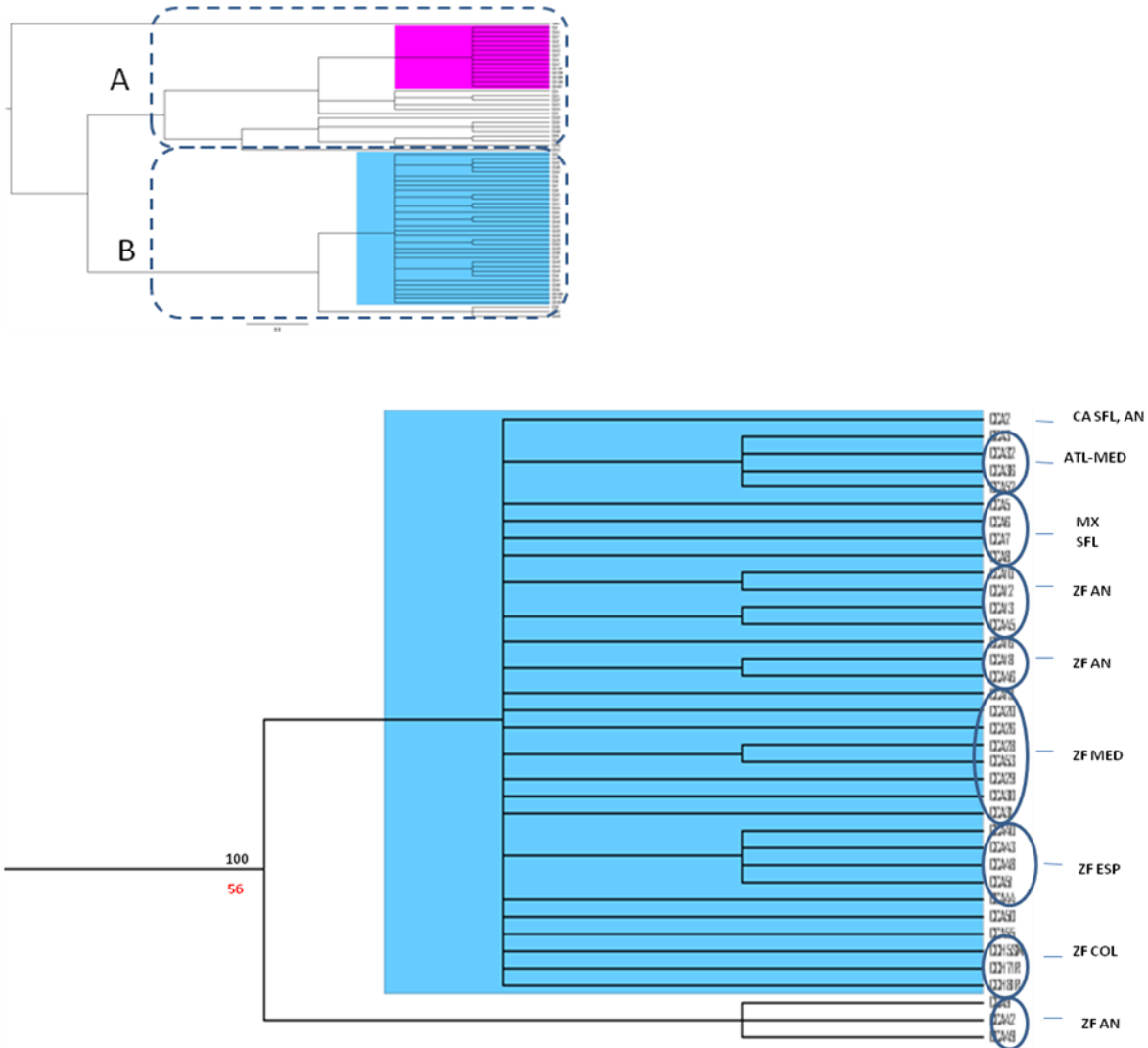


Figura 8b. Árbol consenso obtenido bajo el método de MP. Se muestra la relación de las agregación de forrajeo del Caribe colombiano con otras poblaciones importantes del Atlántico y Mediterráneo. En color negro se indica el valor bootstrap obtenido por el método de MP y en rojo el valor obtenido por ML. (SFL MX GR= Colonias anidantes del Sur Florida (EE.UU.), México y Grecia, CA COL = Colonia anidante Colombia, SCH= Secuencias huérfanas, EE.UU.= Colonia anidante Estados Unidos, CA BR= Colonia anidante Brasil, CA PAC = Colonias anidantes del Pacífico (Japón y Australia) ZF AN= Poblaciones de zonas de forrajeo del Atlántico Norte, ZF BR = Poblaciones de forrajeo en Brasil, ZF MED= Zona de forrajeo Italia, ZF ESP= Zona Forrajeo España, ATL-MED= Secuencias compartidas entre poblaciones del Mediterráneo y Atlántico, ZF COL= Agregación zona forrajeo Caribe colombiano).

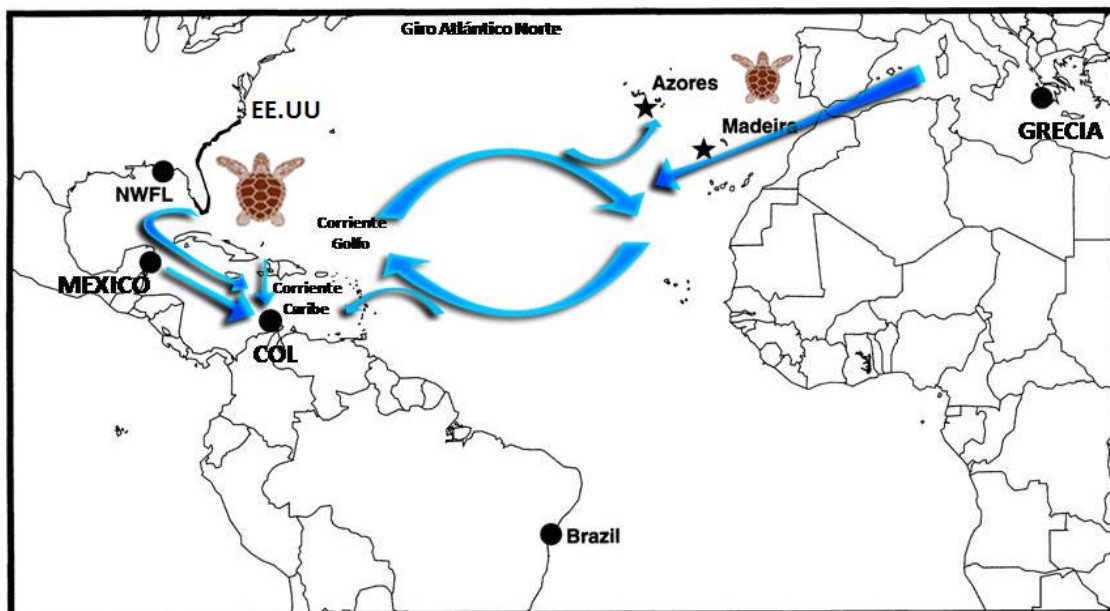


Figura 9. Patrones Migratorios de la Tortuga Marina *C. caretta* en el Atlántico teniendo en cuenta los haplotipos mitocondriales (MED = Colonias del Mediterráneo, COL= Agregación anidante y de forrajeo evaluadas en Colombia) (Modificado de Bowen y Karl, 2007).

ANEXOS

Anexo 1. Publicación Resumen en la Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Memorias XLIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Popayán. Octubre 6 a 10 de 2009.

IDENTIFICACIÓN PARCIAL DE LOS HAPLOTIPOS MITOCONDRIALES DE LA TORTUGA CAGUAMA *Caretta caretta* (TESTUDINES: CHELONIIDAE) MEDIANTE PCR Y RFLP

HAPLOTYPE IDENTIFICATION OF THE LOGGERHEAD TURTLE *Caretta caretta* (TESTUDINES: CHELONIIDAE) USING PCR AND RFLP

Carolina Franco Espinosa y Javier Hernández-Fernández

“GENÉTICA, BIOLOGÍA MOLECULAR & BIOINFORMÁTICA” LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO Cra. 4 No 22-61, Bogotá, Colombia

*Autor para correspondencia: javier.hernandez@utadeo.eu.co

RESUMEN

C. caretta ha sido categorizada como especie en peligro de extinción, por lo que se han realizado esfuerzos para implementar planes de manejo y conservación. En Colombia, se ha realizado estudios de marcaje-recaptura y demografía de playas de anidación, es por esto, que este estudio busca complementar esta información con la identificación de haplotipos mitocondriales que permitan determinar la estructura poblacional. Se obtuvieron muestras de sangre periférica de juveniles de la tortuga caguama *Caretta caretta* pertenecientes a dos zonas del Caribe Colombiano: Santa Marta y la Isla de San Martín de Pajarales (PNNCRSB) a partir de las cuales se realizó la extracción de ADN genómico, obteniéndose entre 9-41 ng/μl. Se realizó por PCR una amplificación de la región de control del ADN mitocondrial “D-loop” utilizando los oligonucleótidos TCR-5 y TCR-6, amplificando un fragmento de aproximadamente 399 pares de bases. Este fragmento fue sometido a una restricción con la enzima *AluI*, produciendo dos patrones de RFLP con dos bandas de pesos entre 145-158 pares de bases. La comparación de este patrón de restricción con el RFLP *in silico* de 34 haplotipos reportados para *C. caretta* en el Atlántico, presentó la mejor relación con los haplotipos CCA18 y CCA19 reportados en tortugas anidantes en Panamá y la Florida, y el otro, con los haplotipos CCA23, CCA24 y CCA25. Sin embargo, se recomienda cortar con otras enzimas que permitan definir con mayor especificidad estos haplotipos. Este trabajo es un aporte importante para el conocimiento y valoración de la biodiversidad de la tortuga cabezona *C. caretta* en el Caribe colombiano.

PALABRAS CLAVE: Haplotipos, *C.caretta*, ADN mitocondrial, Colonias anidantes, Caribe Colombiano

Anexo 2. Resumen Ponencia Oral. XLV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Armenia. Octubre 5 al 10 de 2010.

HAPLOTIPOS DE LA TORTUGA CABEZONA *CARETTA CARETTA* (TESTUDINES: CHELONIIDAE): PRIMER ESTUDIO EN INDIVIDUOS DE LAS PLAYAS DON DIEGO (MAGDALENA) E ISLA SAN MARTIN DE PAJARALES (BOLIVAR), CARIBE COLOMBIANO

Franco-Espinosa Carolina¹ y Javier Hernández-Fernández²

¹Estudiante-tesista, Biología Marina, Facultad de Ciencias Naturales Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Programa de Biología Marina, "GENBIMOL" Genética, Biología Molecular y Bioinformática, Carrera 4 No. 22-61, Bogotá, Colombia.

Email: carofrancoe@gmail.com

²Profesor-Investigador, Facultad de Ciencias Naturales Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Programa de Biología Marina, "GENBIMOL" Genética, Biología Molecular y Bioinformática, Carrera 4 No. 22-61, Bogotá, Colombia.

Autor para correspondencia: javier.hernandez@utadeo.edu.co

RESUMEN

La tortuga cabezona (*Caretta caretta*), es una especie marina circumtropical, su compleja historia de vida y las actividades antropogénicas han ocasionado la drástica disminución de sus poblaciones y actualmente es una especie en peligro de extinción. Teniendo en cuenta esta problemática y la carencia de información en el Caribe Colombiano se realizó una caracterización haplotípica en individuos de *C. caretta* de dos regiones del Atlántico Colombiano: Playa Don Diego (zona de anidación) e Isla San Martín de Pajarales (zona de alimentación) mediante RFLPs y secuenciación directa. Se amplificó por PCR, la región control (D-loop mitocondrial) y se realizó un análisis de restricción con la enzima *AluI*, por otro lado los haplotipos más comunes para esta zona fueron sometidos a un corte *in silico* con las enzimas *AluI* y *HpyCH4III* las cuales generaron un patrón específico que permitió desarrollar una metodología para identificar los haplotipos CCA1 y CCA2, los más frecuentes en el Atlántico y Mediterráneo.

El análisis experimental con la endonucleasa *AluI* generó dos perfiles de restricción, el Perfil 1, mostró dos bandas claramente separadas con pesos de 236 y 209 pb (N=3) en tortugas de las dos playas estudiadas, similares a las secuencias descritas para el Sur de la Florida, Brasil y Mediterráneo. El Perfil 2, mostró dos bandas de 225 y 205 pb similares al patrón generado para poblaciones anidantes del Norte de la Florida (EE.UU.), México y Atlántico Norte. La secuenciación nucleotídica de la región control identificó dos haplotipos: CCA1 y CCA2 descritos para las poblaciones anidantes de México,

Mediterráneo y Sudeste de Estados Unidos. Se identificó un nuevo haplotipo CCDD1 (*C. caretta* -Playa Don Diego) con ~90% de similitud con el haplotipo CCA1. Los arboles filogenéticos generados por Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML) muestran una relación de la agregación anidante y de forrajeo en Colombia con las súper agregaciones del Atlántico y Mediterráneo, sugiriendo que estas grandes poblaciones puedan ser la fuente de las agregaciones presentes en Colombia, este hecho pudo haberse presentado a través de eventos de colonización reciente, ayudados por el fuerte comportamiento migratorio de la especie y las corrientes marinas del Golfo, Caribe y Giro Atlántico Norte. La presencia de un nuevo haplotipo en la playa anidante de Don Diego sugiere una evidencia de la hipótesis de *natal homing*.

PALABRAS CLAVE: *C. caretta*, ADN mitocondrial, Máxima parsimonia, Región control

Anexo 3. Poster Presentation. 24th International Congress for Conservation Biology: Conservation for Changing Planet. Edmonton, Canadá. Julio 3-5 de 2010.

PHYLOGEOGRAPHY OF THE LOGGERHEAD TURTLE *Caretta caretta* (TESTUDINES: CHELONIIDAE): FIRST CASE OF STUDY FOR THE COLOMBIAN CARIBBEAN

Carolina Franco-Espinosa and Javier Hernández-Fernández

"GENBIMOL" Genética, Biología Molecular y Bioinformática, Programa de Biología Marina, Facultad de Ciencias Naturales Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia - South America

Introduction

The loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) is distributed globally along tropical and subtropical latitudes, their complex life cycle that includes extensive migrations and late sexual maturity combined with anthropogenic threats (Eckert et al., 2000) turned this seaturtle status to threatened since 1996 (IUCN, 2010). Molecular markers inherited maternally such as control region (mtDNA) are related; considering the lacking of information for the Colombian Caribbean a haplotypic characterization of the loggerhead turtle was performed in two regions of the Atlantic coast of Colombia: Don Diego beach (Nesting area) and San Martín de Pajarales Island (Feeding ground) using direct sequencing and phylogenetic inference.

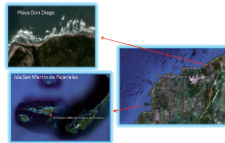


Figure 2. Geographic map of the juveniles survey locations: Upper-San Martín de Pajarales Island, National Natural Park Corales del Rosario and Bermejo (MAGDALENA); Lower - Don Diego Beach, Magdalena.



Figure 1. Loggerhead turtle *Caretta caretta* (Picture taken by Carolina Franco).

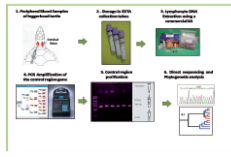


Figure 3. Diagram of the methodology used in this assessment. 1. Peripheral blood samples of loggerhead turtles. 2. Blood storage in collection tubes. 3. DNA extraction using a commercial kit. 4. PCR amplification of the control region gene. 5. Direct sequencing and phylogenetic analysis.

Materials and Methods

During years 2008 and 2009, a survey of peripheral blood samples was performed with eight loggerhead turtles of the Colombian Caribbean. Genomic DNA was extracted from lymphocytes using a UltraClean™ Tissue and Cells commercial kit, mitochondrial control region (D-loop) was PCR-amplified using primers TCR-5 and TCR-6 (Norman et al., 1994), subsequently this products were purified and directly sequenced at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). A basic local alignment (BLAST- GenBank) was performed to identify the haplotypes in Colombian aggregations. In order to perform phylogenetic inference, these sequences were assembled and aligned using Bioedit Sequence Alignment Editor 7.0 software (Hall, 1998), phylogenetic analysis was performed using Maximum Parsimony (PALUP 3.0) (Swofford, 1991) and Maximum-Likelihood (Rax-ML Cipress 2.0) (Stamatakis et al., 2005) criteria. Statistical support was provided for phylogenetic trees with a bootstrap analysis (Felsenstein, 1985).

Results

PCR products of control region (mtDNA) with a molecular weight of ~368 bp were obtained from eight loggerhead turtle juveniles of the Colombian Caribbean. Two previously reported haplotypes were identified in these individuals: CCA1 (50% - N=4) present in nesting colonies of South Florida (U.S.), Mexico and Mediterranean sea, and CCA2 (37,5% - N=3) registered in North Florida, Georgia and South Carolina nesting colonies, also a new sequence CCDD1 (N=1 - 12,5%) (Table 1) found in an individual corresponding to Don Diego nesting beach, Colombian Caribbean, displaying similarity to CCA1 (90%).

Table 1. Haplotypes identified in the present assessment (SFL = South Florida, U.S.A. MX = Mexico, BFA = Brazil, MT = Mediterranean sea, NFL = North Florida U.S.A. CS = South Carolina, U.S.A. GA = Georgia, U.S.A.).

Haplotypes	Frequency in this study	Nesting OI.
CCA1	50%	SFL, MT & BFA
CC-A2	37.5%	NFL, CS & GA
CCDD1	12.5%	Colombia

Phylogenetic analysis (MP and ML) displays a relationship of nesting and feeding aggregations of Colombia with major populations in the Atlantic and Mediterranean. Nesting aggregation present in Colombia is related to nesting colonies in South Florida (U.S.), Mexico and Greece. Loggerheads turtles from feeding ground in Colombia are grouped with other aggregations of feeding populations from North Atlantic, Mediterranean sea (Spain and Italy) also sequences reported frequently from nesting populations in North Atlantic and Mexico. This pattern suggests that individuals that use Colombian Caribbean for feeding and reproductive activities are part of an Atlantic metapopulation, where sequences CCA1 and CCA2 are the most frequent and provides juveniles to feeding grounds.

Conclusions

Supperaggregations in Southeastern U.S.A and Mediterranean coast be the nesting aggregation evaluated in Colombia, by means of recent colonization events (Bowen & Karl, 2007), helped by the strong migratory behavior of loggerhead turtles and marine currents such as Caribbean, Gulf and North Atlantic Gyre. Due to the presence of a new haplotype of *C. caretta* in the Colombian Caribbean we suggest the fulfilling of natal homing hypothesis.

Literature Cited

- Cesario, C. 2003. Distribución de playas de anidación y zonas para la conservación de las tortugas marinas en el Caribe colombiano. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras, Vol. 31, pp 79-98.
- Eckert, K. L., Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois F. A., Donnelly M. (EDITORES). 2000. (Traducción al español). Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las Tortugas Marinas IUCN/SSC. Páramaribo, Guayana Francesa.
- Encalada, B., Bjorndal, K., Eklöv, A., Zurita, J., Schroeder, B., Pinnard, E., Beck, C., Bowen, B. 1998. Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. Marine Biology, 130: 587 - 575.
- Hall, T. A. 1998. Bioedit: a user-friendly biological sequence editor and analysis program for Windows. NCI/NIH. Nucleic Acids Symp Ser 41: 51 - 58.
- IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. www.iucnredlist.org. Downloaded on 20 May 2010.

Acknowledgements

Thanks to El Rosadero Aquarium - Museum in Santa Marta and CENHR Oceanarium in Cartagena for collaboration in the survey of blood samples from loggerhead turtles of juvenile hauls.

For further information

Contacting Javier Hernández Fernández: javier.hernandez@utadeo.edu.co. More information on the WEB: http://www.utadeo.edu.co/conservacionecologia_medicinacelocales.



Figure 4. Control region PCR products revealed in a 2% agarose gel.

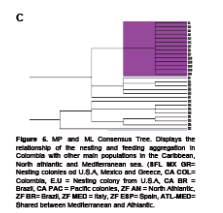
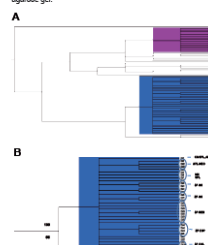


Figure 6. MP and ML Consensus Tree. Displays the relationship of the nesting and feeding aggregation in Colombia with other main populations in the Caribbean, North Atlantic, and Mediterranean seas. (SFL, MX, BFA = Nesting colonies in U.S.A, Mexico and Greece, GA, CS = Colombia, EU = Nesting colony from U.S.A, CA, BR = Brazil, CA, PA = Feeding colonies, ZF = North Atlantic, ZF BR = Brazil, ZF MED = Italy, ZF BR = Spain, ATL, MED = Shared between Mediterranean and Atlantic).

Anexo 4. Resumen aceptado en congresos próximos a realizarse en Colombia.

EVENTO	LUGAR/FECHA	TRABAJO PRESENTADO
XIV Seminario Nacional de Ciencias y Tecnologías del Mar	Cali (V. Cauca)/Octubre 19-22 de 2010	Primer registro de haplotipos mitocondriales de la tortuga cabeza <i>Caretta caretta</i> (Testudines:cheloniidae) en el caribe colombiano
III Congreso Colombiano de Zoología	Medellín (Ant.)/ Noviembre 21-26 de 2010	Primer registro de haplotipos mitocondriales de la tortuga cabeza <i>Caretta caretta</i> (testudines:cheloniidae) en el caribe colombiano
XLV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas	Armenia (Quindío)/5 - 9 Octubre de 2010	Haplotipos de la tortuga cabeza <i>Caretta caretta</i> (TESTUDINES: CHELONIIDAE): Primer estudio en individuos de las playas Don Diego (Magdalena) e isla san martin de pajarales (Bolivar), caribe colombiano