

**ESTRUCTURA HAPLOTÍPICA DE LA COLONIA ANIDANTE DE LA TORTUGA
CAGUAMA (*Caretta caretta*), SECTOR MENDIHUACA – DON DIEGO, CARIBE
COLOMBIANO, CON ÉNFASIS EN SUS ÁREAS ECOLÓGICAS**

ARIEL ALEXANDER CACANTE GONZÁLEZ

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MARINAS
SANTA MARTA
2020**

**ESTRUCTURA HAPLOTÍPICA DE LA COLONIA ANIDANTE DE LA TORTUGA
CAGUAMA (*Caretta caretta*), SECTOR MENDIHUACA – DON DIEGO, CARIBE
COLOMBIANO, CON ÉNFASIS EN SUS ÁREAS ECOLÓGICAS**

ARIEL ALEXANDER CACANTE GONZÁLEZ
Ingeniero ambiental

Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Marinas

Directora
GUIOMAR AMINTA JÁUREGUI ROMERO
Magíster en Ciencias Ambientales
Directora del programa de Conservación de Tortugas Marinas-PROCTMM

Codirector
GILBERTO JUNIOR OROZCO BERDUGO
Magíster en Acuicultura y Ecología Acuática Tropical
Docente investigador – Universidad del Magdalena

Asesores
JUAN CARLOS AGUIRRE PABÓN
Magíster en Acuicultura y Ecología acuática tropical
Candidato a PhD en Biodiversidad, genética y evolución

LEIDY JOHANNA HERNÁNDEZ RIVERA
Cand. Maestría en Ciencias Marinas
Investigadora Laboratorio Ecología Molecular – Universidad Jorge Tadeo Lozano,
Santa Marta

UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MARINAS
SANTA MARTA
2020

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. JUSTIFICACIÓN	7
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	8
3.1 GENERALIDADES	8
3.1.1 Descripción de la especie <i>C. caretta</i>	8
3.1.2 Áreas ecológicas.....	9
3.1.3 Ciclo de vida.....	11
3.1.4 Usos del ADN mitocondrial en <i>C. caretta</i>	12
3.2 ESTADO DEL ARTE.....	17
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVO	21
4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
4.2 OBJETIVOS	21
4.2.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
5. HIPÓTESIS	22
6. METODOLOGÍA.....	22
6.1 ÁREA DE ESTUDIO	22
6.2 ACTIVIDADES A DESARROLLAR	24
6.2.1 Extracción de ADN	24
6.2.2 Amplificación del ADNmt mediante la técnica del PCR.....	25
6.2.3 Determinación de la Diversidad genética de <i>C. caretta</i> en Mendichuaca – Don Diego 26	
6.2.4 Estructura poblacional de <i>C. caretta</i> en el sector Mendihuaca - Don Diego en relación a su distribución global.....	27
6.2.5 Consecución de información secundaria	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
7.1 RESULTADOS.....	28
7.1.1 Extracción y Secuenciación	28
7.1.2 Análisis de información secundaria.....	30
7.2 DISCUSIÓN.....	38

8. CONCLUSIONES.....	47
9. RECOMENDACIONES.....	48
10. AGRADECIMIENTOS	49
11. BIBLIOGRAFÍA.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Tortuga <i>Caretta caretta</i> . Foto archivo ProCTMM (2019)	9
Figura 2. Unidades regionales de gestión multiescala para tortugas caguama <i>Caretta caretta</i>	15
Figura 3 Red de parsimonia sin ancestro para haplotipos de tortugas caguama de 800 pares de bases en el Atlántico, el Mediterráneo y el Océano Índico occidental. MED: Mediterráneo, QRMX: Quintana Roo México, SEUS: Sureste de Estados Unidos, NWATL: Atlántico Noroeste, BRZ: Brasil, CPVD: Cabo Verde, MAS: Masirah Island (Omán). Tomado de Shamblin et al., 2011.	17
Figura 4. Área de estudio, Sector Mendihuaca-Don Diego, Caribe colombiano. Realizado por Camila Castellanos.....	23
Figura 5. A) Toma de muestras de mucosas de tortuga caguama por medio de un hisopo común. B) Preservación del hisopo con la muestra de mucosa previamente tomada. C) y D) Sistemas cerrados de levante de la especie en las instalaciones de la Universidad Jorge Tadeo Lozano – Acuario Mundo Marino. Fotografías: ProCTMM.....	24
Figura 6. Kit de aislamiento de ADN por saliva (Norgen Biotek Corporation, ON, CA, 2012).	25
Figura 7. Alineamiento de secuencias de individuos de <i>C. caretta</i> de la región.....	28
Figura 8 Árbol de máxima similitud basado en la región control del ADNmt de juveniles de <i>C. caretta</i> y un haplotipo externo (<i>Chelonia mydas</i>), usando el método Bootstrap con 1000 repeticiones. Árbol resumido, para la facilidad del lector. Árbol completo en anexos.	30
Figura 9. Árbol del vecino más cercano mostrando la relación genética de diferentes poblaciones de <i>C. caretta</i> a nivel mundial.....	35

Figura 10 Red de haplotipos usando secuencias de la región control de ADNmt en la tortuga <i>C. caretta</i> . El número en paréntesis se refiere a las sustituciones que existen entre los diferentes haplotipos.	36
Figura 11. Distribución espacial de haplotipos analizados en la tortuga <i>C. caretta</i> mediante la región control de ADNmt.	38
Figura 12 Análisis oceanográfico y meteorológicos del Atlántico Norte para rastrear movimientos superficiales alrededor del Golfo de Vizcaya (círculo naranja) y Cabo Verde (círculo rojo). (a) Simulación de trayectorias de corrientes marinas durante los 3 años del estudio, y (b) Seguimiento a 11 tormentas originadas en Cabo Verde entre el 2000 y 2008. Modificado de Monzón-Argüello et al., 2012.	41
Figura 13 Mapa de distribución de áreas de forrajeo, reproducción y anidación de <i>C. caretta</i> a nivel global. Mapa basado en información recopilada para este estudio	47

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Frecuencia de haplotipos de la región control de la ADNmt de <i>C. caretta</i> a lo largo de los años 2014-2018.,.....	28
Tabla 2 Haplotipos obtenidos del GenBank con sus códigos y ubicaciones de reporte (Shamblin et al., 2014).....	29
Tabla 3. Tabla comparativa de diversidad haplotípica y nucleotídica de diferentes poblaciones de <i>C. caretta</i> . Donde Nidos = número de nidos; H = número de haplotipos; DH = diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica (Yilmaz et al., 2011, Monzón-Argüello et al., 2012; Garofalo et al., 2013; Shamblin et al., 2014; Clusa et al., 2018).	31
Tabla 4. Haplotipos de <i>C. caretta</i> registrados en Gen Bank, por distintos autores con sus lugares de procedencia y zona ecológica correspondiente	31
Tabla 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para los once grupos establecidos (Grupo 1: Albania, Grecia, Italia; Grupo 2: Brasil; Grupo 3: Canarias; Grupo 4: Cabo Verde; Grupo 5: Colombia; Grupo 6: Francia; Grupo 7: Israel, Líbano, Turquía; Grupo 8: Japón; Grupo 9: Kuwait; Omán; Grupo 10: Noratlántico; Grupo 11: Suráfrica.....	33
Tabla 6. Comparación de colonias anidantes de la tortuga <i>C. caretta</i> a nivel mundial por el método Tamura. ALB: Albania; BRA: Brasil, CAN: Canarias, CAP: Cabo Verde; COL:	

Colombia, FRA: Francia, GRE: Grecia, ISR: Israel, ITA: Italia, JAP: Japón, KUW: Kuwait, LIB: Líbano; NAT: Noratlántico; OMA: Omán, TUR: Turquía, SAF: Suráfrica.....	34
Tabla 7. Descripción de agrupación de haplotipos, relacionados con el presente estudio.	37
Tabla 8. Descripción de haplotipos por región geográfica en la tortuga <i>C. caretta</i> , con su frecuencia entre paréntesis.....	38

1. INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas a nivel mundial, han sido víctimas de amenazas constantemente por actividades antrópicas como: pesca incidental con redes de enmalle y palangre, explotación de caparzones y alimento (siendo los huevos de mayor interés comercial), además de otros factores como la polución marina, el turismo, la erosión de playas, la pérdida de hábitat y la alta presencia de desechos orgánicos, transportados por los ríos que desembocan al mar (Domingo *et al.*, 2006; UICN, 2017). En el contexto nacional, la tortuga caguama, también conocida como tortuga cabezona (*Caretta caretta*), se ha reducido considerablemente, especialmente por la comercialización de la carne, los caparzones y el consumo de aceite y huevos (Ceballos, 2003; Ceballos-Fonseca, 2004).

A razón de esta problemática, se han adelantado diferentes estudios como la caracterización de las playas de anidamiento, rutas de migración, seguimiento satelital, frecuencia de anidación y estructura de las poblaciones; para este último, se utiliza la biología molecular junto con la información ecológica y comportamental, permitiendo comprender el vínculo entre variabilidad genética y la sobrevivencia de la especie, estableciendo su filogeografía y linajes maternos mediante el uso de marcadores moleculares (Bowen *et al.*, 1994; Bosch *et al.*, 2005).

Las tortugas marinas, poseen una estructura genética donde las colonias anidantes, se solapan demográficamente (Bowen *et al.*, 2004); es decir, si una colonia registra valores altos de diversidad haplotípica, se puede inferir su estado de conservación y a su vez, deducir si las áreas ecológicas (desarrollo, alimentación, forrajeo y reproducción) en las que transitan, son óptimas, haciendo de estas, zonas geográficas de gran relevancia a nivel mundial, con la capacidad de albergar especies amenazadas que requieren protección y manejo sostenible, según lo expuesto por Bowen *et al.* (2005) y Bowen y Karl (2007).

El presente estudio, se realiza para optar el título de Magíster en Ciencias Marinas, de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, esto en cuenta, busca evaluar la variabilidad haplotípica de los especímenes de *C. caretta* que se encuentran en fase de levante por el Programa de Conservación de Tortugas y Mamíferos Marinos – ProCTMM-, mediante el uso de marcadores mitocondriales, con énfasis en sus áreas ecológicas, en el marco del Grupo de Investigación Dinámica y Manejo de Ecosistemas Marino Costeros – DIMARCO, Categorizado por Colciencias en A1.

2. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, se ha reconocido la necesidad de proteger las tortugas marinas mediante convenios internacionales como el CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (Mazaris *et al.*, 2014) , junto a leyes, decretos y lineamientos nacionales como el *Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales de Colombia* (2002), el cual tiene como visión “lograr en el año 2022 la conservación y manejo sostenible de las especies de tortugas en Colombia” (Ministerio del Medio Ambiente, 2002).

En la Lista Roja de Especies de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza-UICN, *C. caretta* ha sido clasificada en la categoría “Vulnerable” (VU) (UICN, 2017) y en el Libro Rojo de reptiles amenazados de Colombia de Morales-Betancourt *et al.*, 2015 como en “Peligro crítico” (CR); por lo cual, es indispensable realizar actividades de investigación sobre el estado actual de la especie, en procura de generar conocimiento para su adecuado manejo y preservación (Naranjo y Amaya, 2009).

La tortuga caguama cumple un rol fundamental dentro del ecosistema marino, está posicionada en la parte alta de la red trófica (Deehr *et al.*, 2014), desarrollando una función vital al controlar organismos que al proliferarse pueden alterar el equilibrio, ocasionando pérdidas incalculables, tanto económicas como ecológicas, tal como ocurre sobre la influencia de los pastos marinos y sus asociaciones, donde controlan su proliferación alimentándose de estos (Heithaus *et al.*, 2014).

Las tortugas marinas, son un bioindicador ambiental (González-Zuarth *et al.*, 2014), al proteger y conservar la especie, se asegurará la preservación del medio marino en general, y todos los beneficios que esto conlleva; por otra parte, si se permite que las poblaciones de tortugas disminuyan (cuellos de botella), su variabilidad genética se verá reducida también, lo cual las haría susceptibles a enfermedades y cambios climáticos (Povh *et al.*, 2008; Jamieson, 2011).

Estudios en el campo de la variabilidad genética, ofrecen las herramientas necesarias para crear programas de conservación y protección de las especies; diversas acciones como la designación de reservas naturales, el establecimiento de corredores marinos entre poblaciones aisladas, la reducción de la contaminación y la degradación ambiental, entre otras, ayudarán a mantener el nivel más alto posible de variabilidad genética y evitar la extinción, a este campo se le denomina genética de la conservación y se fundamenta en tres diferentes pilares: administración genética de poblaciones pequeñas para maximizar la retención de diversidad genética y minimizar la endogamia; resolución de incertidumbres taxonómicas y delimitación de unidades de gestión (Frankham *et al.*, 2003).

Debido a los significativos alcances obtenidos por el ProCTMM, en el tema de conservación de las tortugas marinas, se hace relevante mantener la implementación y desarrollo de herramientas científicas de punta que permitan dar continuidad a los estudios de variabilidad genética de *C. caretta*, como a la estandarización de técnicas no invasivas para la obtención de material genético que generen la mínima afectación a los ejemplares analizados, con el fin de consolidar medidas de manejo más eficientes, de acuerdo a lo enunciado por Poschadel y Möller (2004); Lanci *et al.* (2012) y Torres-Rodríguez *et al.* (2017).

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 GENERALIDADES

3.1.1 Descripción de la especie *C. caretta*

La tortuga *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) o también llamada por su nombre común tortuga caguama, pertenece a la familia *Cheloniidae* (Figura 1), se encuentra distribuida en zonas

templadas y subtropicales; anida y forrajea en franjas insulares y continentales donde es frecuente encontrar pastos marinos, algas, arrecifes de coral que albergan gran cantidad de organismos para su consumo; y como la mayoría de las tortugas marinas, realiza largas migraciones durante todo su ciclo de vida (Luschi *et al.*, 2003). Es un organismo marino destacado por su rol ecológico, trasladando productividad entre ecosistemas mediante el transporte de nutrientes, a través de sus áreas ecológicas: áreas de desarrollo, tránsito, alimentación y forrajeo, reproducción y anidación (Deehr *et al.*, 2014). Realiza un aporte de biomasa representada en huevos no eclosionados y crías que ingresan a la red trófica, siendo presas de depredadores marinos y costeros (UICN, 2017).



Figura 1. Tortuga *Caretta caretta*. Foto archivo ProCTMM (2019)

3.1.2 Áreas ecológicas

Las áreas ecológicas, están directamente relacionadas con la historia de vida de la tortuga y se caracterizan por tener cambios constantes y ontogénicos que, a su vez, influyen directamente sus diferentes estadios de vida (Congdon *et al.*, 1994). Con respecto a las áreas de anidación, las tortugas marinas las eligen teniendo en cuenta ciertas características específicas, las predilectas son las playas abiertas y arenosas; de fácil acceso al mar; arena suficientemente húmeda y fina que permita la difusión de gases producidos por los huevos en incubación; ausencia o muy poca iluminación artificial; altura

adecuada que permita el ascenso de las hembras a la misma, pero que no se inunde con las mareas; y con vegetación en la zona alta (Mortimer, 1985). La tortuga caguama en específico, prefiere litorales con salientes rocosos o arrecifes de baja profundidad que parecen servirle de orientación en el mar para llegar a la playa de anidación; igualmente prefiere áreas de arena de sílice, aunque también se ha observado en costas coralinas (INVEMAR, 2002).

Esta especie en sus primeros años de vida, se mantiene en áreas ecológicas de tránsito, en un hábitat pelágico, a merced de las corrientes, vientos y épocas climáticas, flotando en nudos de sargazo en mar abierto; a esta etapa se le conoce como los “años perdidos,” haciendo referencia a la poca información con la que se cuenta, desde el momento que parten de la playa de nacimiento, hacia mar abierto (Witham, 1980). La evidencia sugiere que pasan de 1 a 10 años de su vida aproximadamente, alimentándose de presas plantónicas a la deriva, especialmente en frentes y zonas de convergencia durante esta etapa (Musick y Limpus, 1997).

Se ha logrado demostrar con claridad en las costas orientales de la Florida (USA), el comportamiento de la tortuga *C. caretta* en sus años juveniles; al eclosionar y buscar su camino hacia mar abierto, ingresa en la corriente de Florida y posteriormente a la corriente del Golfo para abrirse paso hacia un viaje transoceánico, hasta llegar al océano Atlántico Oriental (Carr, 1987). Posteriormente, permanecen algunos años en la corriente del Atlántico Norte, hasta alcanzar una madurez sexual y regresar a sus costas natales por medio de la corriente Ecuatorial del Norte hacia el Atlántico occidental (Bowen y Karl, 2007).

Al crecer y alcanzar un largo de caparazón entre los 40 cm (en el Atlántico) a 80 cm (en Australia), se trasladan a aguas menos profundas para alimentarse tanto en suelos blandos como duros (Bjorndal, 1997). En esta fase adulta, existen dos principales movimientos que son patrones constantes en la tortuga *C. caretta*. Se trasladan entre la playa de anidación y un área de alimentación específica utilizada durante todo el proceso inter reproductivo, en estos casos, los individuos nadan para completar sus viajes, con una posible advección (transporte) debido a las corrientes; aunque algunas veces, los ayudan a alcanzar su objetivo rápidamente, de igual manera les proporcionan desafíos de navegación (Hays *et al.*, 2002; Luschi *et al.*, 2003).

La tortuga caguama usa específicamente el “Frente de Transición de Clorofila”, denominado TZCF por sus siglas en inglés “Transition Zone Chlorophyll Front” y el borde sur de la “Extensión de la Corriente de Kuroshio” o KEC; estas corrientes, cuentan con termoclinas poco profundas y un fuerte gradiente de temperatura y clorofila, creando aguas productivas ricas en nutrientes y posiblemente una comunidad biológica ideal para su desarrollo. En el TZCF y la KEC, se forman eddies ciclónicos girando en sentido contrario de las manecillas del reloj, creando afloramientos en el centro y convergencia en el borde, donde las presas predilectas de la tortuga suelen concentrarse (Polovina *et al.*, 2004); las más comunes, son organismos flotantes y los que viajan en asociación a gasterópodos y cangrejos pelágicos (Parker, 2002), al igual que anémonas, caballitos de mar, peces, gusanos y camarones, en arribazones de plantas vasculares, material a la deriva y algas marinas como el sargazo (INVEMAR, 2002).

3.1.3 Ciclo de vida

Esta especie, se caracteriza por presentar estrategias evolutivas de tipo K, exhibiendo un ciclo de vida longevo, donde tardan entre 20 y 30 años en alcanzar la madurez sexual, produciendo pocos descendientes (Machado y Bermejo, 2012). Es migratoria y posee áreas de anidamiento específicas; donde el sexo es determinado por variación térmica de la arena, dado a que no poseen cromosomas sexuales (Álava *et al.*, 2006). La tolerancia térmica de anidación oscila entre 25 a 35 °C, temperaturas fuera de este rango pueden ser letales. Si se registran valores constantes superiores a 32 °C provocará que se produzcan más hembras, hasta llegar a la que se conoce como “temperaturas feminizantes”, es decir, se producirán 100% hembras, por el contrario, si se presentan valores continuos menores a 28 °C, se obtendrá 100% machos, conocidas como “temperaturas masculinizantes”; mientras que, en valores intermedios, la relación de machos y hembras es 1:1 (CONAP, 2013). Es relevante señalar, la influencia del calentamiento global en la incubación de huevos, ya que las altas temperaturas a nivel mundial han ocasionado el incremento de hembras por nido y por consecuente, la disminución de la fecundidad de los huevos, al reducirse el número de machos (Márquez y Jiménez, 2010).

En cuanto a su fase reproductiva, la tortuga caguama tiene una alta presión depredatoria sobre sus neonatos; de cada mil huevos, tan solo uno logra llegar a una edad avanzada (Marco *et al.*, 2009). Al crecer, la especie se ve afectada por factores antropogénicos previamente relacionados, han disminuido drásticamente en las últimas décadas sus

poblaciones a nivel mundial e impidiendo que se estabilicen naturalmente, aumentando con ello sus riesgos de extinción (Bell *et al.*, 2006). En regiones como Cabo Verde (África), donde años atrás las playas de anidamiento eran abundantes, hoy han desaparecido considerablemente (Marco *et al.*, 2008). Caso similar se evidencia en la Florida, donde se ha reducido más de un 50 % sus poblaciones y que al ser las del Atlántico una de las 10 metapoblaciones de caguamas más amenazadas del mundo, se convierte en un tema alarmante, ya que las mayores concentraciones de anidación se ubican en Estados Unidos, reportando aproximadamente el 90 % del esfuerzo reproductor, en esta cuenca oceánica (Ruiz, 2008).

En el país la situación es muy similar, las zonas de anidación han sido reducidas drásticamente y en la actualidad, existen en promedio 127 playas de anidación representando 534.58 km lineales, lo que corresponde a 32.4 % del total de la línea de costa del Caribe colombiano; cabe resaltar que esta especie, es la que menos extensión de playa utiliza para anidar, con apenas 360 km aproximadamente y con poca abundancia de nidos (INVEMAR, 2002).

Los estudios relacionados, se han basado más en la conservación de estas especies y sus hábitos reproductivos, protección de las playas de anidamiento y zonas de alimentación, viéndose tan solo en los últimos años, el interés por su ecología molecular ante la relevancia de que cuando el tamaño de una población es relativamente bajo, se puede producir un efecto cuello de botella y desencadenar cambios en las frecuencias alélicas y en consecuencia, aumentar la probabilidad de endogamia, disminución de heterocigosidad y pérdida de diversidad genética (Ceballos-Fonseca, 2004).

3.1.4 Usos del ADN mitocondrial en *C. caretta*

En primera instancia, es prioritario entender una serie de conceptos relacionados como el haplotipo, definido como el conjunto de variaciones de ADN, o polimorfismos que tienden a ser heredados (The international HapMap Consortium, 2003). Los haplotipos mitocondriales (ADNmt), han sido una herramienta fundamental para la identificación de colonias anidantes y su relación con las zonas de forrajeo; estas colonias han sido determinadas por uno o más cambios, en un par de bases nucleotídicas en las secuencias (Franco-Espinosa y Hernández-Fernández, 2017).

Por medio de esta herramienta, es posible asociar individuos con ciertas regiones geográficas y distinguirlas de cada una de estas poblaciones, teniendo en cuenta la información de los linajes maternos obtenidos de los marcadores mitocondriales (Hatase *et al.*, 2002a). El ADNmt, es esencial para evidenciar la estructura genética de las hembras anidantes, teniendo en cuenta su comportamiento denominado filopatría, que en otras palabras es la peculiaridad que permite a las tortugas marinas, retornar a su lugar o área geográfica de nacimiento décadas después para anidar (Waser y Jones, 1983); dichos ejemplares, poseen características relacionadas genéticamente con sus ancestros, compartiendo haplotipos que en éste caso, serían variantes genéticas de una región del genoma mitocondrial (Okuyuma y Bolker, 2005).

El ADNmt, se caracteriza por ser una molécula circular de doble cadena, la cual contiene 37 genes que codifican para 22 RNA de transferencia (tRNA), 2 RNA ribosomal (rRNA), 13 proteínas y una región no codificable mayor, denominada región control o D-loop (Drosopoulou *et al.*, 2012). Estos marcadores (ADNmt), revelan una estructura genética fuerte entre las colonias anidantes de *C. caretta* (Bowen *et al.*, 2004; Bowen y Karl, 2007); su principal objetivo es dilucidar unidades poblacionales y filogenia en múltiples animales (Ruiz, 2008).

Si las poblaciones de *C. caretta* se ven disminuidas, pueden ocurrir efectos cuello de botella y disminuir drásticamente su diversidad; adicionalmente, la deriva genética puede afectar también la variabilidad genética, cambiando de manera aleatoria las frecuencias de nucleótidos únicamente por azar, sin importar si dichos cambios sean beneficiosos o perjudiciales (Hartl y Clark, 1997). Debido a que en poblaciones de mayor tamaño las fluctuaciones no son tan grandes, se espera que mantengan niveles de variación genética mayores que en las poblaciones pequeñas (Rocha y Gasca, 2007). La frecuencia de los haplotipos del ADNmt está relacionada con estos eventos y brindan respuestas o señales de diferentes procesos a nivel poblacional; adicionalmente, son un eficiente identificador de patrones de colonización, incluyendo los eventos fundadores y los caminos evolutivos de los linajes (Karl y Avise, 1992; Avise, 2004).

Históricamente ciertos haplotipos basales y ancestrales se han fijado a determinadas regiones geográficas a lo largo del mundo, estas áreas específicas son catalogadas como Unidades de Gestión o MU, por sus siglas en inglés Management Units; que en este

contexto se definen como colonias con diferencias significativas en las frecuencias haplotípicas del ADNmt (Moritz, 1994), y dichas colonias se consideran aisladas demográficamente con respecto al reclutamiento materno (Shamblin *et al.*, 2014).

Los marcadores mitocondriales pueden ser utilizados para definir las MUs, debido a que el hogar materno define los límites de la colonia reproductiva, aunque es posible que ocurran flujos genéticos entre colonias de anidación diferentes como lo define el ADNmt, cuando se mezclan las tortugas en áreas de alimentación y forrajeo, o a lo largo de los corredores de migración (Bowen *et al.*, 2005). La caracterización adecuada de las MUs, es importante para definir la escala a la que las colonias deben manejarse como agregaciones demográficamente autocontenidas, con respecto al reclutamiento de hembras anidantes (Shamblin *et al.*, 2014); por ejemplo, regiones geográficas que albergan altas densidades de sitios de anidación, posiblemente de múltiples especies y / o poblaciones genéticas, merecen la inversión de recursos y de estrategias de conservación (Wallace *et al.*, 2010; Hamann *et al.*, 2010).

A nivel global, se han categorizado nueve regiones de anidación significativas como Unidades de Gestión Regional (RMU), basadas en consideraciones genéticas, demográficas, geográficas y oceanográficas como se muestra en la Figura 2

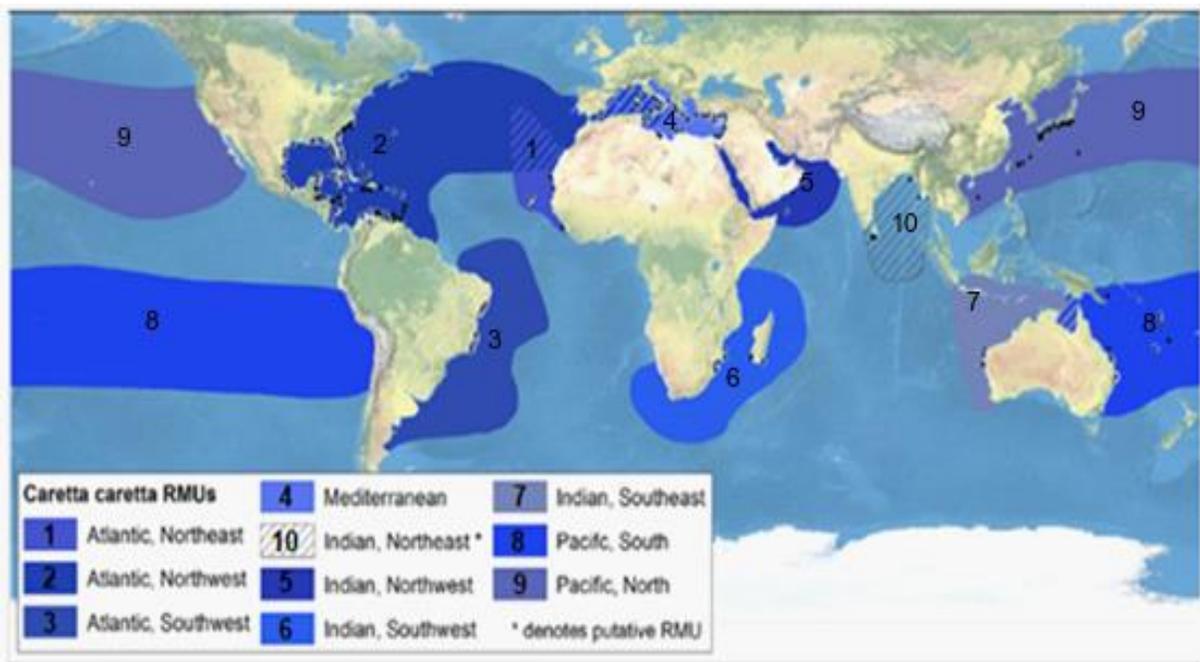


Figura 2 (Wallace *et al.*, 2010).

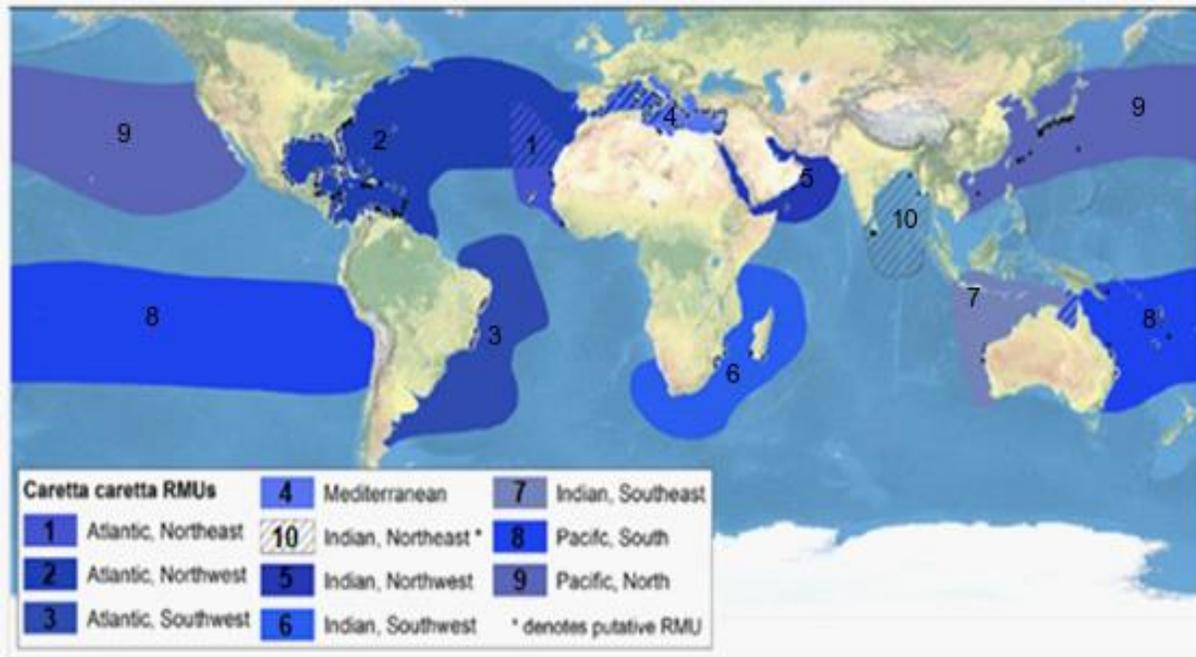


Figura 2. Unidades regionales de gestión multiescala para tortugas caguama *Caretta caretta*. 1) Océano Atlántico Noroeste, 2) Océano Atlántico Noreste, 3) Océano Atlántico Suroeste, 4) Mar Mediterráneo, 5) Océano Índico Suroeste, 6) Océano Índico Noroeste, 7) Océano Índico Sureste, 8) Océano Pacífico Norte, y 9) Océano Pacífico Sur con una décima RMU propuesta para el Océano Índico Nororiental para la cual faltan datos genéticos y biológicos. Modificado de Wallace *et al.*, 2010.

Diversos estudios basados en fragmentos de 380 pares de bases (pb) de la región control mitocondrial, han demostrado que ciertos haplotipos se han fijado históricamente a determinadas regiones como es el caso del haplotipo CC-A2, que está presente en todas las colonias en el Atlántico y el Mediterráneo, excepto en el sureste de los Estados Unidos, específicamente al norte de Florida y las principales agregaciones de anidación brasileñas, donde el haplotipo predominante es el CC-A4 (Reis *et al.*, 2010). De igual manera, el haplotipo CC-A1 es el más común y generalizado entre las colonias del Atlántico norte, según Bowen *et al.* (2005); Monzón-Argüello *et al.* (2009) y Shamblin *et al.* (2011).

Las colonias pertenecientes al Caribe colombiano, se consideran parte de la RMU del Océano Atlántico Noroeste (Conant *et al.*, 2009), y como lo han referido Franco-Espinosa y Hernández-Fernández (2012; 2017), los haplotipos que históricamente han presentado mayor frecuencia en la región, son el CC-A1 y el CC-A2. Dichos haplotipos ancestrales, pueden evidenciar diversas sustituciones y modificaciones a lo largo del tiempo, producto

de caminos evolutivos y condiciones medio ambientales diferentes, dando origen a nuevos haplotipos, tal como lo muestran Shamblin *et al.* (2011) en la Figura 3.

Ahora bien, para lograr trabajar con el genoma mitocondrial de la tortuga caguama, se requiere realizar la reacción en cadena de la polimerasa o PCR; por medio de esta, se obtienen fragmentos de interés amplificados del ADNmt de la especie (Ruiz, 2008); esta técnica se aplica una vez extraído el ADN, el cual se obtiene por medio de frotis bucal, usando un hisopo de algodón que se gira 360° en las bolsas mucosas, debajo de la lengua del animal. Este procedimiento debe efectuarse sin tanta presión, un contacto más fuerte puede causar sangrado en las tortugas (Poschadel y Möller, 2004).

El frotis bucal es versátil, rápido y permite tomar una muestra con suficiente ADN, sin perturbar al animal como si sucede con otros métodos invasivos como la toma de tejido (Lambertsen, 1987) o muestra de sangre (Davis *et al.*, 2001); una ventaja adicional, es su sencillo almacenamiento y transporte en comparación; todos los animales deben mantenerse húmedos para evitar la deshidratación, según lo expuesto por Lanci *et al.*, (2012).

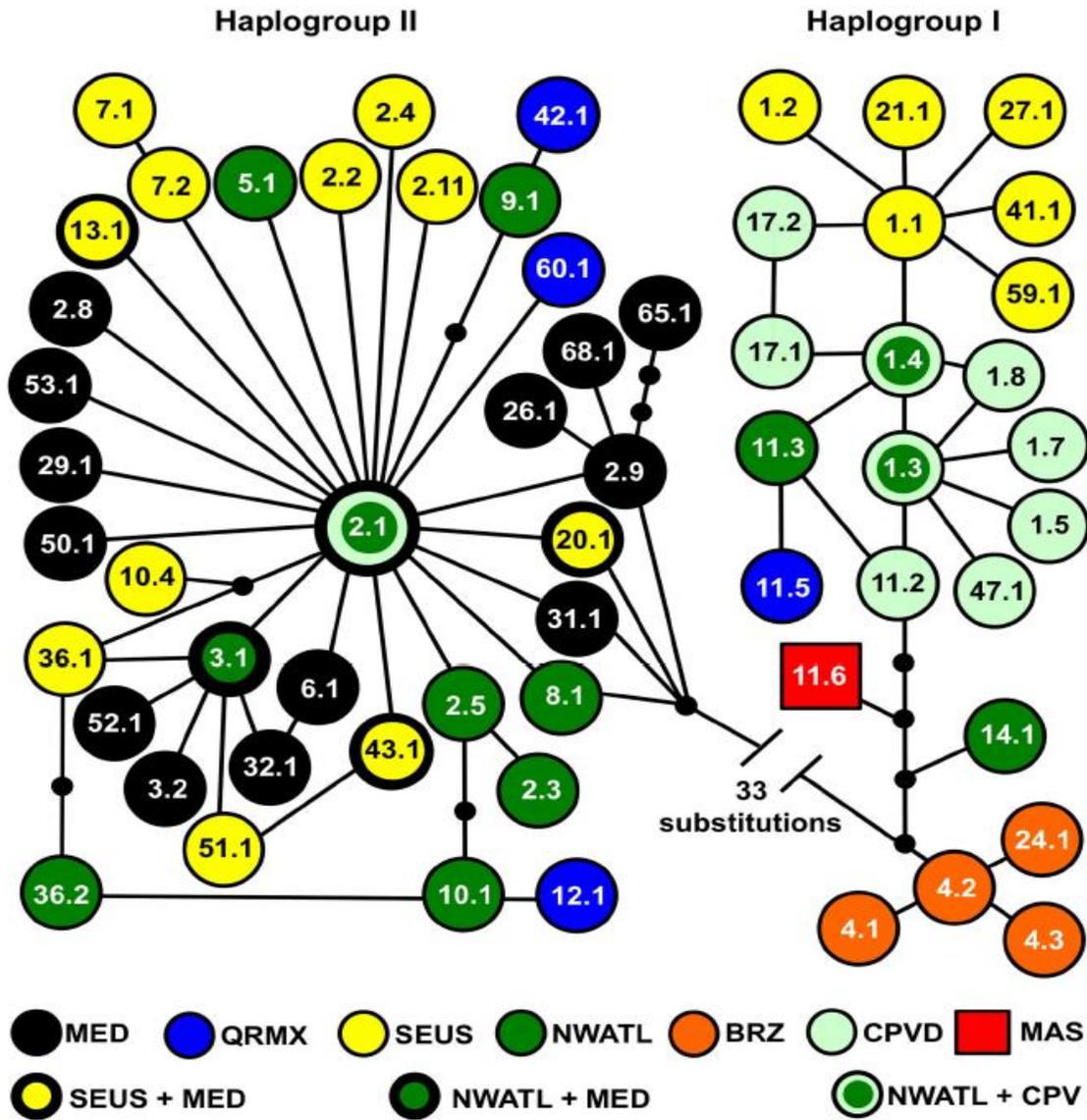


Figura 3 Red de parsimonia sin ancestro para haplotipos de tortugas caguama de 800 pares de bases en el Atlántico, el Mediterráneo y el Océano Índico occidental. MED: Mediterráneo, QRMX: Quintana Roo México, SEUS: Sureste de Estados Unidos, NWATL: Atlántico Noroeste, BRZ: Brasil, CPVD: Cabo Verde, MAS: Masirah Island (Omán). Tomado de Shamblin *et al.*, 2011.

3.2 ESTADO DEL ARTE

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se implementó en la década de los 90 (Mullis y Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988), permitiendo amplificar segmentos de ADN de importancia para su posterior análisis, partiendo desde un mínimo; sus aplicaciones varían en los diferentes campos de la ciencia y fue la herramienta clave para las investigaciones poblacionales en biología molecular. Posteriormente, se realizaron estudios de la

composición genética de las tortugas marinas, llegándose a conocer la organización de las poblaciones en términos de variabilidad y estructura, partiendo de datos genéticos, lo cual ha posibilitado evidenciar el grado de amenaza de las mismas (Shamblin *et al.*, 2014).

Para la toma de muestras de ADN, usando un procedimiento menos invasivo, Poschadel y Möller (2004) describieron el protocolo por frotis bucal aplicado en pequeños reptiles y anfibios, efectuando extracciones exitosas en cuatro especies de Testudinidae, seis especies de Salamandridae, cuatro especies de Ranidae y una especie de Bufonidae. Estas muestras se tomaron por medio de un hisopo de algodón ordinario y almacenado en 70 % de etanol; igualmente otros autores como Lanci *et al.*, (2012) y Torres-Rodríguez *et al.*, (2017), trabajaron con tortugas marinas realizando frotis bucal en sus muestreos, obteniendo muestras de buena calidad y fácil manejo.

Meylan *et al.* (1990), trabajaron la teoría del "Natal Homing" en tortugas marinas, encontrando un alto grado de estructuración genética mitocondrial en relación a sitios específicos de anidación, teniendo en cuenta las altas tasas migratorias de estos organismos, las rutas de desplazamiento y la relación entre poblaciones, a tal punto que ha sido posible la identificación del origen de las tortugas descartadas por pesquerías por medio de marcadores mitocondriales y nucleares (Garofalo *et al.*, 2013).

Por otro lado, se posibilitó establecer la conectividad entre poblaciones (Meylan *et al.*, 1995; Bowen *et al.*, 2004; Bowen y Karl 2007), reafirmando el Natal Homing por medio del análisis de stock mixto (usando un algoritmo bayesiano) señalando que los juveniles de *C. caretta* con frecuencia transitaban la vecindad de su colonia natal, señalando su reciente distribución a través de las cuencas oceánicas en comparación a otras especies de tortugas marinas.

Bowen *et al.* (1993a, realizan su estudio en filogenia molecular de las tortugas marinas utilizando secuencias de nucleótidos del gen citocromo b, realizando relaciones ancestrales evolutivas y concluyendo que el ADNmt en las tortugas marinas evoluciona mucho más lento en comparación a otros vertebrados; este ritmo lento de reemplazo de nucleótidos se vincula con la longevidad de la generación y su ritmo metabólico.

Bass *et al.* (1996) trabajaron con la especie *Eretmochelys imbricata* probando dos hipótesis sobre la elección del sitio de anidación de las hembras, el “natal homing” y la facilitación social; posteriormente Bass y Witzell. (2000) realizan un análisis de stock mixto para determinar la composición demográfica de *Chelonia mydas* en la Florida por medio de ADNmt.

Encalada *et al.* (1998), analizaron 249 secuencias de ADNmt del Atlántico y el Mediterráneo, identificando 10 haplotipos entre 1987 y 1993 provenientes de diez principales áreas anidación, identificando dos linajes filogenéticos distintos.

Yilmaz *et al.* (2011) investigaron la estructura genética de *C. caretta*, evaluando las costas de Turquía y zonas de anidación cercanas. Analizaron 258 individuos de 18 lugares diferentes, detectando 7 haplotipos registrados previamente en colonias anidantes del Mediterráneo y el Atlántico, con la novedad de 3 haplotipos nuevos identificados para la región.

En Brasil y Uruguay, Caraccio *et al.* (2008) evaluaron el ciclo de vida de la tortuga caguama, a través del análisis 43 secuencias de ADNmt, identificando en la plataforma continental de Uruguay el haplotipo CC-A4, el cual se encuentra únicamente en colonias anidadoras de Brasil, paralelamente en las tortugas provenientes de áreas oceánicas se reconocieron haplotipos que pertenecen a colonias anidadoras distantes como el “CC-A2” (presente en USA, México, Grecia y Turquía), “CC-A11” (presente en USA), “CC-A33” y “CC-A34” los cuales se encuentran en el Océano Pacífico, sugiriendo que algunos individuos adultos se desplazan sobre la plataforma continental realizando migraciones tróficas desde las playas de anidación en Brasil hacia latitudes mayores. Sin embargo, tortugas juveniles, pertenecientes a diversas colonias anidadoras, realizan migraciones tróficas hacia áreas de alta productividad en aguas abiertas del Océano Atlántico Sudoccidental.

Matsuzawa *et al.* (2016) evalúan 555 muestras provenientes de 12 áreas de anidación diferentes en el Pacífico Noroccidental, identificando 9 haplotipos de los cuales 1 es reportado esporádico en colonias anidantes del Pacífico Norte, pero con abundancia en las costas japonesas.

Ruiz (2008), desarrolló su tesis de doctorado, llevando a cabo un análisis regional en el suroeste de Cuba, en genética poblacional y filogeografía de la tortuga *C. caretta* y *C. mydas*, usando ADNmt y comparando sus resultados con secuencias publicadas a nivel mundial por la literatura y bases de datos.

En Colombia, las investigaciones se han basado principalmente en caracterizar los hábitos reproductivos de la especie como también en conservar las playas de anidación y las zonas de alimentación (Ceballos-Fonseca, 2004; Rincón-Díaz y Rodríguez-Zárate, 2004). Por su parte el Ministerio De Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, junto con INVEMAR, generaron el documento “Áreas de Anidación y de Alimentación de las Tortugas Marinas en el Caribe colombiano”, en el 2002, asumiendo las directrices referidas en el Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales del MMA (2002).

Igualmente, se han adelantado estudios de patrones migratorios, analizando el estado de conservación de las poblaciones y las historias de vida; al respecto, López *et al.* (2008), describen el complemento cromosómico de la especie, mientras que Franco (2010) propone un modelo para determinar, la relación de individuos de *C. caretta* que utilizan playas del Caribe colombiano como zonas de alimentación y anidación, con otras colonias del Atlántico y Mediterráneo.

En el año 2011, Lancheros redacta el primer acercamiento para la identificación taxonómica molecular de esta especie en Colombia, estableciendo una metodología utilizando etiquetas moleculares representadas por el gen mitocondrial COI, mediante PCR Extra- rápida, códigos de barras de DNA y RFLP's y así poder determinar, la biodiversidad en el Caribe colombiano. Martínez-Ortega y Hernández-Fernández (2013), estandarizaron marcadores moleculares RAPD-PCR, aplicando los principios generales del método Taguchi y de esta manera establecer su estructura genética y el número de migrantes entre grupos, donde lograron aplicar una metodología estandarizada, resumiendo el número de reacciones para la consecución de marcadores moleculares RAPDs, lo cual sirve como guía para estudios genético-poblacionales futuros.

El ProCTMM, vienen adelantado tesis de grado de estudiantes de pregrado y maestría como los trabajos de Hernández (2015); Quintero (2016); Fonseca (2016) y Espejo (2016), con los cuales se inicia el acercamiento a esta temática, utilizando como especie de estudio

a juveniles de *C. caretta*, que se encuentran en procesos de levante y posterior introducción al medio marino; a través de marcadores mitocondriales, implementando como técnica no invasiva los frotis bucales para la obtención del material genético de alta calidad y cantidad, buscando evaluar la variabilidad genética en de esta especie en la región de Santa Marta, donde se logró identificar que las playas de anidación de Mendihuaca, Don Diego y Guachaca, reciben organismos anidantes, provenientes del Mediterráneo, Noreste Atlántico y África, siendo estas zonas muy importantes también para el forrajeo.

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVO

4.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Siendo de vital importancia para los procesos de conservación, generar información de ecología molecular de la colonia anidante de *C. caretta* en el sector de Mendihuaca-Don Diego, cuyos juveniles han sido dispuestos a procesos de levante y posterior introducción al medio natural por el ProCTMM, se hace necesario determinar la variabilidad haplotípica de esta especie, mediante los análisis de la región control D-loop, en los ejemplares evaluados, y relacionarlos con otros ejemplares a nivel global y sus posibles áreas ecológicas.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variabilidad haplotípica de la colonia anidante de *C. caretta* en Mendihuaca-Don Diego, que se han dispuesto desde el 2014 a 2018 en fases de levante por el ProCTMM, mediante el uso de marcadores mitocondriales, y su relación con otros especímenes a nivel global y sus áreas ecológicas.

4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la variabilidad genética de la colonia anidante de tortugas *C. caretta*, sector Mendihuaca – Don Diego, considerando la diversidad haplotípica y nucleotídica.

- Evaluar la relación genética de la colonia anidante del sector Mendihuaca – Don Diego, con otras áreas de distribución global.
- Relacionar los haplotipos obtenidos de la colonia anidante de Mendihuaca – Don diego, con las posibles zonas de desarrollo, tránsito, alimentación y reproducción, reportadas a nivel mundial para la especie.

5. HIPÓTESIS

- Se espera evidenciar una baja variabilidad genética reflejado en la presencia de los mismos haplotipos, obtenidos en los estudios previos en el sector, como consecuencia de una fijación histórica correspondiente a los haplotipos basales CC-A2 y CC-A1.
- Se espera que la variabilidad genética de la colonia anidante de Mendihuaca-Don Diego tenga mayor relación con colonias anidantes del Atlántico Norte y el Caribe, que con colonias de Asia y Europa.
- Las áreas ecológicas de reproducción y forrajeo, serán los factores de mayor incidencia en la información disponible sobre la distribución haplotípica.

6. METODOLOGÍA

6.1 ÁREA DE ESTUDIO

El área de monitoreo abarcó el área de Mendihuaca (11°16'N y 73°51'O), y Don Diego (11°16'N y 73°45'O) en el departamento del Magdalena y hacen parte de la unidad ecosistémica del Parque Nacional Natural Sierra Nevada de Santa Marta. La información fue recolectada entre el año 2014 y 2018 (Figura 4 Figura 4).

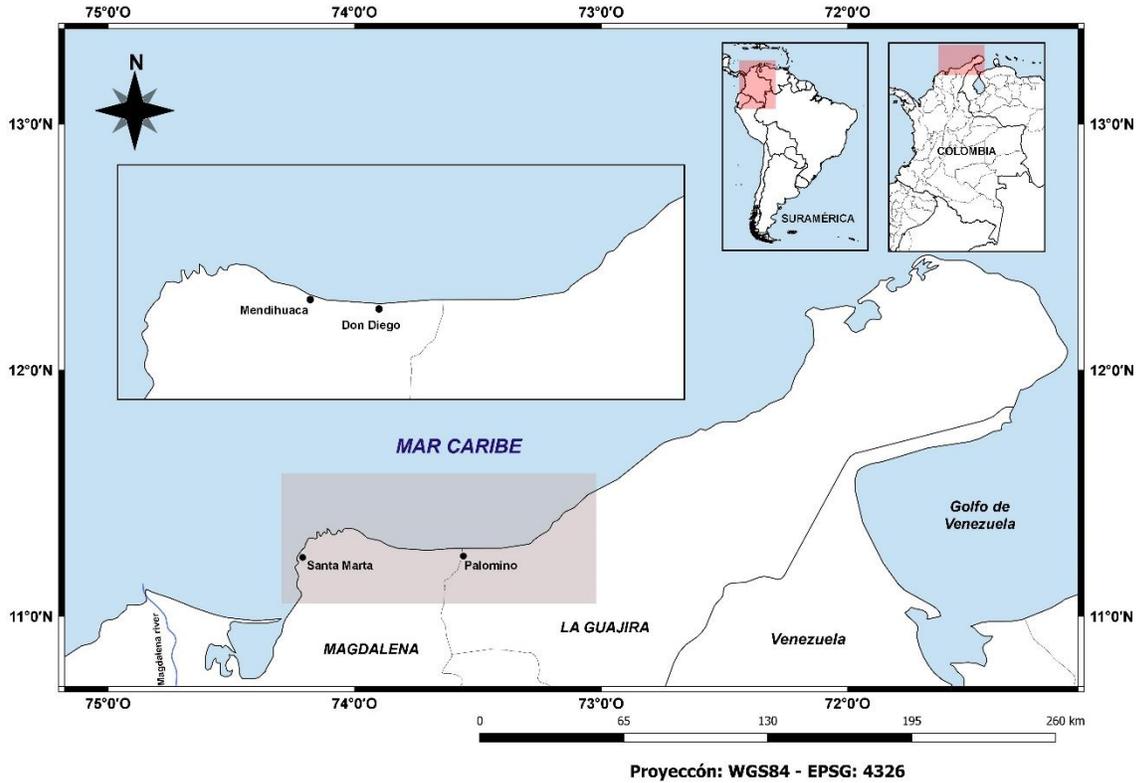


Figura 4. Área de estudio, Sector Mendihuaca-Don Diego, Caribe colombiano. Realizado por Camila Castellanos.

Durante las temporadas de anidación se llevaron a cabo las exploraciones de nidadas a través de recorridos nocturnos donde los huevos fueron transportados por el Programa de Conservación de Tortugas y Mamíferos Marinos – ProCTMM- a las instalaciones de la Universidad Jorge Tadeo Lozano – Acuario Mundo Marino, donde fueron dispuestas en sistemas cerrados, alcanzando características y capacidades adecuadas que proporcionen su desarrollo en el medio de manera efectiva, aumentando la probabilidad de supervivencia de los individuos (Figura 5 C y D).



Figura 5).

Se tomaron muestras de frotis bucal 74 muestras correspondientes a 17 nidos de juveniles de la tortuga marina *C. caretta*, en la temporada de anidación de 2018 (años previos ya habían sido recolectadas y procesadas las muestras), usando un hisopo de algodón común previamente esterilizado y realizando un correcto barrido por toda la cavidad para la toma de ADN (Figura 5 A).



Figura 5).

Previamente se efectuó una limpieza en el área con agua destilada para remover impurezas y se introdujo la muestra colectada dentro de un tubo plástico de 1.5 mL para conservarla, refrigerándose a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis. La toma de muestras de ADN, se llevaron a cabo siguiendo los principios de protección animal planteados por Bosch *et al.* en el año 2005, teniendo en cuenta que no es invasiva y evita que se genere algún tipo de estrés agudo sobre el espécimen. Para cada individuo se tomaron tres frotis (muestra y réplicas).



Figura 5. A) Toma de muestras de mucosas de tortuga caguama por medio de un hisopo común. **B)** Preservación del hisopo con la muestra de mucosa previamente tomada. **C) y D)** Sistemas cerrados de levante de la especie en las instalaciones de la Universidad Jorge Tadeo Lozano – Acuario Mundo Marino. Fotografías: ProCTMM.

6.2 ACTIVIDADES A DESARROLLAR

6.2.1 Extracción de ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo con 74 muestras correspondientes a 17 nidos, se emplearon dos protocolos diferentes, para el primer procedimiento se utilizaron sales preservadas en etanol, donde se efectuó una digestión inicial de tejido en solución Lisis (SDS 2%) y proteinasa K; posteriormente, se incubó por 18 h a 65°C, obteniéndose una precipitación de material proteico con solución de NaCl 5M y una precipitación de material genético con Isopropanol para una conservación final en Buffer TE (Fitzsimmons *et al.*, 1997); esta metodología se utilizó para las etapas previas al 2018. El segundo protocolo, se desarrolló utilizando el kit de aislamiento de ADN por saliva (Norgen Biotek Corporation, ON, CA, 2012), siguiendo las instrucciones del producto; este kit proporciona un

procedimiento rápido y sencillo de columna de centrifugación para aislar el ADN genómico de las muestras de saliva recolectadas (Figura 6).



Figura 6. Kit de aislamiento de ADN por saliva (Norgen Biotek Corporation, ON, CA, 2012).

Las extracciones se revelaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v en solución tampón TAE 1X y Gel Red.

6.2.2 Amplificación del ADNmt mediante la técnica del PCR.

Para el análisis del ADNmt, se realizó la técnica de PCR a 74 muestras de *C. caretta*, se evaluó un segmento de 815 pb de la región control D-loop por medio de la amplificación en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) y empleando los primers diseñados por Abreu-Grobois *et al.* (2006) LCM15382: (5'-GCTTAACCCTAAAGCATTGG-3'), H950 (5'-GTCTCGGATTTAGGGGTTT-3').

La PCR se desarrolló en un volumen total de reacción de 25 μ L, compuesto por 1X de Buffer, 0.1 X μ L de Taq polimerasa, 2mM MgCl₂, 0,3 mM dNTP, 0.6 μ M de cada primer por cada 2 μ L de ADN. Los parámetros de ciclo de la PCR, iniciaron con 94°C por 5 min seguido por 35 ciclos iniciando con 94°C por 40 seg, luego 49°C por 45 seg, un ciclo más de 72°C por 1 min y un periodo de extensión final de 72°C por 1 min. Para la detección de los fragmentos de ADN amplificado, se realizó una electroforesis en geles de agarosa del 2 %

sumergido en un tampón TAE 1X durante 35 min a 110 voltios. Se visualiza por exposición a la luz UV, efectuando previa tinción en GelRed en un fotodocumentador Biorad TM.

6.2.3 Determinación de la Diversidad genética de *C. caretta* en Mendichuaca – Don Diego

La secuenciación genética se obtuvo siguiendo el protocolo provisto por Applied Biosystems (BigDye® Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Kit Protocol) y la purificaron por medio del kit ExoSAP-IT de la casa comercial USB en los laboratorios de la Universidad de Los Andes en Bogotá, Colombia. La secuenciación se llevó a cabo en ambas direcciones, tanto forward como reverse, pero en el momento de editar las secuencias en MEGA 7, se utilizó la dirección forward para lograr estandarizar con el registro histórico de las secuencias de las etapas anteriores y tenerlas en la misma dirección.

Las 74 secuencias correspondientes a 17 nidos estudiados, se analizaron en el programa MEGA 7, eliminando el ruido presente mediante edición y alineando automáticamente usando la herramienta ClustalW. Además, se determinó el método de evolución o sustitución de nucleótidos que mejor se ajusta a la matriz de secuencias en el programa MEGA v. 7 y se verificó su identidad con información genética reportada a nivel global a través de BLAST en GenBank, esta herramienta compara secuencias de nucleótidos o proteínas con secuencias de bases de datos y calcula la similaridad estadística (Altschul *et al.*, 1997) y puede ser utilizada por medio de la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica o NCBI por sus iniciales en inglés.

Se caracterizó la diversidad genética de los haplotipos a partir de los índices de diversidad haplotípica (H), diversidad de nucleótido (promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias) (π) y la diversidad de secuencias (número promedio de diferencias de nucleótidos entre dos secuencias) (k) mediante el programa dnaSP 5 (Tajima, 1989).

6.2.4 Estructura poblacional de *C. caretta* en el sector Mendihuaca - Don Diego en relación a su distribución global

El análisis de estructura poblacional se realizó mediante distintos enfoques. En primera instancia, se efectuó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el fin de determinar los índices de distancia genética, el índice F_{st} , nos indica el grado de diferenciación entre

poblaciones; el F_{sc} señala el grado de diferenciación entre poblaciones dentro de los grupos formados y F_{ct} para identificar el grado de diferenciación entre los diversos grupos (Piñero *et al.*, 2008), para ello se empleó el software Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005).

Adicionalmente, se realizó una red de haplotipos y se estimó la distribución geográfica de los haplotipos por medio del programa PopART, para determinar la procedencia y distribución espacial de la especie con respecto a la información previamente depositada en la base de datos GenBank.

Se relacionó los haplotipos de *C. caretta* en el norte del Caribe de Colombia con las posibles zonas de desarrollo, tránsito, alimentación y reproducción, reportadas a nivel mundial para la especie, y se compararon con colonias anidantes a nivel mundial utilizando información publicada en revistas científicas y en GenBank (Tabla 3).

6.2.5 Consecución de información secundaria

Se adelantó una revisión exhaustiva sobre la consecución de información histórica disponible (secundaria), con énfasis en las áreas ecológicas de la especie ya identificadas, al igual que en bases de datos y direcciones electrónicas con estudios científicos de esta pertinencia, buscando su relación con la estructura haplotípica.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 RESULTADOS

7.1.1 Extracción y Secuenciación

La toma de muestras de ADN a los juveniles de *C. caretta* por frotis bucal y su posterior extracción por medio de los dos métodos planteados, fue exitosa; aun así, cabe resaltar que debido a que el proceso de extracción por sales demandó varios días en finalizar, se decidió implementar el kit de aislamiento de ADN por saliva, propuesto por Norgen Biotek Corporation, ON, CA (2012), el cual arrojó resultados en tan solo horas. Las 74 secuencias de la región control, fueron analizadas en el programa MEGA 7 y alineadas con ClustalW (Ver

Figura 7

Figura 7).

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv	Group Name		*
35. CC-L4-16-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
36. CC-L4-22-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
37. CC-L4-23-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
38. CC-L4-24-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
39. CC-L4-29-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
40. CC-L5-18-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
41. CC-L5-1-Etapa_12		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
42. CC-L5-20-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
43. CC-L5-21-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
44. CC-L5-2-Etapa_12		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
45. CC-L6-11-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
46. CC-L6-12-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
47. CC-L6-16-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
48. CC-L6-5-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
49. CC-L6-9-Etapa_11		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
50. CC-MAG-IX-N2-10		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
51. CC-MAG-IX-N2-14		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
52. CC-MAG-IX-N2-38		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
53. CC-MAG-IX-N2-40		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
54. CC-MAG-IX-N4-40		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
55. CC-MAG-IX-N4-45		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
56. CC-MAG-IX-N5-06		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
57. CC-MAG-IX-N5-08		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
58. CC-MAG-IX-N5-09		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
59. CC-MAG-IX-N5-33		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
60. CC-MAG-IX-N5-12		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
61. CC-MAG-IX-N5-18		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
62. CC-MAG-IX-N6-21		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
63. CC-MAG-VIII-635		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	
64. CC-MAG-VIII-646		T T A A A C A T A A A A A C T T - A T T A A T T T T G C A T A A A C T G T T T T G T T A C A G A C T A T T A T A C A G G T A A T A G G A A T G A A A T G A	

Figura 7. Alineamiento de secuencias de individuos de *C. caretta* de la región.

Las secuencias consideradas, fueron obtenidas de 17 nidos correspondientes a los procesos de levante entre los años 2014-2018, distribuidas en 4 haplotipos, se relacionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Frecuencia de haplotipos de la región control de la ADNmt de *C. caretta* a lo largo de los años 2014-2018.,

Año	Etapa	Estudio	Haplotipos							
			2.1		43.1		17.1		1.4	
			Ind	Nido	Ind	Nido	Ind	Nido	Ind	Nido
2014	VIII	Hernández	4	2	4	1	5	1	0	0
2014	VIII	Quintero	9	1	0	0	0	0	5	1
2015	IX	Fonseca	10	1	0	0	0	0	0	0
2016	X	Fonseca	0	0	0	0	2	1	11	2
2017	XI	Lozano	11	2	5	1	0	0	3	1
2018	XII	Cacante	0	0	0	0	0	0	5	3
Total			34	6	9	2	7	2	24	7
Porcentaje			46	35,3	12,2	11,8	9,5	11,8	32,4	41,2

Los haplotipos identificados, se cotejaron por medio de la herramienta BLAST, a través de la página web de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y se confirmó la procedencia de los mismos, tal como lo refiere Shamblin *et al.* (2014).

En los juveniles de *C. caretta* evaluados, los haplotipos CCA1.4 y CCA2.1 fueron los más frecuentes con 7 y 6 nidos respectivamente; estos haplotipos tienen presencia en colonias anidantes en el Atlántico Noreste, Mar Mediterráneo y Cabo Verde. Además, hacen parte de los llamados haplotipos basales fijados por eventos históricos en determinadas áreas geográficas. El CCA2.1 es el principal haplotipo del Haplogrupo II, mencionado por Shamblin *et al.* (2014).

El haplotipo CCA43.1 se reportó tan sólo en las etapas de levante VIII (2014) y XI (2017) con dos nidos. Este se ha localizado en el Sureste de Estados Unidos y el mar Mediterráneo, haciendo parte del Haplogrupo II derivando del CCA2.1. El otro haplotipo reportado es el CCA17.1, que al igual que el anterior, se presentó en dos nidos y fue registrado en las etapas VIII y X, este se deriva del 1.4, con presencia en Cabo Verde (Tabla 2).

Tabla 2 Haplotipos obtenidos del GenBank con sus códigos y ubicaciones de reporte (Shamblin *et al.*, 2014)

Haplotipo	Gen Bank #	Procedencia
CCA2.1	EU179445	Atlántico Noreste, Mediterráneo y Cabo verde
CCA43.1	HQ908657	Sureste de Estados Unidos y Mediterráneo
CCA17.1	KF840727	Cabo Verde
CCA1.4	EU179439	Atlántico Norte

Adicionalmente, se determinó el modelo T92 Tamura, como el esquema evolutivo ideal, y se construyó un árbol de máxima similitud basado en la región control D-loop, usando el método Bootstrap con 1000 repeticiones, confirmando la clara presencia de 2 grupos, predominando el haplotipo 2.1 y el 1.4, de los cuales se derivan los haplotipos 43.1 y 17.1 consecutivamente (Figura 8).

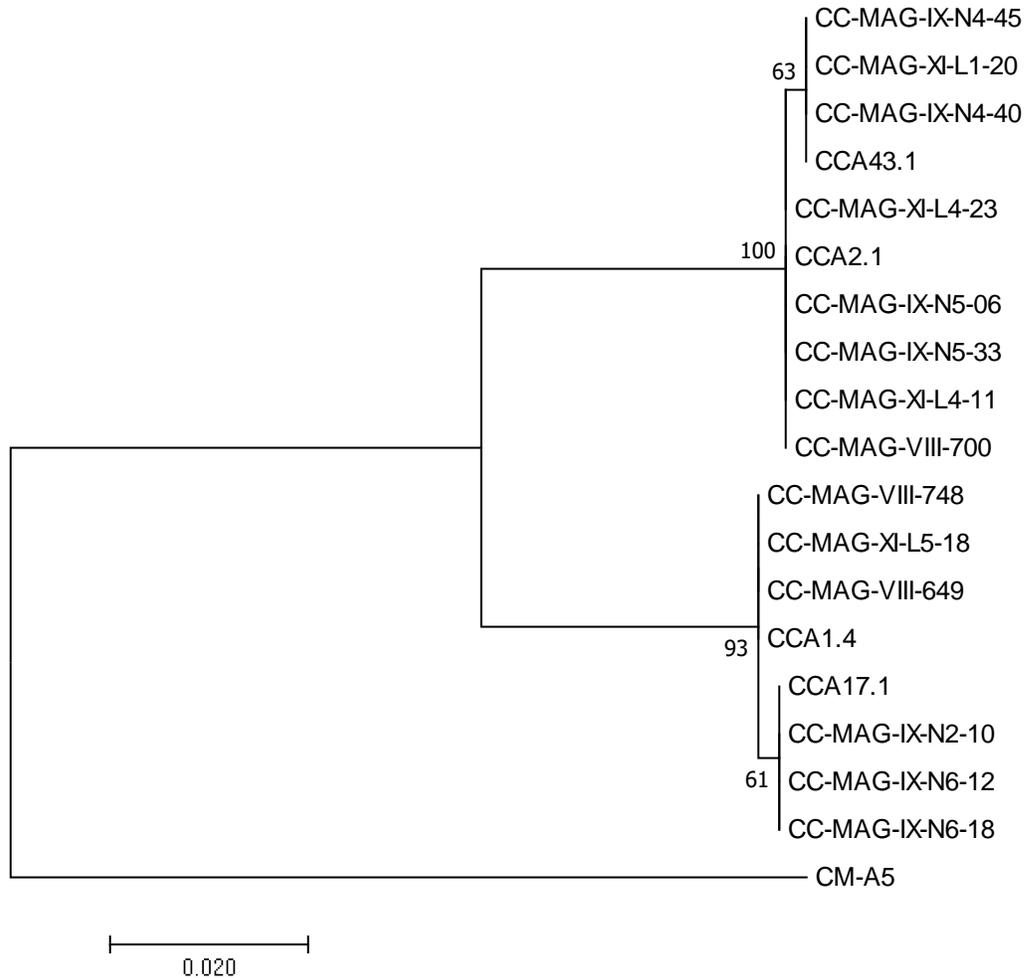


Figura 8 Árbol de máxima similitud basado en la región control del ADNmt de juveniles de *C. caretta* y un haplotipo externo (*Chelonia mydas*), usando el método Bootstrap con 1000 repeticiones. Árbol resumido, para la facilidad del lector. Árbol completo en anexos.

7.1.2 Análisis de información secundaria

Los resultados se compararon con datos de colonias anidantes a nivel mundial, reporte de varamientos y pesca por bycatch; se utilizó también información publicada en revistas científicas y en GenBank (Tabla 3). Adicionalmente, teniendo en cuenta los 4 haplotipos registrados en el sector Mendihuaca-Don Diego, se compararon e identificaron su representatividad en las diferentes áreas ecológicas alrededor del mundo, información presentada en la Tabla 4

Tabla 3. Tabla comparativa de diversidad haplotípica y nucleotídica de diferentes poblaciones de *C. caretta*. Donde Nidos = número de nidos; H = número de haplotipos; DH = diversidad haplotípica; π

= diversidad nucleotídica (Yilmaz *et al.*, 2011, Monzón-Argüello *et al.*, 2012; Garofalo *et al.*, 2013; Shamblin *et al.*, 2014; Clusa *et al.*, 2018).

Ubicación	Nidos	H	DH	π	%
Albania	2	2	1	0,00162	0,162
Brasil	5	2	0,9	0,00228	0,228
Canarias	4	3	0,833	0,0336	3,36
Cabo Verde	10	4	0,867	0,00445	0,445
Francia	2	2	1	0,04568	4,568
Grecia	1	1	*	*	*
Israel	4	4	1	0,0035	0,35
Italia	6	6	1	0,01925	1,925
Japón	2	2	1	0,01066	1,066
Kuwait	1	1	*	*	*
Líbano	2	2	1	0,00323	0,323
Atlántico Norte	39	22	0,937	0,02428	2,428
Omán	3	3	1	0,0348	3,48
Sur África	1	1	*	*	*
Turquía	2	2	1	0,00484	0,484
Colombia	17	4	0,669	0,02666	2,666

Tabla 4. Haplotipos de *C. caretta* registrados en Gen Bank, por distintos autores con sus lugares de procedencia y zona ecológica correspondiente

Haplotipo	Procedencia	Zona ecológica	Autor
CC-A2.1	Italia	Alimentación y captura incidental	Splendiani, A <i>et al.</i> , 2017
	Atlántico Norte	Alimentación y captura incidental	LaCasella <i>et al.</i> ,2013;
	Atlántico Norte	Anidación y alimentación	Shamblin <i>et al.</i> ,2014
	Atlántico Norte	Anidación y alimentación	Shamblin <i>et al.</i> ,2011
	Albania	Alimentación y captura incidental	Yilmaz <i>et al.</i> ,2012
	Israel	Alimentación y captura incidental	Garofalo <i>et al.</i> , 2013
	Sur África	Anidación y alimentación	Shamblin <i>et al.</i> ,2014
	Canarias	Anidación, alimentación y captura incidental	Monzón <i>et al.</i> ,2009
	Colombia	Anidación	Presente estudio
	Atlántico Norte	Anidación, alimentación y captura incidental	Shamblin <i>et al.</i> ,2011
CC-A43.1	Colombia	Anidación	Presente estudio
CC-A1.4	Atlántico Norte	Anidación, alimentación y captura incidental	LaCasella <i>et al.</i> ,2013

CC-A17.1	Canarias	Anidación y alimentación	Monzón <i>et al.</i> , 2010
	Italia	Anidación, alimentación y captura incidental	Maffucci, F <i>et al.</i> , 2006
	Colombia	Anidación	Presente estudio
	Cabo Verde	Anidación, alimentación y captura incidental	Monzón <i>et al.</i> , 2009
	Colombia	Anidación	Presente estudio

En total se analizaron 100 nidos, donde la colonia anidante de Mendihuaca-Don Diego aportó 17 nidos diferentes y registró el valor más bajo de diversidad haplotípica (0,669); Albania registro el valor más bajo de diversidad nucleotídica con un 0,00162 (0,162 %), aunque es importante señalar que tan sólo aportó 2 nidos con un mismo haplotipo para el estudio, junto a Francia, Líbano. Dichas regiones con tan solo un haplotipo registrado, limitan a la hora de sacar conclusiones claras, pero estos territorios y registros aparentemente no hacen parte de zonas de anidación establecidas, pero si forman parte de áreas ecológicas de tránsito, alimentación o desarrollo (Al-Mohanna y George, 2010).

Para el análisis de varianza molecular o AMOVA, fue necesario establecer agrupamientos de secuencias según el país y agrupamientos poblacionales en relación a su cercanía geográfica, asociando en el grupo 1 a Albania, Grecia e Italia; el grupo 7 a Israel, Líbano y Turquía; y el grupo 9 a Kuwait y Omán; para las demás regiones no se realizaron agrupaciones, se trabajaron como colonias independientes (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para los once grupos establecidos (Grupo 1: Albania, Grecia, Italia; Grupo 2: Brasil; Grupo 3: Canarias; Grupo 4: Cabo Verde; Grupo 5: Colombia; Grupo 6: Francia; Grupo 7: Israel, Líbano, Turquía; Grupo 8: Japón; Grupo 9: Kuwait, Omán; Grupo 10: Noratlántico; Grupo 11: Suráfrica.

Fuente de Variación	d.f.	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	F-Estadístico	P
Entre Grupos	10	6,55614	48,63	FCT 0,48630	0,0000

Entre poblaciones dentro de grupos	5	-3,61723	-26,83	FSC	-0,52231	0,05181±0,00733
Dentro de poblaciones	142	10,54272	78,20	FST	0,21799	0,0000
Total	157	13,48163	0			

El análisis de AMOVA se efectuó con 1023 permutaciones, arrojó los índices de fijación que se relacionan en la Tabla 6; asimismo, se obtuvo una matriz de comparaciones pareadas Fst, usando como método de distancia el modelo evolutivo Tamura, con un nivel de significancia de $p= 0.05$. Los valores Fct = 0,48630 y Fst = 0,21799, indican un alto nivel de diferenciación entre grupos (48.6 %) y dentro de las poblaciones consecutivamente (78.2 %), señalan una alta variación en las secuencias evaluadas.

La matriz de distancia genética resultado del AMOVA corroboró esta alta diferenciación y a partir de esta información se logró elaborar un árbol de relación evolutiva de taxones, resumiendo la información presentada en la Tabla 6, usando el programa MEGA 7; este se dedujo usando el método Neighbor-joining o vecino más cercano (Figura 9).

Tabla 6. Comparación de colonias anidantes de la tortuga *C. caretta* a nivel mundial por el método Tamura. ALB: Albania; BRA: Brasil, CAN: Canarias, CAP: Cabo Verde; COL: Colombia, FRA: Francia, GRE: Grecia, ISR: Israel, ITA: Italia, JAP: Japón, KUW: Kuwait, LIB: Líbano; NAT: Noratlántico; OMA: Omán, TUR: Turquía, SAF: Suráfrica.

	ALB	BRA	CAN	CAP	COL	FRA	GRE	ISR	ITA	JAP	KUW	LIB	NAT	OMA	TUR	SAF
ALB	0,000															
BRA	0,979	0,000														
CAN	0,139	0,376	0,000													
CAP	0,944	0,636	0,466	0,000												
COL	0,086	0,373	0,104	0,388	0,000											
FRA	0,150	0,581	0,448	0,615	0,197	0,000										
GRE	1,000	0,975	0,211	0,939	0,083	0,644	0,000									
ISR	0,055	0,951	0,315	0,935	0,190	0,394	0,110	0,000								
ITA	0,221	0,724	0,041	0,778	0,033	0,037	0,636	0,053	0,000							
JAP	0,859	0,887	0,253	0,867	0,315	0,173	0,720	0,855	0,511	0,000						
KUW	1,000	0,765	0,402	0,220	0,117	0,650	1,000	0,923	0,525	0,643	0,000					
LIB	0,667	0,966	0,114	0,936	0,111	0,063	0,336	0,151	0,186	0,834	0,938	0,000				
NAT	0,002	0,430	0,068	0,466	0,004	0,182	0,259	0,115	0,021	0,320	0,213	0,027	0,000			
OMA	0,320	0,271	0,272	0,388	0,025	0,387	0,075	0,486	0,194	0,174	0,894	0,298	0,017	0,000		
TUR	0,500	0,967	0,152	0,939	0,129	0,122	1,000	0,034	0,201	0,822	0,940	0,335	0,026	0,302	0,000	
SAF	0,000	0,974	0,286	0,937	0,191	0,700	1,000	0,429	0,839	0,717	1,000	0,335	0,342	0,081	0,001	0,000

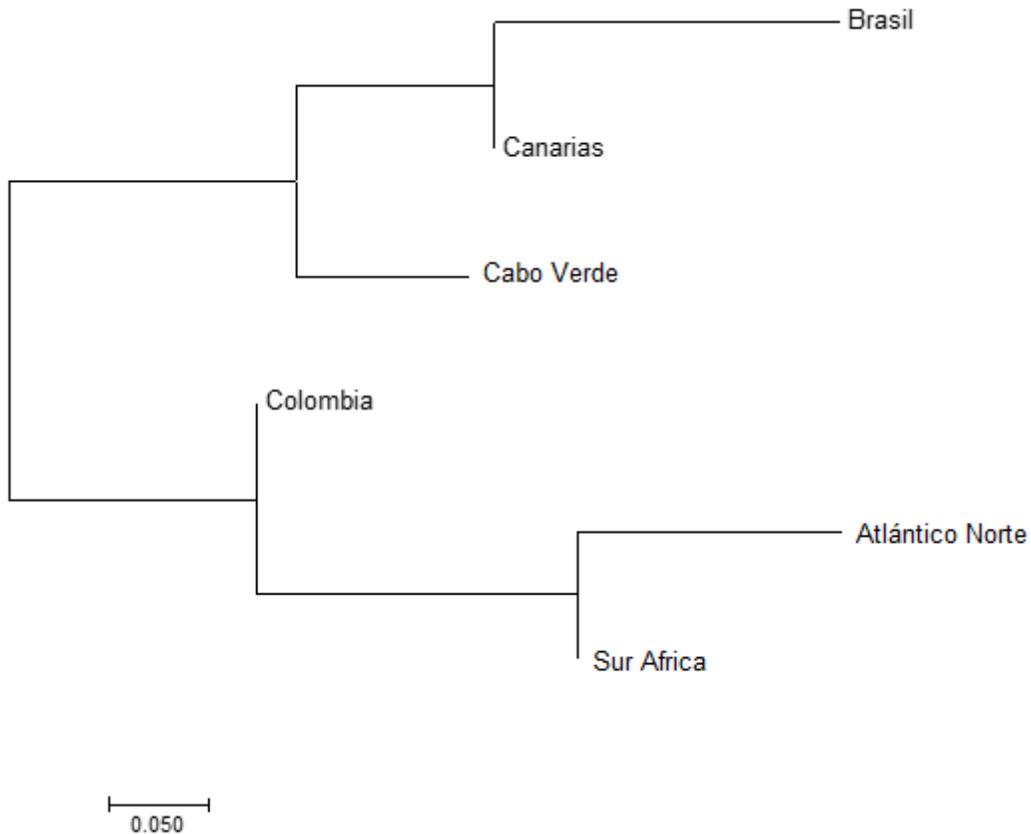


Figura 9. Árbol del vecino más cercano mostrando la relación genética de diferentes poblaciones cercanas de *C. caretta*.

La Figura 9 representa la semejanza entre las colonias anidantes en el Atlántico Oriental y Occidental, formando dos grandes grupos, sin un patrón aparente como lo mencionó Shamblin *et al.* (2011). Las colonias anidantes de Colombia presentan mayor proximidad genética con las colonias del Atlántico Norte y Sur África, por otro lado, los nidos evaluados en Cabo Verde e Islas Canarias tienen cercanía a las colonias anidantes de las costas brasileñas.

Usando el software PopArt, se utilizaron las secuencias recolectadas y se graficaron los diferentes haplotipos y sus distancias genéticas. El programa arrojó la red de haplotipos (Figura 10), donde claramente se visualizan dos haplogrupos diferentes tal como lo señala

Shamblin *et al.* (2014). Las diferentes sustituciones entre haplotipos se señalan entre paréntesis, teniendo en cuenta que hay 1 sustitución entre haplotipos que no llevan número en la gráfica.

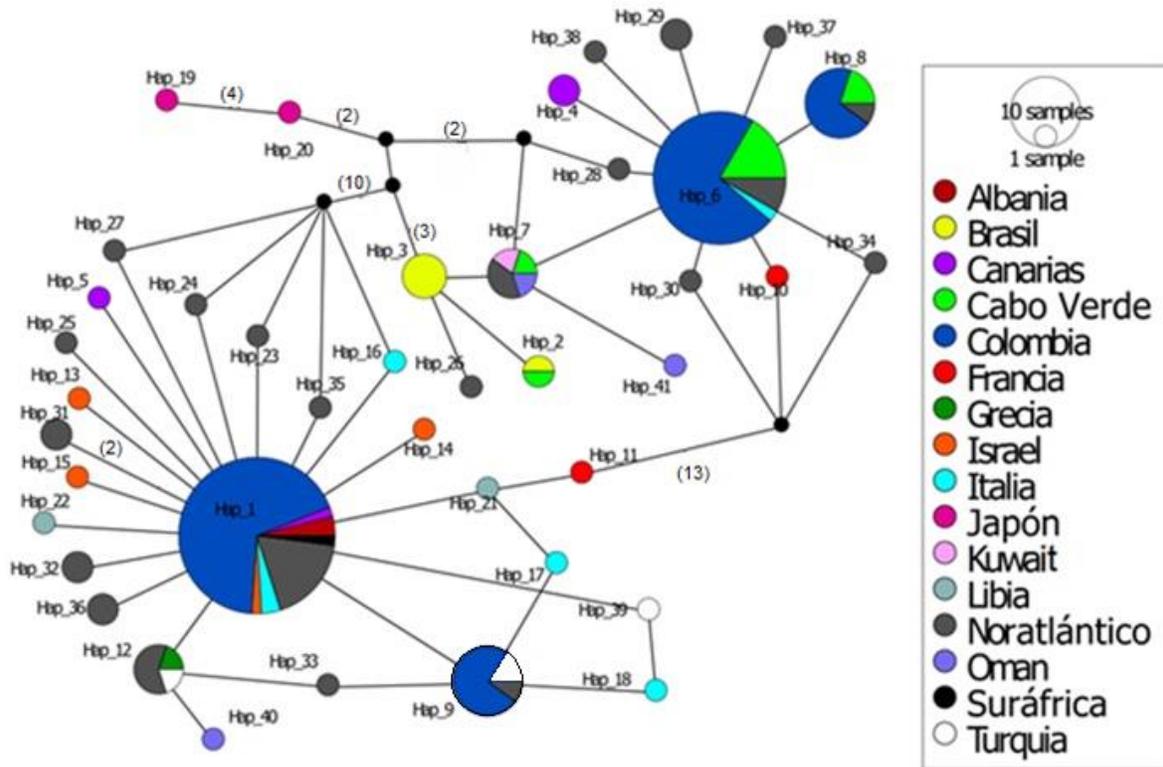


Figura 10 Red de haplotipos usando secuencias de la región control de ADNmt en la tortuga *C. caretta*. El número en paréntesis se refiere a las sustituciones que existen entre los diferentes haplotipos.

Los haplotipos 1 y 6 hacen referencia al 2.1 y 1.4 respectivamente, las diferentes agrupaciones de haplotipos, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Descripción de agrupación de haplotipos, relacionados con el presente estudio.

Hap_1:	2.1; 2.2; 2.3; 2.4; 2.5; 2.6; A2.1; A2.8; A2.9; 2.11; 2.12; 5.1; A6.1; 10.1; 10.4	Hap_11:	A64.1	Hap_21:	26.1	Hap_31:	A9.1; 42.1
Hap_2:	24.1; A24.1	Hap_12:	A3.1; A3.2; A32.1; 36.1; 36.2	Hap_22:	68.1	Hap_32:	A36; 44.1
Hap_3:	A4.1; A4.2; A4.3	Hap_13:	50.1	Hap_23:	A8.1	Hap_33:	51.1
Hap_4:	47.1; A47	Hap_14:	65.1	Hap_24:	12.1	Hap_34:	59.1
Hap_5:	A46	Hap_15:	A29.1	Hap_25:	13.1	Hap_35:	60.1
Hap_6:	1.1; A1.2; 1.3; A1.3; 1.4; A1.5; A1.6; A1.7; A1.8; A1.9	Hap_16:	31.1	Hap_26:	14.1	Hap_36:	A7.1; 7.2
Hap_7:	11.2; 11.7; A11.1; A11.5; 11.6	Hap_17:	71.1	Hap_27:	20.1	Hap_37:	A11.5
Hap_8:	11.3; 17.1; A17.2	Hap_18:	A28.1	Hap_28:	21.1	Hap_38:	A15.1
Hap_9:	43.1	Hap_19:	1.1	Hap_29:	27.1; A27.1	Hap_39:	A53
Hap_10:	A63.1	Hap_20:	71	Hap_30:	41.1	Hap_40:	A72.1
						Hap_41:	72.1

El mapa de distribución espacial de los 41 haplotipos reportados, evidencia que 13 haplotipos se comparten alrededor del mundo y 28 son “privados”, es decir aquellos que son exclusivos para determinada región y no se encuentran reportes en ninguna otra parte (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La descripción completa de que haplotipos están presentes en cada región, se encuentra en la Tabla 8.



Figura 11. Distribución espacial de haplotipos analizados en la tortuga *C. caretta* mediante la región control de ADNmt.

Tabla 8. Descripción de haplotipos por región geográfica en la tortuga *C. caretta*, con su frecuencia entre paréntesis.

Lugar	Número de haplotipos diferentes	Haplotipos	Hap Totales
Albania	1	Hap_1 (2)	2
Brasil	2	Hap_2 (1), Hap_3 (4)	5
Canarias	3	Hap_1 (1), Hap_4 (2), Hap_5 (1)	4
Cabo Verde	4	Hap_2 (1), Hap_6 (6), Hap_7 (1), Hap_8 (2)	10
Colombia	4	Hap_1 (34), Hap_6 (24), Hap_8 (7), Hap_9 (9)	74
Francia	2	Hap_10 (1), Hap_11 (1)	2
Grecia	1	Hap_12 (1)	1
Israel	4	Hap_1 (1), Hap_13 (1), Hap_14 (1), Hap_15 (1)	4
Italia	6	Hap_1 (2), Hap_6 (1), Hap_16 (1), Hap_17 (1), Hap_18 (1)	6
Japón	2	Hap_19 (1), Hap_20 (1)	2
Kuwait	1	Hap_1 (1)	1
Líbano	2	Hap_21 (1), Hap_22 (1)	2
Atlántico Norte	22	Hap_1 (9), Hap_6 (3); Hap_7 (2), Hap_8 (1), Hap_9 (4), Hap_12 (3); Hap_23 (1), Hap_24 (1), Hap_25 (1), Hap_26 (1), Hap_27 (1), Hap_28 (1), Hap_29 (2), Hap_30 (1), Hap_31 (2), Hap_32 (2), Hap_33 (1), Hap_34 (1), Hap_35 (1), Hap_36 (2), Hap_37 (1), Hap_38 (1)	39
Omán	3	Hap_7 (1), Hap_40 (1), Hap_41 (1)	3
Sur África	1	Hap_1 (1)	1
Turquía	3	Hap_9 (1), Hap_12 (1), Hap_39 (1)	3

7.2 DISCUSIÓN

Se identificaron 4 diferentes haplotipos, a partir de las secuencias obtenidas de las tortugas dispuestas a procesos de levante e introducción al medio marino, entre el año 2014 a 2018; dichos resultados corresponden, a los 2 haplogrupos mencionados por Shamblin *et al.* (2011); el haplotipo 1.4, hace parte del haplogrupo I y el 2.1 al haplogrupo II, y a su vez, se derivan los haplotipos 17.1 y 43.1 respectivamente.

La diversidad haplotípica para todas estas secuencias denominadas COL, fue de 0,669 y la diversidad nucleotídica 0,02666; este resultado es bajo si se compara con los datos de la colonia del Noratlántico (nidos=39, DH=0,937 y $\pi = 0,02428$, con 22 haplotipos diferentes), evidenciando la importancia ecológica de dicha colonia, reafirmando lo señalado por Wallace *et al.* (2010), quienes determinaron las unidades regionales de gestión para la especie (Figura 2) e incluyeron el Atlántico noreste, dentro de sus estudios, ratificando lo referido por Murphy y Hopkins (1984), quienes catalogan la región completa como el segundo agregado reproductivo más grande de tortugas caguama a nivel global, con aproximadamente 35000 hembras anidantes.

Otros resultados fueron presentados por Encalada *et al.* (1998) en su análisis con poblaciones del Atlántico y el Mediterráneo, registrando valores de 0,67 (DH) y 0,0232 (π) con 249 ind analizados y 10 haplotipos identificados; datos similares a los reportados en el actual estudio, cabe resaltar las diferencias que pueden existir, debido al tamaño de la muestra y haplotipos resultantes.

La colonia del Atlántico Norte cuenta con un gran número de haplotipos, pero su representatividad alrededor del mundo es baja; ningún otro lugar cuenta con tal diversidad, sugiriendo un área ancestral de desarrollo de la especie, sujeta a diversas mutaciones a lo largo del tiempo (Bowen *et al.*, 1993b).

En el sector Mendihuaca-Don Diego desde el 2014 hasta la fecha, se han reportado los mismos cuatro haplotipos con variaciones en la frecuencia, dependiendo el año como se presentó en la Tabla 1. La baja variabilidad genética es el reflejo de la fijación histórica en la región correspondiente a los haplotipos basales CC-A1 y CC-A2. Datos semejantes a los obtenidos por Bass *et al.* (2004), donde no encontraron diferencias en la composición genética en las áreas de forrajeo en el complejo estuarino Pamlico-Albermale en Carolina del Norte (USA), en un lapso de 3 años de estudios, sugiriendo que las diferencias temporales en la estructura genética de las zonas de forrajeo, puede ocurrir sólo en escalas mayores de tiempo; cabe resaltar que también trabajaron con un marcador genético mitocondrial, el cual aporta información de la parte materna. Para evidenciar cambios de diversidad haplotípica en lapsos tan cortos de tiempo es necesario utilizar un marcador diferente, como los microsatélites.

El sector evaluado en el país alberga 2 haplogrupos, cada uno con 2 haplotipos; donde el CC-A2 es el más frecuente y el que tiene mayor distribución a nivel mundial: Albania (Yilmaz *et al.*,2012), Islas Canarias (Monzón *et al.* 2009) , Israel (Garofalo *et al.*, 2013), Italia (Splendiani, A *et al.*, 2017) , Noratlántico (LaCasella *et al.*,2007; Shamblin *et al.*,2011; Shamblin *et al.*,2014 , y Suráfrica (Shamblin *et al.*,2014), tal como lo señala la Tabla 4.

Lo anterior sugiere que las tortugas nacidas en el Sector Mendihuaca-Don Diego, una vez introducidas al medio natural, pueden alcanzar el Giro del Atlántico Norte, usando las corrientes del Caribe y del Golfo de México; desplazándose hacia latitudes mayores. para luego seguir su ruta a través de la corriente de Canarias, hacia Europa y África, para seguidamente encontrarse con la corriente Norecuatorial, cerrando el giro de regreso con la corriente del Caribe (Witt *et al.*, 2010

Las diferencias haplotípicas (

), se deben a mutaciones que ocurren a lo largo del tiempo; estas modificaciones están ligadas a procesos históricos, climáticos y geológicos. Durante la glaciación ocurrida en el Pleistoceno, la tortuga *C. caretta* se aisló climáticamente y geográficamente entre el océano Atlántico e Índico, dicha divergencia ocurrió hace 3 millones de años aprox (Bowen *et al.*, 1994); consecuentemente, cada descendencia evolucionó de manera independiente (Encalada *et al.*, 1998); luego, el aumento en la temperatura global durante periodos interglaciares, permitió la expansión de la especie a latitudes más altas, y el establecimiento de un corredor marino alrededor de Sudáfrica, que se vio facilitado por la amplia tolerancia de la tortuga, a soportar aguas templadas en comparación a otras especies (Ruiz, 2008).

Las tortugas marinas siguen la ruta de las corrientes oceánicas, hacia sus áreas de reproducción y forrajeo, pero existen diversos factores adicionales que generan un desafío de navegación como lo son las tormentas, huracanes y fenómenos meteorológicos (Monzón-Argüello *et al.*, 2012). Dichos eventos pueden desviar sus migraciones, más aún cuando los pronósticos actuales tienden a acrecentarse, aumentando cada vez más la dispersión de los animales marinos que se encuentran cerca de la superficie del océano (Witt *et al.*, 2010). En algunas ocasiones, varamientos y extrañas observaciones en lugares poco habituales, tienen como explicación las tormentas tal como ocurre frecuentemente en el Golfo de Vizcaya, ubicado en la frontera norte entre Francia y España, donde se han

encontrado reportes de la tortuga caguama, según Monzón-Argüello *et al.* (2012), lo anterior responde a una mezcla de factores meteorológicos y oceanográficos, cuya relación se visualiza en el análisis de la Figura 12, en la primera imagen (a), se aprecia el recorrido de las corrientes marinas en un periodo de 3 años de estudio; claramente se observa un desplazamiento hacia Europa occidental en la siguiente imagen (b) se evidencia una serie de tormentas (11) originadas en Cabo Verde, entre el 2000 y el 2008.

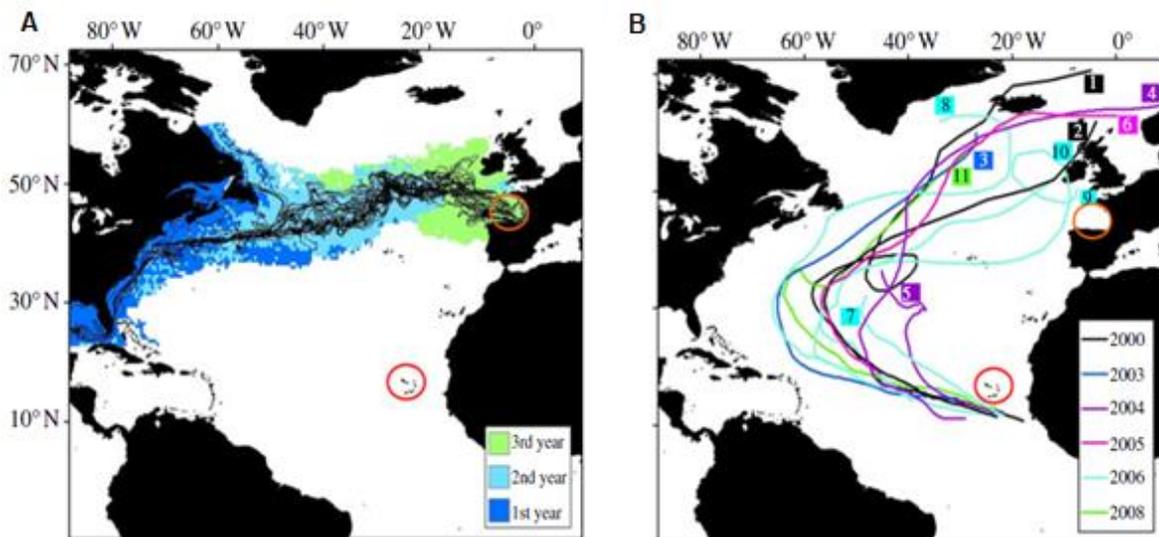


Figura 12 Análisis oceanográfico y meteorológicos del Atlántico Norte para rastrear movimientos superficiales alrededor del Golfo de Vizcaya (círculo naranja) y Cabo Verde (círculo rojo). (a) Simulación de trayectorias de corrientes marinas durante los 3 años del estudio, y (b) Seguimiento a 11 tormentas originadas en Cabo Verde entre el 2000 y 2008. Modificado de Monzón-Argüello *et al.*, 2012.

Es evidente el efecto de los fenómenos climáticos en la dispersión de las tortugas marinas alrededor del mundo, pero también lo estocástico de los mismos. Un caso particular, es la ausencia del haplotipo 17.1 en los años 2017-2018, pero presente en los años 2014 y 2016 por los trabajos realizados por el ProCTMM. Los factores meteorológicos cumplen un rol fundamental en los movimientos trasatlánticos y su predicción, se vuelve cada vez más aleatoria; las tortugas marinas pueden estar en medio de una tormenta y perder su rumbo, llevándola quizás a latitudes muy altas, donde temperaturas frías pueden causar la muerte (Witt *et al.*, 2007). Huracanes como el Matthew en el segundo semestre de 2016 el cual llegó a categoría 5 en el Caribe ocasionando pérdidas millonarias y forzando a la evacuación de más 3 millones de personas solo en Estados Unidos son el claro ejemplo de estos fenómenos (Thomas *et al.*, 2019), la exposición a tormentas de gran magnitud puede

acarrear impactos negativos considerables en la reproducción de la especie y las tortugas marinas en general, disminuyendo el porcentaje de eclosión y la productividad en general (Fuentes *et al.*, 2019)

Estos eventos climáticos, afectan las áreas de reproducción y forrajeo (Martin, 1996); e inclusive cambios antropogénicos como pérdida de playas de anidación y contaminación marina, pueden modificar los patrones de desplazamiento como el “natal homing” (Monzón-Argüello *et al.*, 2012) ; en Colombia, la pesca ilegal y comercialización de sus huevos, carne y caparazón, han sido parte de la problemática ambiental (Ceballos, 2003; Ceballos-Fonseca, 2004), a pesar de esto las costas del país, se ratifican como zonas de anidación de gran importancia a nivel global; el albergar en el sector del Caribe colombiano evaluado (Mendihuaca-Don Diego) cuatro diferentes haplotipos de la misma especie de tortuga, lo hace comparable con lugares como Brasil, Cabo Verde o las Islas Canarias.

Regiones en Brasil con una alta diversidad $DH=0,9$ con 5 secuencias y 2 haplotipos diferentes, lo ubican como una zona de relevancia en la zona, similar a la identificada en las Islas Canarias y Cabo Verde que cuentan con valores de $DH=0,833$ y $DH=0,867$ respectivamente; particularmente las colonias anidantes de la costa Atlántica brasilera, hacen parte de una de las más largas áreas de anidación en el mundo, de esta especie con las mayores abundancias (Marcovaldi y Chaloupka, 2007); es por ello que la legislación brasilera, tomó acciones para proteger a la especie y en 1980 implementó el proyecto TAMAR-IBAMA; esta ley involucró a la comunidad realizando monitoreos en playas de anidación de tortugas marinas, protegiéndolas de la predación de zorros, la caza furtiva y la destrucción de hábitats naturales en un largo periodo de tiempo; estas acciones relativamente simples y poco costosas, han contribuido en su conservación (Marcovaldi *et al.*, 2005)

La historia evolutiva de la especie en el país vecino, sugiere que fue colonizada recientemente, a través de la corriente caliente de Brasil que viene de Norte a Sur, y se deriva de la corriente Sur Ecuatorial; adicionalmente, durante épocas glaciales, la tortuga caguama se expandió hacia latitudes más altas, como sucedió con colonias en USA, similar comportamiento ocurrió hacia las costas brasileras (Reis *et al.*, 2010); así mismo, se explica su baja diversidad nucleotídica (π : 0,00228) por una reciente colonización; las áreas ecológicas de alimentación y forrajeo, generalmente evidencian índices de diversidad más

altos que las colonias anidantes, debido a que estas últimas, albergan las hembras con comportamientos filopátricos y las áreas ecológicas reciben individuos de diferentes colonias de origen (Reis *et al.*, 2010).

La información presentada en la Figura 11 refleja la directa relación genética entre las tortugas de la colonia anidante de Mendihuaca-Don Diego con las tortugas marinas del Atlántico Norte y el Caribe, al compartir todos haplotipos presentes en la región; siguiendo la lógica por su proximidad y la conexión directa por corriente marinas, pero cabe resaltar que el haplotipo CC-A2 se reporta tanto en Europa como en Sur África, producto de una expansión poblacional a latitudes más altas y el ingreso y establecimiento ancestral de tortugas al Mar Mediterráneo aproximadamente hace 12 mil años provenientes de stocks poblacionales del Atlántico Occidental (Bowen *et al.*, 1993b; Carreras *et al.*, 2007).

Los registros de *C. caretta* en el mar Mediterráneo, pertenecientes a Albania, Grecia, Israel, Italia, Líbano y Turquía, cuentan con una baja diversidad evidenciada en la Tabla 3; donde el CC-A2 fue de los primeros haplotipos en colonizar y ser el más dominante en la región; paralelamente el haplotipo CC-A3 también hace presencia en la zona, especialmente en Turquía y recientemente en Grecia, pero con menor frecuencia, señalando que deriva del CC-A2.1 e indicando el reciente aislamiento de las poblaciones del Mediterráneo con el resto del mundo (Yilmaz *et al.*, 2011).

Cabe resaltar que Yilmaz *et al.* (2011), señalaron la exclusividad de la presencia del haplotipo CC-A3 en Turquía y en el presente estudio, se evidencia en Grecia, sugiriendo allí una nueva colonización y expansión poblacional de la especie, producto de cambios en los patrones filopátricos y condiciones adecuadas de anidamiento, consecuencia de un posible nuevo efecto fundador; adicionalmente, esta reciente estructura genética, sugiere un corredor de zonas de alimentación en el Mediterráneo, consecuencia del patrón de corrientes superficiales y masas de agua (Carreras *et al.*, 2006).

Las tortugas marinas del Atlántico, ingresan en el mar Mediterráneo por medio del Estrecho de Gibraltar (Bolten, 2003), atravesando las islas de Azores y Madeira, regiones autónomas de Portugal; una vez, en el Mediterráneo occidental, se mezclan con las tortugas de la región, a razón de la topografía heterogénea de la zona y las diferentes cuencas,

caracterizadas por diferentes masas de agua, conectadas por dos corrientes superficiales considerables (Millot, 2001).

La cuenca de Algeria, se llena de aguas provenientes del Atlántico con baja salinidad y fluye hacia el este a través de la costa norte africana, por otra parte, la corriente Liguro-Provençal, ubicada en la costa europea, fluye de este a oeste atravesando el mar Tirreno, el mar de Liguria y el mar Baleárico con aguas saladas del mediterráneo, ocasionando una heterogeneidad (Millot, 2001) y afectando la distribución de plancton en la zona, formando aguas productivas ricas en nutrientes ideales para la especie (Polovina *et al.*, 2004). reafirmando esta región como un área ecológica de forrajeo de gran relevancia.

Las áreas de forrajeo en el Mediterráneo occidental, son compartidas por tortugas provenientes del Atlántico; haplotipo CC-A2 en su mayoría; y el Mediterráneo, pero se diferencian entre ellas por longitud en su caparazón (Carreras *et al.*, 2007). El estrecho de Gibraltar, presenta algunos desafíos de navegación para aquellas tortugas inmaduras con una longitud de caparazón menor a 40 cm, a causa de su flujo permanente de agua superficial de oeste a este (Bolten, 2003), lo cual ha sido evidenciado con el uso de rastreadores satelitales, ya que el paso del Mediterráneo al Atlántico, es extremadamente limitado (Margaritoulis *et al.*, 2003).

La dispersión del haplotipo CC-A2, se ve disminuida sustancialmente con dirección este, la corriente Liguro-Provençal por lo contrario, es utilizada como un atajo que acelera el transporte de tortugas hacia el Mediterráneo occidental (Carreras *et al.*, 2007); por consiguiente, aquellas tortugas juveniles que se desplazan a las zonas de forrajeo, se ven involucradas en la captura incidental, aumentando su mortalidad. Es por ello que debe considerarse una prioridad, proteger a la colonia del Mediterráneo oriental.

El desplazamiento de las tortugas marinas, puede ser sorprendente en algunas ocasiones, asociado al incremento de la temperatura global y fenómenos climáticos como se mencionó anteriormente; se han registrado reportes en Suráfrica y Kuwait, donde en los dos casos el haplotipo CC-A2 proviene de las colonias anidantes del Noratlántico; transitan por el Océano Indico, usando la corriente Norecuatorial para llegar a la corriente de Agulhas en África oriental y su vez llegar a Suráfrica, tomando luego la corriente de Benguela y seguir su rumbo hacia el Atlántico norte (Bowen *et al.*, 1994; Al-Mohanna y George, 2010).

En este recorrido, se encuentra una de las más grandes colonias anidantes del mundo, en la Isla Masirah (Omán) con aprox 30000 nidos por año (Ross y Barwani, 1982); justificando el alto valor de diversidad nucleotídica, π : 0,0348 (Tabla 3). Rees *et al.* (2010), en su estudio de comportamiento de tortugas caguama, identificaron la dispersión de hembras adultas y sus comportamientos pre y post-anidación, evidenciando su movimiento cercano hacia áreas de forrajeo; dichos movimientos, fueron constantes hacia hábitats pelágicos y nerítico-costeros durante la fase posterior a la anidación; el área de desplazamiento, abarcó el Golfo de Arabia, el Golfo de Omán, el Golfo de Kutch y el Golfo de Adén, con una distancia promedio migratoria desde el nido de 400 km-1400 km alrededor de 63 días.

La información referida por Rees *et al.* (2010), revela la proximidad de las áreas de forrajeo a su nido, beneficiando en términos energéticos, el desplazamiento para las tortugas de la región; de igual modo, infiere que el mar de Omán y sus alrededores, están densamente poblados por hembras y machos reproductivamente activos, durante 6 meses cada año. Las áreas de alimentación rodean a Arabia Saudi, UAE, Iran, Pakistan, Yemen y Somalia, países que posiblemente en un futuro alberguen zonas de anidación, producto de la aleatoriedad de las corrientes y eventos estocásticos, si acciones antropogénicas no lo impiden.

La red de haplotipos (Figura 10) muestra 2 haplogrupos definidos el CC-A2.1 y el CC-A1.4 como los más ancestrales, ampliamente divergentes separados por 17 sustituciones, pero aun así con una fuerte estructuración genética entre las colonias a nivel mundial, esta información confirma el comportamiento de natal homing de la tortuga caguama a nivel global; sin embargo, esta conducta no puede ser definitiva porque nuevas regiones deberán ser colonizadas por nuevos individuos en alguna otras zonas del mundo (Reis *et al.*, 2010).

La historia de vida de la tortuga *C. caretta* es bastante dinámica, cambiante podría decirse, si se mencionan algunos casos puntuales donde ha llegado a latitudes extremas por toma de decisiones o tan sólo guiándose y navegando a la merced de las corrientes, adicionalmente, el cambio climático está haciendo efecto en la dispersión, huracanes cada vez más frecuentes, y en regiones donde no es común, afectan considerablemente su localización espacial (Monzón-Argüello *et al.*, 2012)

Un claro ejemplo, son las colonias anidantes en las costas japonesas; allí sus patrones migratorios hacia zonas de forrajeo pueden variar dependiendo su tamaño (Hatase *et al.*, 2002b), hembras con un tamaño reducido tienen a alimentarse de presas pobres en nutrientes y así mismo requieren de más energía y nutrientes para su próximo periodo de reproducción, en comparación a las hembras grandes donde su dieta se basa en presas ricas en nutrientes en aguas neríticas (Hatase *et al.*, 2004). Adicionalmente, el intervalo de remigración a su playa natal puede verse afectado por su dieta (Broderick *et al.*, 2001); llevando a poseer diversas áreas ecológicas de forrajeo a lo largo de su ruta a través del Giro del Pacífico Norte (Bowen *et al.*, 1995), pasando por la coalición de la corriente Kuroshio y la corriente de Oyashio, esta última corriente fría que viene del norte; tomando así la corriente del Atlántico Norte y desembocar en dos, en la corriente de California hacia el sur y la corriente de Alaska hacia el norte (Cummins y Freeland, 2007).

No todas las tortugas originarias de las costas de Japón, toman el desafío de aventurarse por el Giro del Pacífico Norte, camino largo que conlleva un reto de sobrevivencia y alimentándose en su recorrido de animales planctónicos. Las habilidades de caza y forrajeo cumplen un papel fundamental, algunas tortugas pueden encontrar abundantes presas en zonas de convergencia y frentes oceánicos, mientras otras no (Hatase *et al.*, 2004). Es evidente la asociación de los juveniles de tortuga *C. caretta* con corrientes como el TZCF y el KEC donde abundan los nutrientes y la producción primaria de clorofila (Polovina *et al.*, 2004). El distanciamiento geográfico de las colonias japonesas con la registrada en Mendihuaca-Don Diego evita, que exista alguna relación genética, evidenciado en la ausencia de haplotipos japoneses en los datos obtenidos y viceversa.

Las diferentes estrategias de tortuga *C. caretta*, incluyen forrajear cerca de su playa de anidación, teniendo en cuenta la disponibilidad de alimento; resulta más ventajoso alimentarse en ambientes neríticos que en oceánicos, debido a una mayor disponibilidad y calidad en las presas que se encuentran allí (Snover, 2002). Es destacado agregar que una vez la tortuga marina alcanza una madurez sexual, sin importar su tamaño, grande o pequeña, estas hembras asignan mucha más energía y nutrientes obtenidos de las presas a la reproducción y no al crecimiento (Broderick *et al.*, 2003; Hatase *et al.*, 2004).

La importancia ecológica y las historias de vida de la tortuga son incuestionables, están en constante cambio, son dinámicas y pueden variar según las condiciones geográficas y

climáticas; las áreas de forrajeo y reproducción claramente afectan la dispersión haplotípica y son fundamentales en el desarrollo de la especie, ante la disponibilidad de nuevas zonas de alimentación o reproducción, la tortuga buscará migrar hacia ellas. La Figura 13, refleja dichas áreas a nivel global, teniendo en cuenta el presente estudio.

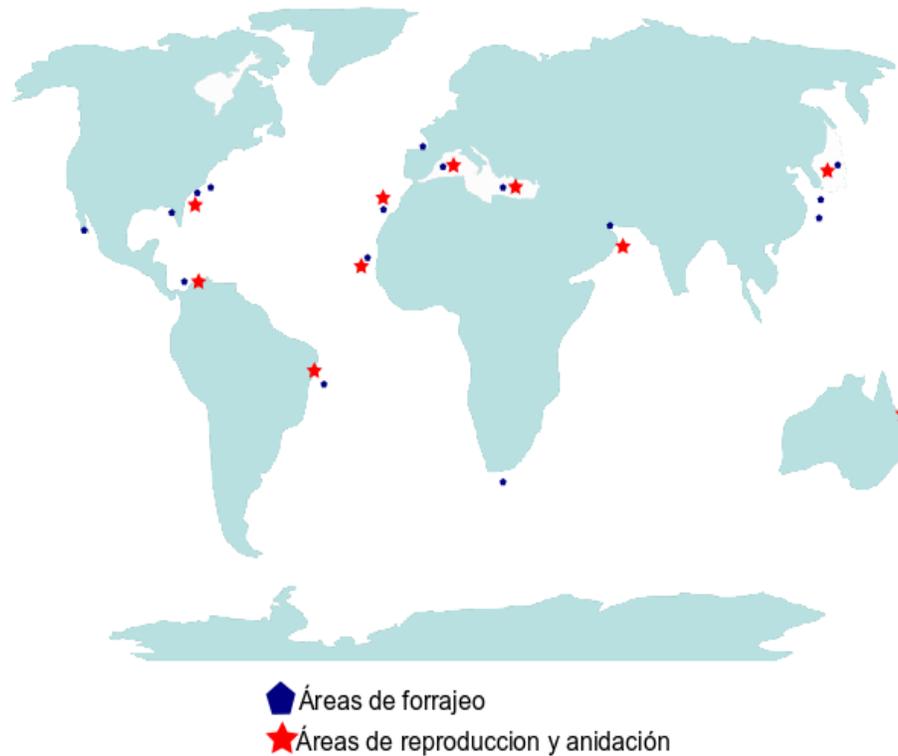


Figura 13 Mapa de distribución de áreas de forrajeo, reproducción y anidación de *C. caretta* a nivel global. Mapa basado en información recopilada para este estudio

8. CONCLUSIONES

La variabilidad genética de la colonia anidante de Mendihuaca-Don Diego, se mantuvo estable a lo largo del periodo de estudio 2014-2018, consecuencia de una fijación histórica en el sector de los mismos 4 haplotipos ya relacionados; adicionalmente, es importante resaltar que en este trabajo se utilizó un marcador mitocondrial con la región control d-loop, el cual refleja cambios en la diversidad genética, en periodos largos de tiempo.

La colonia anidante de Mendihuaca-Don Diego, hace parte del Giro del Atlántico Norte, y cuenta con una estrecha relación haplotípica con las colonias anidantes de la región al compartir sus haplotipos, evidenciando un posible corredor marino entre las regiones y su importancia de identificarlo, manejarlo y protegerlo.

Se puede inferir que, por acción de corrientes marinas, los haplotipos de la colonia anidante de Mendihuaca-Don Diego, también se registran en Europa, ratificándose su gran capacidad de dispersión y lo estocástico de sus movimientos, al ingresar al Mar Mediterráneo por el Estrecho de Gibraltar; cabe resaltar que solo los haplotipos basales CC-A1 y CC- A2, se comparten entre regiones.

Las tortugas marinas eligen por preferencia, desplazarse por áreas que les aporten la mayor cantidad de beneficios a un menor costo energético. Es por ello que sus movimientos estarán en gran parte ligados a satisfacer sus necesidades básicas como reproducción y forrajeo; estos dos aspectos determinan su establecimiento en playas de anidamiento cercanas y su movilidad en busca de mejores y mayores fuentes de alimentación alrededor del mundo.

9. RECOMENDACIONES

La toma de muestras por frotis bucal presentó algunos inconvenientes debido a las impurezas presentes en la boca de las tortugas, se sugiere optimizar el proceso realizando una limpieza previa adecuada alrededor de mandíbula para evitar inconvenientes en la extracción y posterior secuenciación genética.

Aún existen innumerables zonas de alimentación y forrajeo, que no han sido estudiadas alrededor del mundo, continuar con estudios similares será clave para entender mejor la especie, al igual que involucrar otras variables como marcadores nucleares para dilucidar el comportamiento masculino e isótopos estables con el fin de determinar su dieta. El uso de marcadores moleculares también ayudará a entender la historia reciente de la especie.

Aumentar los sitios de muestreo en el país, puede dar un resultado más acertado a la realidad de la estructura poblacional de la especie.

El cambio climático, es una realidad que no se puede obviar, y se evidenció su impacto en las tortugas marinas; pequeñas acciones personales como reciclar, rehusar, reducir el uso de elementos que generen gases de efecto invernadero pueden hacer la diferencia y son el primer paso para la mitigación de sus efectos.

Medidas de protección y conservación de *C. caretta*, asegurarán el equilibrio ecológico en los ecosistemas marinos, al estar en la parte alta de la cadena trófica. Investigaciones como esta, incrementan la información disponible sobre la especie, fundamental para la toma de decisiones y el diseño de estrategias de conservación eficaces a nivel local y global

Continuar con los estudios relacionados con la especie favorecerán a evitar su extinción, de la mano del ProCTMM y la profesora Aminta que tanto le ha aportado a la ciencia en la región y el país, adicionalmente promover las alianzas interinstitucionales como la presente con la Universidad del Magdalena y su programa de Genética Molecular a cargo de los profesores Gilbert Orozco y Lida Castro.

10. AGRADECIMIENTOS

Seré corto, le agradezco a la vida misma por la oportunidad de permitirme llegar hasta este momento de mi existencia y disfrutar de todas esas maravillosas cosas que llamamos vivir.

A la familia que siempre está, los amigos que dan siempre un impulso a seguir y al amor que nunca nos falte, el amor por lo que hacemos, el amor por el mar.

A la academia, en especial a mis directores el profesor Gilberto y la profesora Aminta por su dedicación y compromiso en la conservación de las tortugas marinas a través de la educación y enseñanza, a mis asesores Juan Carlos Aguirre y en especial a Leidy Hernandez, gran amiga, compañera y pieza clave en el desarrollo del documento; junto con Belson Lozano, se formo un excelente grupo de trabajo que quedara marcado en las tardes de PCR e historias del mar.

Agradezco a Petrobras, Mundo Marino, a la Universidad Jorge Tadeo Lozano sede Santa Marta, como a la Universidad del Magdalena y su departamento de Biología Molecular a cargo de la Doctora Lyda Castro por los recursos aportados al proyecto.

Gracias, gracias y gracias.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu-Grobois, F. A., J. Horrocks, A. Formia, R. Leroux, X. Velez-Zuazo, P. Dutton, L. Soares, P. Meylan and D. Browne. 2006. New mtDNA Dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution capacity of mixed stock analysis. In: Frick. M., A. Panagopoulou, A. F. Rees and K. Williams K. Book of abstracts of the 26th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Crete, 179 p.
- Álava, J. J., J. M. Keller, J. R. Kucklickc, J. Wynekend, L. Crowdere and G. L. Scott. 2006. Loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) egg yolk concentrations of persistent organic pollutants and lipid increase during the last stage of embryonic development. *Sci. Tot. Environ.* 367: 170-181.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17): 3389-3402.
- Al-Mohanna, S. Y. and P. George. 2010. Assessment of the origin of a Loggerhead Turtle, *Caretta caretta*, found in Kuwaiti waters, using mitochondrial DNA: (Reptilia: Cheloniidae). *Zool. in the Middle East.* 49(1): 39-44.
- Avise, J. C. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Chapman and Hall, New York. 507 p.
- Bass, A. L., D. A. Good, K. A. Bjorndal, J. I. Richardson, Z. M. Hillis, J. A. Horrocks and B.W. Bowen. 1996. Testing models of female reproductive migratory behavior and population structure in the Caribbean Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata* with mtDNA sequences. *Mol. Ecol.* 5: 321-328.
- Bass, A. L. and W.N. Witzell. 2000. Demographic composition of immature green turtles (*Chelonia mydas*) from the east central Florida coast: Evidence from mtDNA markers. *Herpetol.* 56 (3): 357-367.
- Bass, A. L., S. P. Epperly. and J, Braun-McNeill. 2004. Multi-year analysis of stock composition of a loggerhead turtle (*Caretta caretta*) foraging habitat using maximum likelihood and Bayesian methods. *Conserv. Genet.* 5(6): 783-796.
- Bell, C. D., J. M. Blumenthal, T. J. Austin, J. L. Solomon, G. Ebanks-Petrie, A. C. Broderick and B. J. Godley. 2006. Traditional Caymanian fishery may impede local marine turtle population recovery. *Endang. Species. Res.*, 2: 63-69.
- Bjorndal, K. A. 1997. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. 199-231. In: Lutz, P. L and J. A. Musick. *The Biology of Sea Turtles.* CRC. Boca Raton. 446 p.
- Bolten, A. B. 2003. Active swimmers-passive drifters: the oceanic juvenile stage of loggerheads in the Atlantic system. In: Bolten, A. B. and Witherington, B. E. *Loggerhead sea turtles.* Smithsonian Inst. Press, Washington DC. 63-78.
- Bosch, M., J. Marmi, A. Ferrando, F. López-Giraldez, O. Andres, E. Garcia-Franquesa, M. Ponsà, T. Kellermann, B. Guallar, F. Bisbal and X. Domingo-Roura. 2005. Genotipar sin capturar. *Galemys*, 17: 81- 102.

- Bowen, B. W., W. S. Nelson and J. C. Avise. 1993a. A molecular phylogeny for marine turtles: Trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 5574-5577.
- Bowen, B., J. C. Avise, J. I. Richardson, A. B. Meylan, D. Margaritoulis and S. R. Hopkins-Murphy, S. R. 1993b. Population structure of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the northwestern Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Biol. Conserv.* 7(4): 834-844.
- Bowen, B. W., N. Kamezaki, C. J. Limpus, G. R. Hughes, A. B. Meylan and J. C. Avise. 1994. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evol.* 48 (6): 1820-1828.
- Bowen, B. W., F. A. Abreu-Grobois, G. H. Balazs, N. Kamezaki, C. Limpus and R. F. Ferl. 1995. Trans-Pacific migrations of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) demonstrated with mitochondrial DNA markers. *P Natl Acad Sci USA.* 92(9): 3731-3734.
- Bowen, B. W., A. Bass, S. Chow, M. Bostrom, A. Bolten and T. Okuyama. 2004. Natal homing in juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Mol. Ecol.*, 13(12): 3797-3808.
- Bowen, B. W., A. Bass, L. Soares and R. Toonen. 2005. Conservation implications for complex population structure: Lessons from loggerhead turtle *Caretta caretta*. *Mol. Ecol.* 14: 2389-2402.
- Bowen, B.W. and S. A. Karl. 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Mol. Ecol.*, 16(23): 4886-4907.
- Broderick, A. C., B. J. Godley and G. C. Hays. 2001. Trophic status drives interannual variability in nesting numbers of marine turtles. *P. Roy Soc of London. Series B: Biol Sci.* 268(1475): 1481-1487.
- Broderick, A. C., F. Glen, B. J. Godley and G. C. Hays. 2003. Variation in reproductive output of marine turtles. *J. Exp Mar Biol Ecol.* 288(1): 95-109.
- Caraccio, M. N., A. Domingo, A. Márquez, E. Nar-Maciel, P. Miller y A. Pereira. 2008. Las aguas del Atlántico en el ciclo de vida de la tortuga Cabezona (*Caretta caretta*): evidencias a través del análisis del ADNmt. *Sci. ICCAT*, 62(6): 1831-1837.
- Carr, A. 1987. New perspectives on the pelagic stage of sea turtle development. *Conserv. Biol.*, 1(2): 103-121.
- Carreras, C., S. Pont, F. Maffucci, M. Pascual, A. Barcelo, F. Bentivegna, L. Cardona, F. Alegre, M. SanFélix, G. Fernández and A. Aguilar. 2006. Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns. *Mar. Biol.* 149(5): 1269-1279.
- Carreras, C., M. Pascual, L. Cardona, A. Aguilar, D. Margaritoulis, A. Rees and M. Khalil. 2007. The genetic structure of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in the Mediterranean as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications. *Conserv. Genet.*, 8 (4): 761-775.
- Ceballos, C. 2003. Distribución de playas de anidación y riesgos para la conservación de tortugas marinas en Caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 33: 79-99.

- Ceballos-Fonseca, C. 2004. Distribución de playas de anidación y áreas de alimentación de tortugas marinas y sus amenazas en el Caribe Colombiano. Bol. Invest. Mar. Cost., 33: 79-99.
- Clusa, M., C. Carreras, L. Cardona, A. Demetropoulos, D. Margaritoulis, A. F. Rees, A. A. Hamza, M. Khalil, Y. Levy, O. Turkozan and A. Aguilar. 2018. Philopatry in loggerhead turtles *Caretta caretta*: beyond the gender paradigm. Mar. Ecol. Prog. Ser., 588: 201-213.
- Conant, T.A., P.H. Dutton, T. Eguchi, S. P. Epperly, C. C. Fahy, M. H. Godfrey, S. L. MacPherson, E. E. Possardt, B. A. Schroeder, J. A. Seminoff and M. L. Snover. 2009. Loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) 2009 status review under the US Endangered Species Act. Report of the loggerhead biological review Team to the National Marine Fisheries Service. 222 p.
- CONAP. 2013. Protocolo para el monitoreo de la temperatura de incubación de nidadas de tortugas marinas. Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas. 27 p.
- Congdon, J. D., A. E. Dunham and R. C. Van Loben Sels. 1994. Demographics of common snapping turtles (*Chelydra serpentina*): implications for conservation and management of long-lived organisms. Am Zool 34(3): 397-408.
- Cummins, P. F. and H. J. Freeland. 2007. Variability of the North Pacific Current and its bifurcation. Prog Oceanogr. 75(2): 253-265.
- Davis, L. M., T. C. Glenn, R. M. Elsey, H. C. Dessauer and R. H. Sawyer. 2001. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, Alligator mississippiensis. Mol. Ecol., 10(4): 1011-1024.
- Deehr, R. A., J. J. Luczkovich, K. J. Hart, L. M. Clough, B. J. Johnson and J. C. Johnson. 2014. Using stable isotope analysis to validate effective trophic levels from Ecopath models of areas closed and open to shrimp trawling in Core Sound, NC, USA. Ecol. Modell., 282: 1-17.
- Domingo, A., L. Bugoni, L. Prosdocimi, P. Miller, M. Laporta, D. Monteiro, A. Estrades y D. Albareda. 2006. El impacto generado por las pesquerías en las tortugas marinas en el Océano Atlántico sudoccidental. WWF Programa Marino para Latinoamérica y el Caribe, San José Costa Rica. 72 p.
- Drosopoulou, E., G. Tsiamis, M. Mavropoulou, S. Vittas, K. A. Katselidis, G. Schofield and Z. G. Scouras. 2012. The complete mitochondrial genome of the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae): Genome description and phylogenetic considerations. Mitochondrial DNA. 23(1): 1-12.
- Encalada, S. E., A. B. Bjorndal, J. C. Bolten, B. Zurita, E. Schroeder, C. J. Possardt and B. W. 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.
- Espejo, M. 2016. Identificación de haplotipos mitocondriales en tortugas *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), provenientes del sector de anidación Guachaca-Don diego, departamento del Magdalena – Colombia. Tesis Biol. Mar., Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. 33 p.

- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Onl.* 1: 47-50.
- FitzSimmons, N.N., Moritz, C., Limpus, C J., Pope, L., y Prince, R. 1997. Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Gen.* 147(4), 1843-1854.
- Fonseca, Y. 2016. Determinación de la variabilidad genética de la tortuga *Caretta caretta* y confirmación del reporte del delfín *Feresa attenuata*, a partir de muestras de ADN mitocondrial, obtenidas por el programa de conservación de tortugas y mamíferos marinos, caribe colombiano. Tesis Biol. Mar., Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 60 p.
- Franco, A. 2010. Haplotipos de la Tortuga cabeza *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae): primer estudio en individuos de las playas don diego (Magdalena) e isla San Martin (Bolívar), Caribe colombiano. Tesis Biol. Mar., Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 78 p.
- Franco-Espinosa, C. and J. Hernández-Fernández. 2012. Description of mtDNA Markers of Loggerhead Turtles from Caribbean Colombia. *MTN.* 132: 3-4.
- Franco-Espinosa, C. y J. Hernández-Fernández. 2017. Análisis de haplotipos de la tortuga cabeza *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) en dos playas del Caribe colombiano. *Rev. LI.* 14(2):121-131.
- Frankham, R., D. A. Briscoe, and J. D. Ballou, 2003. Introduction to conservation genetics. *Marine Turtle Newsletter.* 101: 617
- Fuentes, M. M., M. H. Godfrey, D. Shaver, S. Ceriani, C. Gredzens, R. Boettcher, D. Ingram, M. Ware and N. Wildermann. 2019. Exposure of Marine Turtle Nesting Grounds to Named Storms Along the Continental USA. *Remote Sensing.* 11(24): 2996.
- Garofalo, L., A. Mastrogiacomo, P. Casale, R. Carlini, C. Eleni, D. Freggi and A. Novelletto. 2013. Genetic characterization of central Mediterranean stocks of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) using mitochondrial and nuclear markers, and conservation implications. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 23 (6): 868-884.
- González-Zuarth, C.A., A. Vallarino y Patino-Martínez. 2014. Las especies “bandera” como bioindicadores ambientales: las tortugas marinas. 439-456. En: González-Zuarth, C.A., A. Vallarino, J. C. Pérez-Jiménez y A. M. Low-Pfeng. *Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental.* ECOSUR, México. 782 p.
- Hamann, M., M. H. Godfrey, J. A. Seminoff, K. Arthur, P. C. R. Barata, K. A. Bjorndal, A. B. Bolten, A.C. Broderick, L. M. Campbell, C. Carreras and P. Casale. 2010. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endanger Species Res.* 11(3): 245-269.
- Hartl, D. L and A. G. Clark. 1997. *Principles of population genetics.* Sunderland, MA: Sinauer associates. 542 p.
- Hatase, H., M. Kinoshita, T. Bando, N. Kamezaki, K. Sato, Y. Matsuzawa and W. Sakamoto. 2002a. Population structure of loggerhead turtles, *Caretta caretta*, nesting in Japan: bottlenecks on the Pacific population. *Mar. Biol.*, 141(2): 299-305.
- Hatase, H., N. Takai, Y. Matsuzawa, W. Sakamoto, K. Omuta, K. Goto, N. Arai and T. Fujiwara. 2002b. Size-related differences in feeding habitat use of adult female

- loggerhead turtles *Caretta caretta* around Japan determined by stable isotope analyses and satellite telemetry. *Mar Ecol Prog S.* 233: 273-281.
- Hatase, H., Y. Matsuzawa, K. Sato, T. Bando and K. Goto. 2004. Remigration and growth of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) nesting on Senri Beach in Minabe, Japan: life-history polymorphism in a sea turtle population. *Mar Biol.* 144(4): 807-811.
- Hays, G. C., A. C. Broderick, B. J. Godley, P. Lovell, C. Martin, B. J. McConnell and S. Richardson. 2002. Biphasal long-distance migration in green turtles. *Anim. Behav.*, 64(6): 895-898.
- Heithaus, M.R., T. Alcoverro, R. Arthur, D. A. Burkholder, K. A. Coates, M. J. Christianen, N. Kelkar, S. A. Manuel, A. J. Wirsing, W. J. Kenworthy and J. W. Fourqurean. 2014. Seagrasses in the age of sea turtle conservation and shark overfishing. *Front. Mar. Sci.*, 1 (28): 1-6.
- Hernández, L. 2015. Evaluación de la variabilidad genética mediante marcadores moleculares mitocondriales en juveniles de tortugas marinas *Caretta caretta* dispuestos a procesos de levante e introducción en el Caribe colombiano. Tesis Biol. Mar., Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 46 p.
- International HapMap Consortium, 2003. The international HapMap project. *Nature*, 426(6968), 789 p.
- INVEMAR. 2002. Áreas de anidación y de alimentación de las tortugas marinas en el Caribe Colombiano. Bogotá. 80 p.
- Jamieson, I. G. 2011. Founder effects, inbreeding, and loss of genetic diversity in four avian reintroduction programs. *Conserv. Biol.*, 25(1): 115-123.
- Karl, S. A. and J. C. Avise. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters; implications from nuclear RFLPs. *Science*. 256: 100- 102.
- Kaufmann, R. 1975. Studies on the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta caretta* (Linne) in Colombia, South America. *Herp.* 323-326.
- LaCasella, E., S. Epperly, M. Jensen, L. Stokes and P. Dutton. 2013. Genetic stock composition of loggerhead turtles *Caretta caretta* bycaught in the pelagic waters of the North Atlantic. *Endang Species Res.* 22. 73:84.
- Lanci, A. K., S. E. Roden, A. Bowman, E. L. LaCasella, A. Frey and P. H. Dutton. 2012. Evaluating buccal and cloacal swabs for ease of collection and use in genetic analyses of marine turtles. *Chelonian conserv. Biol.*, 11(1): 144-148.
- Lancheros, D. 2011. Identificación molecular de la tortuga caguama *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) utilizando el gen mitocondrial Citocromo C oxidasa I (COI). Tesis Biol. Mar., Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 38 p.
- Lambertsen, R. H. 1987. A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. *J. Mammal.* 68(2): 443-445.
- Linnaeus, C. 1758. *Testudo caretta*.
- López, E. A., J. Hernández-Fernández y J. Bernal-Villegas. 2008. Condiciones óptimas de cultivo de linfocitos y análisis parcial del cariotipo de la tortuga cabeza, *Caretta*

- caretta* (Testudines:Cheloniidae) en Santa Marta, Caribe colombiano. Rev. Biol. Trop. 56(3): 1459-1469.
- Luschi, P., G. C. Hays, and F. Papi. 2003. A review of long-distance movements by marine turtles, and the possible role of ocean currents. Oikos. 103(2): 293-302.
- Machado, A y J. A. Bermejo. 2012. Estado de Conservación de la Tortuga Boba (*Caretta caretta*) en las Islas Canarias. Plan de Seguimiento de la Tortuga Boba en Canarias. Santa Cruz de Tenerife: Observatorio Ambiental Granadilla. 154 p.
- Marco, A., O. López, E. Abella, N. Varo, S. Martins, P. Gaona, P. Sanz, L. P. López-Jurado. 2008. Massive capture of nesting females is severely threatening the caboverdian loggerhead population. Proceedings of the 28th International Symposium on Sea Turtles. ISTS. Loreto, Baja California Sur, México 19 – 26.
- Marco, A., C. Carreras y E. Abella. 2009. Tortuga boba – *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758). Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Marco, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <https://bit.ly/2FBix1E>. 08/02/2019.
- Marcovaldi, M. A., V. Patiri and J. C. Thomé. 2005. Projeto TAMAR-IBAMA: twenty-five years protecting Brazilian sea turtles through a community-based conservation programme. Marit Stud. 3(2): 39-62.
- Marcovaldi, M. A. and M. Chaloupka. 2007. Conservation status of the loggerhead sea turtle in Brazil: an encouraging outlook. Endanger Species Res. 3(2):133-143.
- Margaritoulis, D., R. Argano, I. Baran, F. Bentivegna, M. N. Bradai, J. A. Camiñas, P. Casales, G. De Metrio, A. Demetropoulos, G. Gerosa, B. J. Godley, D. A. Haddoud, J. Houghton, L. Laurent, B. Lazar. 2003. Loggerhead turtles in the Mediterranean Sea: present knowledge and conservation perspectives. In: Bolten A.B., B.E. Witherington (eds) Loggerhead sea turtles. Smithsonian Books, Washington DC. 175–198.
- Márquez, R., y Ma. del C, Jiménez. 2010. El posible efecto del cambio climático en las tortugas marinas.97-112. En: A.V. Botello, S. Villanueva-Fragoso, J. Gutiérrez, y J.L. Rojas Galaviz (ed.). Vulnerabilidad de las zonas costeras mexicanas ante el cambio climático. Semarnat-INE, UNAM-ICMYL, Universidad Autónoma de Campeche. 514 p.
- Martin, R. E. 1996. Storm impacts on loggerhead turtle reproductive success. MTN. 73: 10-12.
- Martínez-Ortega, J y J. Hernández-Fernández. 2013. Método Taguchi para optimizar marcadores RAPD.PCR y determinar diversidad genética: un modelo, la tortuga cabezona *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae). MUTIS Universidad Jorge Tadeo Lozano. 3(2): 21-30.
- Matsuzawa, Y., N. Kamezaki, T. Ishihara, K. Omuta, H. Takeshita, K. Goto, T. Arata, H. Honda, K. Kameda, Y. Kashima and M. Kayo. 2016. Fine-scale genetic population structure of loggerhead turtles in the Northwest Pacific. Endang. Species Res., 30: 83-93.
- Mazaris, A. D., V. Almpnidou, B. P. Wallace, J. D. Pantis and G. Schofield. 2014. A global gap analysis of sea turtle protection coverage. Biol Conserv. 173: 17-23.

- Meylan, A. B., B. W. Bowen and J. C. Avise. 1990. A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Science*, 248 (4956): 724-727.
- Meylan, A., B. Schroeder and A. Mosier. 1995. Sea turtle nesting activity in the state of Florida. *Florida Mar. Res. Pub.*, 52: 1-51.
- Millot, C. 2001. Mesoscale and seasonal variabilities of the circulation in the western Mediterranean. *Dynam. Atmos Ocean*. 15(3-5): 179-214.
- Ministerio del Medio Ambiente. 2002. Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales de Colombia. Bogotá, Colombia. 63 p.
- Monzón-Argüello, C., C. Rico, C. Carreras, P. Calabuig, A. Marco and L. F. López-Jurado. 2009. Variation in spatial distribution of juvenile loggerhead turtles in the eastern Atlantic and western Mediterranean Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 373(2): 79-86.
- Monzón-Argüello, C., C. Rico, E. Naro-Maciel, N. Varo-Cruz, P. López, A. Marco and L. F. 2010. Population structure and conservation implications for the loggerhead sea turtle of the Cape Verde Islands. *Conserv Gen.* 11(5): 1871-1884.
- Monzón-Argüello, C., F. Dell'Amico, P. Morinière, A. Marco, L. F. López-Jurado, G. C. Hays, R. Scott, R. Marsh and P. L. Lee. 2012. Lost at sea: genetic, oceanographic and meteorological evidence for storm-forced dispersal. *J. R. Soc Interface* 9(73):1725-1732.
- Morales-Betancourt, M. A., C. A. Lasso, V. P. Paéz y B. C. Bock. 2015. Libro rojo de reptiles de Colombia. Instituto de investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Universidad de Antioquia. Bogotá. 257 p.
- Moritz, C. 1994. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9(10):373-375.
- Mortimer, J. A. 1985. Factors influencing beach selection by nesting sea turtles. 45-51. En: Bjorndal (Ed.). *Biology and conservation of sea turtles*. SIP, Washington, D. C. 615 p.
- Mullis K. B. and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 55: 335-350.
- Murphy, T. M. and S. R. Hopkins. 1984. Aerial and ground surveys of marine turtle nesting beaches in the southeast region, U.S. Report no. NA83-GA-C-00021. NMFS, Southeast Fisheries Center Miami, Florida.
- Musick, J. and C. Limpus. 1997. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. 137–163. In: Lutz, P and J. Musick. *The biology of sea turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL. 446 p.
- Naranjo L.G. y J. D. Amaya. (Eds). 2009. Plan Nacional de las especies migratorias. Diagnóstico e identificación de acciones para la conservación y el manejo sostenible de las especies migratorias de la biodiversidad en Colombia, Bogotá. 214 p.
- Norgen Biotek Corporation Saliva DNA Collection. 2012. Preservation and Isolation Kit: product insert. Thorold, ON, Canada. <https://bit.ly/2FjoEpX>. 21/01/2019.
- Okuyuma, T. and B. Bolker. 2005. Combining genetic and ecological data to estimate sea Turtle origins. *Ecol Appl.* 15(1): 315–325.

- Parker, D. M. 2002. Dietary components of pelagic loggerhead turtles in the North Pacific Ocean. In: Proceedings of the Twentieth Annual Symposium on Sea Turtle Biol Conserv, February 29-March 4, 2000, Orlando, FL.
- Piñero, D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha y R. Salas. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Capital natural de México*. 1:415-435.
- Polovina, J. J., G. H. Balazs, E. A. Howell, D. M. Parker, M. P. Seki and P. H. Dutton. 2004. Forage and migration habitat of loggerhead (*Caretta caretta*) and olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) sea turtles in the central North Pacific Ocean. *Fish Oceanogr*, 13(1): 36-51.
- Poschadel, J. R. and D. Möller. 2004. A versatile field method for tissue sampling on small reptiles and amphibians, applied to pond turtles, newts, frogs and toads. *Conserv. Genet.*, 5(6): 865-867.
- Povh, J. A., N. M. Lopera-Barrero, R. P. Ribeiro, E. Lupchinski, P. C. Gomes and T. S. Lopes. 2008. Genetic monitoring of fish repopulation programs using molecular markers. *Cien. Inv. Agr.* 35 (1): 5-15.
- Quintero, A. 2016. Aplicación de marcadores mitocondriales en juveniles de *Caretta caretta* del programa de conservación de tortugas marinas–ProCTM. Caribe colombiano. Tesis Biol. Mar., Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 47 p.
- Rees, A. F., S. Al Saady, A. C. Broderick, M. S. Coyne, N. Papathanasopoulou and B. J. Godley. 2010. Behavioural polymorphism in one of the world's largest populations of loggerhead sea turtles *Caretta caretta*. *Mar. Ecol. Prog.* 418: 201-212.
- Reis, E.C., Soares, L.S., Vargas, S.M., Santos, F.R., Young, R.J., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B. and Lôbo-Hajdu, G. 2010. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conserv Genet.* 11(4): 1467-1477.
- Rincón-Díaz, M. P y C. J. Rodríguez- Zárte. 2004. Caracterización de playas de anidación y zonas de alimentación de tortugas marinas en el archipiélago de san Bernardo, Caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 33: 137-158.
- Rocha, M y J. Gasca. 2007. Ecología molecular de la conservación. 251-272. En: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre. Eds. *Ecología Molecular*. SEMARNAT–INE–UNAM–CONABIO, México. 608 p.
- Ross, J. P. and M. A. Barwani. 1982. Review of sea turtles in the Arabian area. 373-383. In: K. A. Bjorndal (Ed.) *Biol. Conserv. Sea Turtles* – Washington D.C.
- Ruiz, A. R. 2008. Genética poblacional y filogeografía de *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*: Una perspectiva regional con énfasis en el suroeste de Cuba. Tesis de grado científico para optar por el título de doctor de ciencias biológicas. Universidad de la Habana, Cuba. 141 p.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839): 487-491.
- Shamblin, B.M., M. G. Dodd, D. A. Bagley, L. M. Ehrhart, A. D. Tucker, C. Johnson, R. R. Carthy, R. A. Scarpino, E. McMichael, D. S. Addison and K. L. Williams. 2011.

Genetic structure of the southeastern United States loggerhead turtle nesting aggregation: evidence of additional structure within the peninsular Florida recovery unit. *Mar Biol.* 158(3): 571-587.

Shamblin, B. M., A. B. Bolten, A. Abreu-Grobois, K. A. Bjorndal, L. Cardona, C. Carreras, M. Clusa, C. Monzón-Arguello, C. J. Narin, J. T. Nielsen, R. Nel, L. S. Soares, K. R. Stewart, S. T. Vilaca, O. Turkozan, C. Yilmaz and P. H. Dutton. 2014. Geographic patterns of genetic variation in a broadly distributed marine vertebrate: New insights into Loggerhead turtle stock structure from expanded mitochondrial DNA sequences. *PLoS ONE*, 9 (1): 1-12.

Shamblin, B. M., D. A. Bagley, L. M. Ehrhart and C. J. Nairn. 2015. Mitochondrial repeat haplotypes suggest local origins for CM-A13 green turtles foraging in Florida. *Mar. Turtle Newsl.*, 146: 11-13.

Snover, M. L. 2002. Growth and ontogeny of sea turtles using skeletochronology: methods, validation and application to conservation (Doctoral dissertation, Duke University). 144 p.

Splendiani, A., T. Fioravanti, M. Giovannotti, A. D'Amore, G. Furi, G. Totaro, A. Nisi Cerioni, A. Lucchetti and V. Caputo Barucchi. 2017. Mitochondrial DNA reveals the natal origin of *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) stranded or bycaught along the Southwestern Adriatic coasts, *Eur. Zool. J.* 84:1, 566-574.

Tajima, M. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Thomas, A., J. C. Dietrich, T. G. Asher, M. Bell, B. O. Blanton, J. H. Copeland, A. T. Coxe, C. N. Dawson, J. G. Fleming and R. A. Luettich. 2019. Influence of storm timing and forward speed on tides and storm surge during Hurricane Matthew. *Ocean Model.* 137: 1-19

Torres-Rodríguez, J. A., L. J. Hernández-Rivera, J. Bernal-Gutiérrez, K. Pabón-Aldana, A. G. Jauregui-Romero and P. O. Lecompte-Pérez. 2017. Successful Use of Buccal Swabs to Obtain Genetic Material from Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*). *MTN.* 153: 1-4.

UICN. 2017. Red list of Threatened Species. www.iucnredlist.org. Fecha de consulta: Agosto del 2019.

Wallace, B.P., A. D. DiMatteo, B. J. Hurley, E. M. Finkbeiner, A. B. Bolten, M. Y. Chaloupka, B. J. Hutchinson, F. A. Abreu-Grobois, D. Amorcho, K. A. Bjorndal and J. Bourjea. 2010. Regional management units for marine turtles: a novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. *Plos one.* 5(12): e15465.

Waser, P. M. and W. T. Jones. 1983. Natal philopatry among solitary mammals. *Q. Rev Biol.* 58(3): 355-390.

Witham, R. 1980. The "lost year" question in young sea turtles. *Amer. Zool.* 20: 525-530.

Witt, M. J., R. Penrose and B. J. Godley. 2007. Spatio-temporal patterns of juvenile marine turtle occurrence in waters of the European continental shelf. *Mar Biol.* 151(3), 873-885.

- Witt, M. J., L. A. Hawkes, M. H. Godfrey, B. J. Godley and A. C. Broderick. 2010. Predicting the impacts of climate change on a globally distributed species: the case of the loggerhead turtle. *J. Exp. Biol.* 213(6): 901-911.
- Yilmaz, C., O. Turkozan, and F. Bardakci. 2011. Genetic structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) populations in Turkey. *Biochem. Syst. Ecol.*, 39 (4): 266-276.
- Yilmaz, C., O. Turkozan, F. Bardakci, M. White and E. Kararaj. 2012. Loggerhead turtles (*Caretta caretta*) foraging at Drini Bay in Northern Albania: Genetic characterisation reveals new haplotypes. *Acta Herpetol.* 7(1): 155-162.

12. ANEXO

Anexo A

