

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA COLONIA REPRODUCTIVA DE LA
TORTUGA MARINA GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*, Eschscholtz 1829)
EN PLAYA PALMERAS - PARQUE NACIONAL NATURAL GORGONA,
PACÍFICO COLOMBIANO**

LINDAMAR CAMACHO MOSQUERA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
ÉNFASIS EN ZOOLOGÍA
POPAYÁN
2006**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA COLONIA REPRODUCTIVA DE LA
TORTUGA MARINA GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*, Eschscholtz 1829)
EN PLAYA PALMERAS - PARQUE NACIONAL NATURAL GORGONA,
PACÍFICO COLOMBIANO**

Lindamar Camacho Mosquera

Trabajo de Grado como requisito para optar al título de Biólogo

Director:

Diego Amorocho

Biólogo y Ambientalista. Cand. Ph. D.

Codirector:

Luz Marina Mejía-Ladino

Biólogo Marino. Cand. M. Sc.

Asesores:

Juan Diego Palacio Mejía, M. Sc.

Coordinador Laboratorio de Biología Molecular (IAvH)

María del Pilar Rivas Pava, M. Sc.

Bióloga.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
ÉNFASIS EN ZOOLOGÍA
POPAYÁN
2006**

A Dios, Gracias...

Por ser el autor principal de éste gran esfuerzo y logro alcanzado en mi vida, por ser mi soporte y fortaleza, por permitirme recibir el apoyo constante e incondicional de mi familia, y de todas aquellas personas que aportaron en la realización del mismo. Les dedico este triunfo con el mayor amor del mundo.



AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue realizada gracias al apoyo financiero, técnico y logístico del Laboratorio de Biología Molecular y Colección de Tejidos del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt – IavH, al Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives de Andrés” – INVEMAR, al Centro de Investigación para el Manejo Ambiental y el Desarrollo – CIMAD y a Conservación Internacional Colombia. A la Universidad del Cauca, por transmitirme todo el conocimiento a través de los docentes que me formaron como profesional, en especial al Dr. Santiago Ayerbe, a Jimmy Guerrero, María del Pilar Rivas, Luis Germán Gómez y a todo el equipo del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca (MHNUC). A mis compañeros y amigos durante el desarrollo de mi carrera.

Igualmente quiero agradecer a Diego Fernando Amorocho por la dirección, dedicación y gran conocimiento aportado durante el desarrollo del proyecto. A Luz Marina Mejía Ladino por su codirección, inmenso apoyo, y amistad brindada durante todas las etapas del proyecto. A Juan Diego Palacio Mejía y Carolina Villafañe por su constante guía, gran colaboración, paciencia y amistad durante mi permanencia en el laboratorio. A toda la familia Humboldtiana, a mis compañeros y amigos (Diana López, Laura Gómez, Natalia González, Angela Mina, Oscar Estrada y Clara Milena Matayala), en especial a Dora Barrios, Selene escobar y Carlos Díaz, quienes me brindaron su más sincera amistad y aportaron a mi formación como investigadora y persona. A Carlos Pinilla, por su gran apoyo y por creer en mi trabajo, de igual manera a cada uno de mis compañeros de la sede Pacífico del INVEMAR.



A Jason Rausher por su gran conocimiento y constante colaboración en la fase de laboratorio y análisis de resultados. A todo el equipo de Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), en especial a Gerardo Gallego por permitirme acceder a equipos que fueron indispensables durante la fase de laboratorio, a Jaime Vargas por las innumerables cuantificaciones de ADN y sus consejos, a Fausto Rodríguez y Germán Plata por su paciencia y enseñanza de los diferentes programas para el manejo de secuencias de ADN. A Diana Bernal por su constante ayuda en las pruebas de secuenciación iniciales. A Mauricio Soto por guiarme en la elaboración de los cebadores, y a todas aquellas personas que en cualquier etapa de mi trabajo me ofrecieron su apoyo incondicional. A Fernando Rondón por sus consejos, paciencia y constante colaboración en el manejo de los programas empleados para el análisis de los datos. A Raúl Sedano por las sugerencias brindadas durante el manejo de los programas de filogenia. A Olga Lucía Torres, Javier Rodríguez y Alejandro Pavía por la guía, paciencia y compañerismo durante la fase de campo. Al Doctor Fernando Castro y Carlos Pérez por permitirme recibir clases de Bioinformática en la Universidad del Valle, las cuales fueron de gran aporte para el entendimiento de los resultados obtenidos.

Gracias a Dios por permitirme alcanzar una meta más de todas aquellas que me he propuesto, por darme la calma, el entendimiento y la perseverancia en todos los momentos de mi vida. A mi familia, el mayor de mis agradecimientos, por ayudarme a ser tan exitosa como me siento ahora, por brindarme su constante amor, apoyo y confianza incondicional durante los momentos más felices y difíciles de mi vida. A Fernando Rodríguez por su inmenso amor, paciencia y por sus innumerables consejos que me incentivaron a seguir luchando a pesar de tantos obstáculos.



RESUMEN

La tortuga marina golfinia (*Lepidochelys olivacea*) es la especie predominante en playas del Pacífico colombiano durante su época de reproducción. Actualmente es la especie más abundante de las ocho existentes en el mundo, sin embargo, es una de las más explotadas en las costas del Pacífico colombiano (Rueda 1988, Amorochó *et al.* 1992). La golfinia ha sido reportada, a nivel nacional, en el Libro Rojo de Reptiles de Colombia (Castaño 2002); y a nivel mundial, en las Listas de la Unión Internacional para la Naturaleza (UICN) como especie en peligro (EN).

Con el fin de caracterizar genéticamente la colonia reproductiva de la tortuga golfinia en el Parque Nacional Natural Gorgona (PNNG), entre el 2004 y 2005, el Centro de Investigación para el Manejo y el Desarrollo Ambiental (CIMAD) colectó muestras de tejido muscular y/o sanguíneo de hembras anidantes o neonatos, las cuales fueron preservadas en buffer de lisis (0.1M Tris, 0.1M EDTA, 0.01M NaCl y 0.5% SDS) y actualmente se encuentran depositadas en la Colección de Tejidos del Instituto Alexander von Humboldt (IAvH). Se realizó la extracción de ADN de las 29 muestras obtenidas y posteriormente fueron amplificadas mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando los cebadores específicos para dos secciones de la región control (*D-loop*) del ADNmt, y posteriormente ser secuenciadas. La diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) fueron calculadas usando el programa ARLEQUIN versión 2.0 (Schneider *et al.* 2000). El modelo evolutivo fue evaluado mediante Modeltest versión 3.7 para Macintosh (Posada y Crandall 1998). Para comparar las secuencias obtenidas en este estudio con las reportadas en la base de datos del *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*, USA: NCBI Home page



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) se realizó inferencia filogenética empleando dos métodos: 1) Método de matriz de distancia -*Neighbor Joining* (NJ)- utilizando el software PHYLIP versión 3.6 (Felsenstein 1985), y 2) Método de Máxima Parsimonia (MP) usando el software MEGA versión 3.1 (Kumar *et al.* 2004).

Se obtuvieron valores bajos de diversidad genética ($h=0.069$ y $\pi=0.023\%$) debido posiblemente a: 1) Predominancia del haplotipo K (99.6%); 2) Longevidad y baja tasa metabólica de las tortugas (Avisé *et al.* 1992); 3) Presencia de dos haplotipos (K y E) sugiriendo una colonia relativamente joven, ya que según López-Castro *et al.* (2005), la alta diversidad haplotípica es indicador de colonias viejas; y 4) Efecto “cuello de botella” por una sobre-explotación entre los 70’ y 80’ (Aguíño com. per. 2006).

Al finalizar la investigación se concluyó que: 1) Los haplotipos del PNNG son similares a los del Sur de Baja California, abriendo la posibilidad de recolonizar cualquiera de las dos colonias en caso de extirparse algunas de ellas; 2) Se confirma la presencia de dos regiones geográficas diferenciadas haplotípicamente (Pacífico oriental y este de la India); 3) Se corrobora lo planteado por Avisé *et al.* (1992) y Bowen *et al.* (1995) quienes afirman que los Testudines presentan una baja diversidad genética; y 4) La identificación genética obtenida es un insumo para definir las unidades de manejo requeridas para la implementación de las estrategias de conservación.



CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	6
1.1 Objetivo general	6
1.2 Objetivos específicos	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 TAXONOMÍA	7
2.2 GENERALIDADES DEL ORDEN TESTUDINATA	7
2.3 CICLO DE VIDA DE LAS TORTUGAS MARINAS	12
2.4 GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN	13
2.4.1 Diversidad Genética	13
2.4.2 Marcadores Moleculares de ADN	14
2.5 INFERENCIA FILOGENÉTICA	16
2.6 BIOGEOGRAFÍA	16
3. ANTECEDENTES	18
3.1 ESTADO ACTUAL DE CONSERVACIÓN DE LAS TORTUGAS MARINAS	18
3.2 NIVEL DE CONOCIMIENTO DE LA TORTUGA GOLFINA (<i>Lepidochelys olivacea</i>) EN OTRAS REGIONES (ATLÁNTICO, PACÍFICO E ÍNDICO)	19
3.2.1 Atlántico	19
3.2.2 Pacífico	20
3.2.3 Índico	20
3.3 NIVEL DE CONOCIMIENTO DE LA TORTUGA GOLFINA (<i>Lepidochelys olivacea</i>) EN EL PACIFICO COLOMBIANO	21
3.4 LOS MARCADORES MOLECULARES Y SU APLICACIÓN EN EL CONOCIMIENTO DE LA HISTORIA NATURAL Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS TORTUGAS MARINAS	22
4. ÁREA DE ESTUDIO	26
4.1 GENERALIDADES	26
4.2 GEOLOGÍA	26
4.3 OCEANOGRAFÍA Y RÉGIMEN HIDROGRÁFICO	28
4.4 PLAYA PALMERAS	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 FASE DE MUESTREO	29



5.2 FASE DE LABORATORIO	34
5.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
6. RESULTADOS	41
6.1 ABUNDANCIA RELATIVA DE NIDOS Y HUEVOS DE LA COLONIA REPRODUCTIVA	41
6.2 EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE PCR	41
6.3 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL (<i>D-loop</i>) DEL ADNmt	42
6.4 DIVERSIDAD GENÉTICA BASADA EN UN SEGMENTO DE LA REGIÓN CONTROL (<i>D-loop</i>) DE LA MITOCONDRIA	43
6.5 ANÁLISIS DE UN SEGMENTO DE LA REGIÓN CONTROL (<i>D-loop</i>) A PARTIR DE INFERENCIA FILOGENÉTICA	47
6.5.1 Clade 1	50
6.5.2 Clade 2	50
6.5.3 Clade 3	51
6.5.4 Clade 4	51
7. DISCUSIÓN	52
7.1 NOMENCLATURA HAPLOTÍPICA	52
7.2 DIVERSIDAD GENÉTICA EN LA COLONIA DEL PNNG	53
7.3 COMENTARIOS ACERCA DE LA BIOGEOGRAFÍA DEL GÉNERO <i>Lepidochelys</i>	55
7.4 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	56
8. CONCLUSIONES	58
9. RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS	62



LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.	Vista lateral de la tortuga golfina. (Tomado y modificado de www.seaturtle.org).	9
Figura 2.	Vista ventral de la tortuga golfina. Cada escudo presenta un poro (Tomado y modificado de www.seaturtle.org).	9
Figura 3.	Áreas de reproducción y alimentación de las tortugas marinas en el Pacífico colombiano (Tomado del Centro de Investigación para el Manejo Ambiental y el Desarrollo – CIMAD 2002).	11
Figura 4.	Ciclo de vida de las tortugas marinas (Tomado de Proyecto Karumbé, en línea: www.geocities.com).	13
Figura 5.	ADN mitocondrial. Región control (<i>D-loop</i>) señalada en color blanco (Tomado de Lewin 1997).	15
Figura 6.	Mapa del área de estudio. PNNG. (Tomado del Centro de Investigación para el Manejo Ambiental y el desarrollo - CIMAD 2004).	27
Figura 7.	Pasos para la reubicación de huevos de tortuga golfina a un nuevo nido construido replicando las condiciones originales.	32
Figura 8.	Medición y pesaje de huevos de tortuga golfina escogidos al azar.	33
Figura 9.	Huevos de tortuga golfina depredados en la playa por cangrejos ermitaños (<i>Coenobita</i> sp.).	33
Figura 10.	Visualización de extracción de ADN de tortuga golfina con Kit Qiagen.	42
Figura 11.	Amplificación de la región control (<i>D-loop</i>) entre una longitud de 300 – 400 pares de bases, empleando cebadores FDL01 y RDL01.	42
Figura 12.	Ejemplo de un cromatograma de una muestra de tortuga golfina empleando el cebador FDL01.	43
Figura 13.	Árbol consenso obtenido bajo el método de distancia <i>Neighbor Joining</i> . Sobre cada rama se muestra el valor del soporte <i>bootstrap</i> , y en la mayoría de los casos se incluyeron los soportes mayores al 50%.	48
Figura 14.	Árbol consenso obtenido bajo el método de Máxima Parsimonia. Sobre cada rama se muestra el valor del soporte <i>bootstrap</i> , y en la mayoría de los casos se incluyeron los soportes mayores al 50%.	49



LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.	Descripción general de la tortuga golfina. (Tomado y modificado de Pritchard <i>et al.</i> 2000 y Chacón <i>et al.</i> 2000).	10
Tabla 2.	Listado de muestras de tejido empleadas para la obtención de ADN. RTG: Reproducción Tejido Gorgona y RSG: Reproducción Sangre Gorgona.	29
Tabla 3.	Formato de campo empleado durante los patrullajes nocturnos en playa Palmeras, PNNG.	31
Tabla 4.	Formato de campo empleado durante la exhumación de nidos en los patrullajes en playa Palmeras, PNNG.	34
Tabla 5.	Protocolo de extracción de ADN (Fitzsimmons <i>et al.</i> 1996) y evaluación de la calidad del ADN de tejido animal.	36
Tabla 6.	Protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	37
Tabla 7.	Descripción de las secuencias empleadas del <i>GenBank</i> . La columna No. 1 (código/haplotipo) describe el código de identificación en los árboles de <i>Neighbor-Joining</i> y Máxima Parsimonia, así como el nombre del haplotipo designado según la base de datos utilizada. Los haplotipos presentes en la colonia del PNNG han sido señalados con un triángulo.	39
Tabla 8.	Secuencias de haplotipos encontrados en la colonia reproductiva de playa Palmeras – PNNG, al alinear 291 pares de bases de la región control del ADNmt. Las homologías son señaladas con un asterisco y el sitio polimórfico de color rojo.	45
Tabla 9.	Secuencias de haplotipos encontrados en la colonia reproductiva de playa Palmeras – PNNG, al alinear aproximadamente 526 pares de bases de la región control del ADNmt en el cual se registran los dos sitios polimórficos del haplotipo E. Las homologías son señaladas con un asterisco y los sitios polimórficos de color rojo.	46
Tabla 10.	Sitios polimórficos característicos de los haplotipos en cada una de las regiones geográficas (Pacífico oriental, India y Atlántico).	51



INTRODUCCIÓN

Actualmente se conocen siete especies de tortugas marinas representadas por dos familias: Cheloniidae con seis especies, *Chelonia mydas* (verde), *Natator depressus* (espalda plana), *Eretmochelys imbricata* (carey), *Caretta caretta* (cabezona), *Lepidochelys olivacea* (golfinia o caguama del Pacífico), *Lepidochelys kempii* (lora) y *Chelonia agassizii* (prieta o verde del Pacífico). Esta última es considerada una octava especie (Pritchard 1999), a pesar de que recientes estudios la consideran una subespecie, *Chelonia mydas agassizii* (Meylan *et al.* 2000, Karl y Bowen 1999). La otra familia es la Dermochelyidae, representada por una especie, *Dermochelys coriacea* (laúd). En el Pacífico colombiano se han reportado cuatro especies de tortugas marinas: carey laúd, negra y golfinia. (Rueda 1988, Amorocho *et al.* 1992, Amorocho *et al.* 2001).

Las tortugas marinas son especies de amplia distribución, con un rango geográfico que cubre desde la Patagonia hasta Alaska, como sucede con la tortuga laúd, la cual soporta temperaturas extremadamente bajas. Las otras especies prefieren habitar los mares tropicales y subtropicales del planeta, por sus aguas calidas y templadas. Este es el caso de la tortuga golfinia, la cual es abundante en las costas tropicales del océano Pacífico, la India y el sur del océano Atlántico (Pritchard 1979). Esta especie realiza largas migraciones entre sus áreas de alimentación, apareamiento, y sus playas de reproducción, siendo una especie bioindicadora de la calidad de los ambientes costeros y marinos. El tiempo que tardan los individuos para llegar al estado de madurez sexual y las largas travesías que realizan para cumplir con sus requerimientos biológicos, permiten observar en un período largo de tiempo las variaciones en la condición de los ambientes que frecuentan (Frazier 2000). Las tortugas marinas enfrentan múltiples amenazas directas e indirectas, resultado de actividades ejercidas por el hombre



como son: la captura de individuos en las playas de reproducción y en el agua (Rueda 1988; Amorocho *et al.* 1992, Sánchez y Quiroga 2001, Amorocho 2002), el consumo y la comercialización de productos y subproductos, el saqueo de nidos en las áreas de desove; el deterioro de los hábitats de reproducción y alimentación; además de otras presiones ejercidas por depredadores naturales en tierra y mar (Rodríguez *et al.* 2002, Ceballos *et al.* 2003).

De otro lado, la pesca artesanal e industrial han sido identificadas como las principales actividades responsables de la mortalidad de muchas especies en las últimas dos décadas, y de la declinación de las poblaciones de tortuga caguama, verde y sobretodo de la laúd en el Pacífico oriental (Owens *et al.* 1989, Seminoff 2000, Spotila *et al.* 1996, Spotila *et al.* 2000). Diez años atrás, estimaciones y extrapolaciones hechas por Duque-Goodman (1988), confirmaron la muerte de aproximadamente 8321 tortugas marinas atrapadas en las redes camaroneras de los barcos arrastreros que faenan en el Pacífico colombiano. Las especies capturadas incidentalmente fueron la golfina y la verde.

Colombia esta incluida dentro de las doce naciones con mayor riqueza biológica del planeta; ocupando el cuarto lugar en diversidad de reptiles. Aproximadamente el 70% de ellos están amenazados en Colombia y a pesar de ser un grupo reconocido como objeto de conservación por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SINAP), no hay garantía de supervivencia a largo plazo. La perturbación y destrucción de las áreas críticas para el cumplimiento de su ciclo de vida y el desconocimiento sobre la historia natural de la mayor parte de las especies de la herpetofauna nacional, han contribuido sensiblemente a la drástica reducción de las poblaciones en Colombia (Rueda 1999). A nivel mundial todas las especies de tortugas marinas se encuentran incluidas en el Apéndice I de CITES, (Convención Internacional para el Comercio de Especies de Fauna y Flora en Peligro de Extinción, por su sigla en inglés). También están consideradas, en el Anexo II de la Ley 356 de 1997 – Protocolo SPAW (Relativo a las Áreas, a la Flora



y Fauna Silvestres Especialmente Protegidas del Convenio para la Protección y el Desarrollo del Medio Marino en la Región del Gran Caribe), de la Convención en Cartagena de Indias en marzo de 1983 (SPAW, en línea: web.minambiente.gov.co/html/neginternal/AcuerdosRegionales/Spaw/Index.htm), así como en los Apéndices I y II de la Convención de Bonn (Convención sobre la conservación de las especies migratorias de animales silvestres) (CMS, en línea: www.cms.int/). Estos reptiles marinos constituyen uno de los grupos de vertebrados tetrápodos con más alto riesgo de extinción en el mundo, según los listados de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). El Libro Rojo de Reptiles de Colombia (Castaño-Mora 2002) clasifica con base en las categorías propuesta por la UICN a la tortuga carey en peligro crítico (CR), mientras que la tortuga golfinia la más explotada en las costas del Pacífico colombiano (Amorocho *et al.* 1992), junto con la cabezazona, la verde y la laúd, están catalogadas en peligro (EN).

Con base en estos antecedentes y teniendo en cuenta la información arrojada por el diagnóstico sobre el estado actual de las tortugas marinas en Colombia, el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT), junto con otras entidades gubernamentales, no gubernamentales y comunidades de base, en su función de proteger las especies de fauna silvestre que se encuentran en extinción o en peligro, publicó el “Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales de Colombia”. Este documento resalta la importancia que tiene la investigación dirigida al conocimiento de la historia natural de las especies de quelonios presentes en el país, identificando las causas de disminución y mortalidad, y formulando acciones para su conservación que lleven a recuperar los tamaños históricos de las poblaciones en el marco del desarrollo humano sostenible (Rodríguez *et al.* 2002).

Para contribuir a la implementación de las líneas de acción propuestas por el Programa Nacional, es prioritario identificar las poblaciones de las diferentes



especies para protegerlas. Esto implica utilizar las herramientas técnicas y científicas disponibles que permitan generar el conocimiento para la toma de decisiones en materia de conservación. Una de estas herramientas son las técnicas de biología molecular actualmente disponibles de rápida aplicabilidad. La identificación genética mediante el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt), heredado por vía materna, permite dilucidar cuál es la playa de origen del individuo y a qué población corresponde cuando se mezcla con otros en hábitats de alimentación (FitzSimmons *et al.* 2000). Mediante la identificación genética de las poblaciones es posible definir las unidades demográficas o de manejo (UM). Esta información es fundamental para trazar estrategias de conservación regional y saber sí en caso de que una colonia reproductiva sea extirpada de una playa, pueda eventualmente ser re-colonizada por hembras de otras playas, pertenecientes a la misma UM, ó por el contrario, desaparecer para siempre como potencial reproductivo de la especie. Este conocimiento complementado con la recaptura de individuos físicamente marcados, puede señalar la existencia de patrones migratorios e indicar hasta donde puede extenderse una población más allá del lugar de marcaje. Además, la información genética es valiosa para demostrar eventos de colonización originados a grandes distancias; lo que actualmente se dificulta con las técnicas de marcaje disponibles (Bowen *et al.* 1992, Bowen *et al.* 1995).

En consecuencia, el presente estudio pretende: 1. Caracterizar genéticamente la colonia reproductiva de la tortuga golfinia empleando un marcador molecular de ADNmt; 2. Describir los haplotipos característicos de la colonia reproductiva del PNNG, aportando a la construcción del mapa filogenético de la especie a nivel global y a la identificación de las colonias reproductivas que frecuentan el Pacífico colombiano; 3. Contribuir con información útil para ubicar a los individuos de tortuga golfinia que desovan en el PNNG, en áreas de forrajeo, reproducción y/o rutas migratorias, ó en sitios donde pudieran estar siendo capturados en la cuenca del Pacífico; 4. Aportar al conocimiento de la historia natural y biogeografía de la



tortuga golfinia en el ámbito mundial; 5. Proveer elementos para definir estrategias de manejo y conservación sustentadas en la mejor información científica disponible; 6. Continuar con la Línea de Investigación que coordina el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andrés - INVEMAR a nivel nacional, quien ha desarrollado trabajos con tortugas marinas dentro del Programa Biodiversidad y Ecosistemas Marinos (BEM), no sólo en el Pacífico, sino en el Caribe colombiano; 7. Contribuir al conocimiento de la biodiversidad colombiana desde una perspectiva genética liderado a nivel nacional por el Laboratorio de Biología Molecular y Colección de Tejido del Instituto Alexander von Humboldt - IAvH; 8. Generar información científica para la conservación de las tortugas marinas en Colombia abanderada por el Centro de Investigación para el Manejo y el Desarrollo - CIMAD y 9. Producir insumos para la implementación del Programa Nacional de Tortugas Marinas y Continentales, contribuyendo a la implementación del Plan de Manejo del PNNG.



1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Caracterizar genéticamente la colonia reproductiva de la tortuga marina golfina (*Lepidochelys olivacea*) en playa Palmeras – PNNG, mediante el análisis de secuencias de ADNmt.

1.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar la diversidad haplotípica de la colonia reproductiva de la tortuga golfina que confluye en el PNNG.
- ❖ Definir el número de haplotipos diferentes que integran la colonia reproductiva de la tortuga golfina en el PNNG.
- ❖ Comparar los haplotipos de la colonia reproductiva de la tortuga golfina en el PNNG con aquellos identificados en otros lugares del mundo.



2. MARCO TEÓRICO

A continuación se presenta la clasificación taxonómica para el grupo de las tortugas marinas, se hace una breve descripción de su historia evolutiva, generalidades sobre la familia donde se encuentra la especie en estudio, morfología, características durante la época de anidación y ciclo de vida de la tortuga golfina. También se realiza una pequeña introducción a los conceptos de la genética de la conservación y biogeografía.

2.1 TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica fue tomada de Lambert 1997; Renjifo y Lundberg 1999, Pritchard y Mortimer 2000).

Clase Reptilia
Subclase Anapsida
Orden Chelonia o Testudinata (Tortugas)
Suborden Cryptodira (Tortugas marinas o terrestres)
Familia Cheloniidae (Tortugas marinas)
Especie *Lepidochelys olivacea* (golfina)

2.2 GENERALIDADES DEL ORDEN TESTUDINATA

Los primeros reptiles aparecen al final de la era Paleozoica, hace aproximadamente 300 millones de años (Bellairs y Attridge 1975). Filogenéticamente, la clase reptilia da origen a las subclases Anapsida, Archosauria y Lepidosauria, surgiendo de la primera el orden Chelonia o Testudinata que origina a las tortugas (Russell 1980). Las tortugas actuales provienen de un grupo monofilético del suborden Cryptodira, es decir que se originaron a partir de un ancestro común que no dio origen a ninguna otra división de tortugas vivientes. Este suborden se caracteriza por retraer la cabeza sobre un



plano vertical adquiriendo forma de “S” entre las placas sobre el hombro (Gaffney y Meylan 1988), en la actualidad las tortugas marinas poseen poca habilidad para retraer su cabeza por lo cual han sido dotadas de una cubierta gruesa sobre el cráneo (Meylan y Meylan 2000).

La familia Cheloniidae se caracteriza por presentar las extremidades modificadas en aletas, con caparazón grande, aplanado y recubierto por escudos córneos y simétricos; alcanzan tallas corporales superiores a los 70 cm (Rueda *et al.* 2005). Esta familia está constituida por: la tortuga gogo o cabezona, de coloración rojiza en estado adulto; tortuga verde o blanca; tortuga carey, caracterizada por su color café con vetas color ambar y escudos del caparazón sobrepuestos; tortuga golfina, de color verde olivo (Figuras 1 y 2, Tabla 1); tortuga lora, la más pequeña de las tortugas marinas; y la tortuga espalda plana (Pritchard 1979), endémica de Australia.

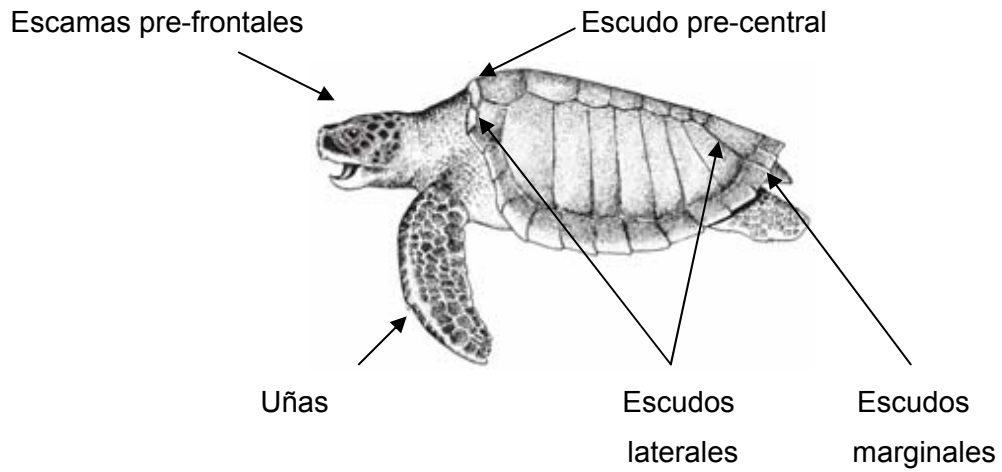


Figura 1. Vista lateral de la tortuga golfinia. (Tomado y modificado de www.seaturtle.org).

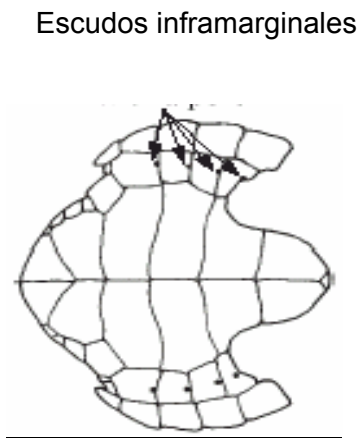


Figura 2. Vista ventral de la tortuga golfinia. Cada escudo presenta un poro (Tomado y modificado de www.seaturtle.org).



Tabla 1. Descripción general de la tortuga golfina. (Tomado y modificado de Pritchard *et al.* 2000 y Chacón *et al.* 2000).

Descripción General	
Longitud recta de carapacho (LRC)	72 cm.
Cabeza	Levemente triangular, grande, ancho alrededor de 13 cm.
Carapacho	Corto, ancho, liso, elevado y de forma ligeramente tectiforme (a manera de tienda de campaña). En estado juvenil tiene una alta proyección vertebral.
Plastrón	Presencia de un pequeño poro en cada uno de los escudos (Figura 2).
Escudos costales	Seis a ocho en estado adulto, levemente traslapados en estado inmaduro.
Escamas pre-frontales	Dos pares.
Aletas	Dos uñas en cada aleta delantera.
Peso	35 – 50 kg.
Coloración	Zona dorsal de color gris en neonatos, y verde olivo en adultos.
Identificación de rastros y nidos	
Ancho de rastro	70 – 80cm.
Tipo de rastro	Corte muy ligero, con marcas asimétricas (movimiento alterno de aletas) y oblicuas (movimiento de aletas delanteras).
Profundidad cama	Muy somera y el surco central generado al arrastrar la cola es poco visible.
Tamaño huellas	70 – 80 cm.
Tamaño nidada	105 – 120 huevos / nido.
Diámetro huevos	37– 42 mm.
Temperatura pivotal	29.13 ° C.
Tiempo incubación	46 – 65 días.
Preferencia de playa	Continental e islas de barrera en regiones tropicales, cercanas a bocas de ríos.
Ubicación playas de anidación	Pacífico oriental (Sur Baja California y México hasta Perú, incluyendo a Colombia), Atlántico del Sur (de Guyana a Brasil y en África occidental), norte del Océano Índico (Orissa, India) y Pacífico occidental (Malasia y Tailandia). En la costa Pacífica colombiana, en los Parques Nacionales Naturales de Utría, Gorgona y Sanquianga, ubicados en los departamentos de Chocó, Cauca y Nariño, respectivamente (Figura 3).
Áreas alimentación	En Colombia: Bahía Solano y alrededores del PNNG.
Dieta	Estado adulto: carnívoros consumen peces y crustáceos.



Figura 3. Áreas de reproducción y alimentación de las tortugas marinas en el Pacífico colombiano (Tomado del Centro de Investigación para el Manejo Ambiental y el Desarrollo – CIMAD 2002).



2.3 CICLO DE VIDA DE LAS TORTUGAS MARINAS

Las tortugas marinas se caracterizan por tener un ciclo de vida largo y por ser animales de crecimiento muy lento. Pasan por cinco fases de desarrollo: huevo, embrión, cría, juvenil y adulto. En cada época de anidación las hembras construyen sus nidos por encima de la línea de marea donde depositan sus huevos que en número puede alcanzar entre los 50 hasta 140 dependiendo de la especie. La temperatura de incubación debe mantenerse entre 23 – 33 °C para que haya éxito de eclosión. La temperatura pivotal debe ser cercana a los 21 °C, donde valores por encima producirá hembras y por debajo machos, sin embargo esto varía con la especie y la ubicación latitudinal (Frazier 1999; Mrosovsky *et al.* 1971, Mrosovsky 1980, Yntema *et al.* 1982, Godfrey *et al.* 1999).

Los nidos eclosionan generalmente en horas de la noche evitando que las crías sean atacadas por predadores diurnos y/o ser afectadas por altas temperaturas. Los neonatos comienzan a emerger en dirección al mar orientados por el campo magnético internándose a la zona pelágica por un período aproximado de 10 años, fase denominada como el año perdido, moviéndose entre sitios de alimentación ricos en algas y larvas de invertebrados. La tortuga golfina permanece en ambiente pelágico excepto para época anidatoria. Durante la etapa juvenil – adulto las tortugas viajan a zonas costeras y bentónicas, y al alcanzar la madurez sexual entre un periodo de 10 a 50 años migran hacia sus playas de origen a desovar en su primera temporada reproductiva, en un fenómeno conocido como filopatría. Al finalizar esta temporada las tortugas marinas regresan a sus sitios de forrajeo (Frazier 1999, Miller 1997, Shanker *et al.* 2003, Secretaria CIT 2004).

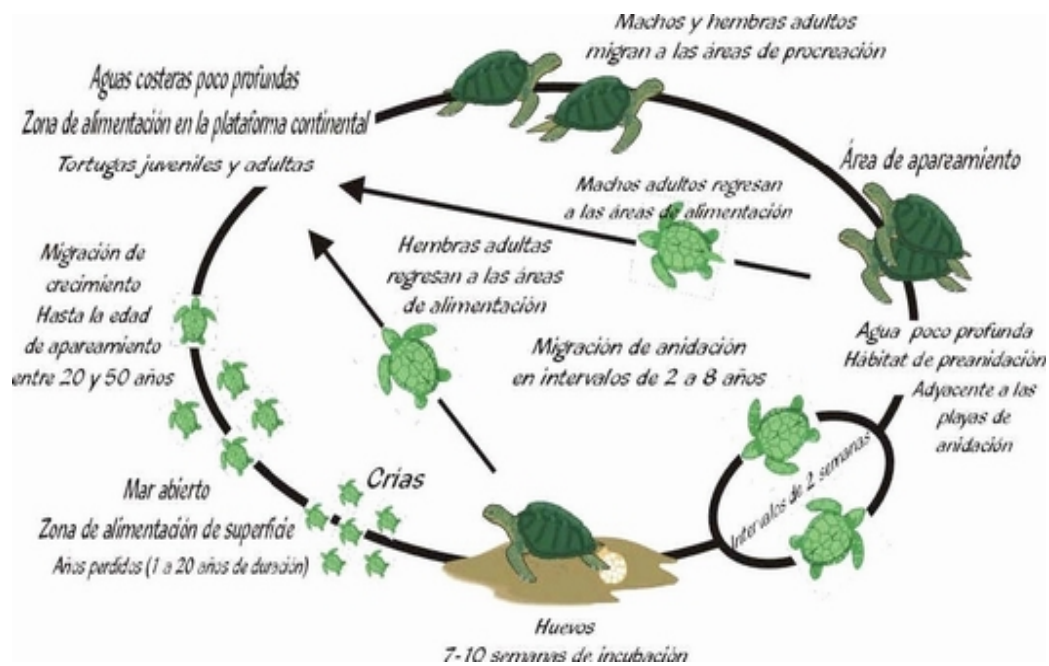


Figura 4. Ciclo de vida de las tortugas marinas (Tomado de Proyecto Karumbé, en línea:www.geocities.com).

2.4 GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN

La genética ha permitido estudiar los genes y su variación en el ambiente natural (Griffiths *et al.* 1993), y el empleo de herramientas moleculares ha permitido avanzar en algunos de los aspectos primordiales para la conservación de las especies: la caracterización de las poblaciones, el análisis de la diversidad genética intra e interpoblacional.

2.4.1 Diversidad Genética

Es requerida por las poblaciones para adaptarse a los cambios ambientales, reflejándose en la variedad de alelos y genotipos encontrados entre individuos (Frankham *et al.* 2002). Al estudiarse desde una perspectiva individual, se define



como la frecuencia relativa de los alelos, es decir las diferentes formas como se expresa un gen (locus) el cual ha sido heredado por los padres (Nason 2002). Para analizar la diversidad de la tortuga golfina, se hace referencia a: 1) Índice Haplotípico (h), estimado a partir del número de haplotipos presentes en la muestra y sus frecuencias respectivas, definiéndose como la probabilidad de que dos haplotipos de la muestra elegidos al azar sean diferentes (Nei 1987), indicando el número de estados variantes de un gen dentro del genoma mitocondrial (Hartl 1997) y 2) Índice Nucleotídico (π), el cual determina la heterocigosidad al nivel de nucleótidos a partir de las diferencias entre secuencias de haplotipos, estimando la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos escogidos al azar sean diferentes (Nei y Li 1979, Nei y Tajima 1981).

2.4.2 Marcadores Moleculares de ADN

La elección del marcador molecular depende de la información que se desee obtener, teniendo en cuenta que posee diferentes características en cuanto al tipo de herencia y dominancia, como por ejemplo si es un marcador dominante o codominante, si explora el ADN nuclear-ADNn (origen biparental), ADNmt (origen monoparental-materno) o ADN de cloroplasto (origen monoparental-paterno o materno) y en especial del costo de la técnica (Jiménez y Collada 2000). Estos marcadores no son afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones dentro de la molécula de ADN, detectar infinidad de número de polimorfismos, y analizar la información que se expresa como la que no.

Para la caracterización genética de la tortuga golfina en el PNNG se empleó la región control del ADNmt. Dado a que es un marcador genético que se caracteriza por poseer una organización de secuencia simple, de herencia maternal, con alta tasa de mutación y ausencia de recombinación, lo cual lo hace bastante interesante para trazar genealogías maternas y estudios evolutivos. Este ADN en vertebrados incluye dos genes RNAr, 22 genes de RNAt y 13 genes que



codifican para proteínas (síntesis de ATP), además de poseer una región control (*D-loop*) encargada de iniciar la replicación y la transcripción (Harrison 1989) (Figura 5).

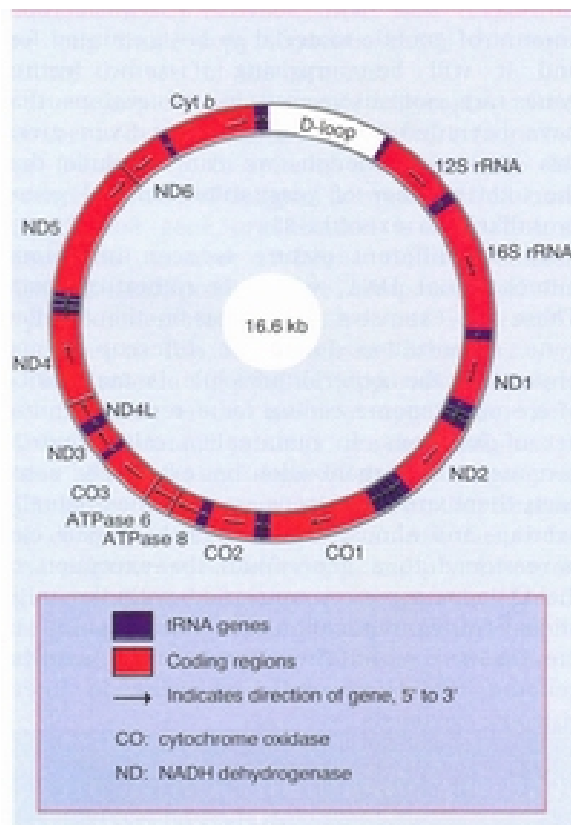


Figura 5. ADN mitocondrial. Región control (*D-loop*) señalada en color blanco (Tomado de Lewin 1997).

En los últimos años, el ADNmt se ha convertido en un instrumento de la biogeografía y áreas afines, con el cual se han logrado enlazar procesos micro y macroevolutivos entre la filogenia y la genética de poblaciones, permitiendo trazar genealogías entre poblaciones, especies y taxas (Avice 1998, Gillespie 1986).



2.5 INFERENCIA FILOGENÉTICA

En el curso de un estudio cladístico deben identificarse grupos hermanos, que son especies o taxones más altos, que hipotéticamente, son los parientes más cercanos a otro taxón dado, exclusivo de la especie ancestral de ambas taxa. Para facilitar los análisis filogenéticos debe utilizarse un “*out-group*” que es un grupo hermano del taxón estudiado, para determinar cual de los haplotipos son basales y cuales son más derivados. Uno o varios *out-groups* pueden ser examinados para llegar a esta inferencia. La más crítica comparación *out-group* incluye el grupo hermano del taxón estudiado (Wiley 1981).

Según Cailliet *et al.* (1986), el resultado final de una investigación en sistemática filogenética es un cladograma, el cual se define como un diagrama ramificado (dendrograma) en el cual las especies u otras taxas se encuentran ligadas por compartir uno o más caracteres en un único estado o condición donde se indican las novedades evolutivas. Un cladograma organiza las especies o taxa generalmente en grupos monofiléticos. La horquilla en un cladograma representa el antecesor común de dos grupos hermanos.

2.6 BIOGEOGRAFÍA

Esta disciplina estudia la distribución de los seres vivos en espacio y tiempo, describe y comprende patrones de distribución geográfica de las especies y taxones supraespecíficos. Esta se puede dividir en biogeografía ecológica e histórica, donde la primera hace referencia a la distribución de los seres vivos en función de sus adaptaciones a condiciones actuales del medio, y la segunda en función de factores históricos que no intervienen actualmente (Morrone 2001, Zunino *et al.* 2003).



Dentro de la biogeografía histórica, se encuentra la escuela de la filogeografía, la cual busca ampliar la congruencia entre evolución, demografía e historia de la distribución de taxas, y determinar la cronología de la diversificación evolutiva. Provee descripción de distribución geográfica, relaciones filogenéticas y distancias genéticas entre linajes evolutivos de animales (Lanteri *et al.* 2003), proporcionando un mejor entendimiento de la biogeografía regional y áreas de endemismo. Los estudios filogeográficos contribuyen a ampliar los estudios ecológicos y evolutivos, identificar históricamente y evolutivamente regiones independientes que sean consideradas como réplicas naturales. Los análisis filogeográficos comparados permiten estudiar los efectos de la historia y la geografía en estructura de comunidad de organismos a nivel local y regional (Bermingham y Moritz 1998).



3. ANTECEDENTES

Algunas de las investigaciones realizadas a la fecha sobre diferentes temáticas (biología, conservación, estudios moleculares, mortalidad, factores naturales y antrópicos, entre otras) se presentan a continuación, en especial los relacionados con la tortuga golfinia.

3.1 ESTADO ACTUAL DE CONSERVACIÓN DE LAS TORTUGAS MARINAS

Las tortugas marinas se encuentran distribuidas en todos los océanos del mundo, desde zonas tropicales hasta regiones polares. Las migraciones que realizan entre sitios de alimentación y sitios de reproducción, ha permitido realizar el marcaje de hembras adultas durante el arribo a las playas de anidación, estas migraciones han sido las más documentadas debido a la posibilidad de recapturar las tortugas inicialmente marcadas en las playas de anidación, ya que permanecen la mayor parte de su vida en el mar (Bjorndal 2000). Actualmente, los estudios sobre el ciclo de vida de las tortugas marinas han sido reforzados con el empleo de herramientas novedosas como la genética molecular y la telemetría satelital. De esta manera se ha podido identificar el origen de las colonias reproductivas, conocer su estructura poblacional, y registrar las rutas migratorias que realizan los individuos de las diferentes especies para ubicarlos geográficamente en los sitios de forrajeo y reproducción (Meylan y Meylan 2000, Secretaria CIT 2004).

A nivel general, durante el transcurso de su vida reproductiva las hembras depositan varias nidadas durante una misma temporada reproductiva (conocido como intervalo de reanidación), las cuales varían de acuerdo a la especie (según Alvarado *et al.* 2000, son tres nidadas cada 12 a 15 días en el caso de golfinia).



Asimismo, las hembras reproductoras regresan a desovar a la misma playa luego de dos o tres años (conocido como intervalo de re-migración).

En las últimas dos décadas, las poblaciones y/o colonias reproductivas de tortugas marinas han disminuido debido especialmente a factores de origen humano. Entre las actividades que ponen en riesgo la supervivencia y la calidad de sus hábitats de reproducción, se encuentran: la comercialización de huevos, carne, aceite y caparazones; la extracción de arena de las playas; las construcciones turísticas que alteran su hábitat y desorientan a las hembras reproductoras con su iluminación artificial (Eckert 2000); la pesca artesanal e industrial que captura incidentalmente gran número de tortugas al año en redes de arrastre, palangres pelágicos y de fondo, líneas de boyas, redes agalleras y de trampa (Oravetz 2000). A esto se suma el impacto negativo de la contaminación marina por hidrocarburos y derivados del petróleo (Frazier 1980, Gibson y Smith 2000, Witherington 2000); así como la ingestión de plástico y material no biodegradable que las ahoga cuando equivocadamente lo consumen o cuando accidentalmente enredan su cuerpo en desechos de polipropileno (Carr 1987).

Entre los casos de mortalidad más alarmantes registrados a nivel internacional, sobresale la muerte de diferentes especies de tortugas marinas que superaron los 48.000 individuos en el Golfo de México, de las cuales murieron por ahogamiento el 23% (Weber 1989).

3.2 NIVEL DE CONOCIMIENTO DE LA TORTUGA GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*) EN OTRAS REGIONES (ATLÁNTICO, PACÍFICO E ÍNDICO)

3.2.1 Atlántico

En esta región la especie ha sido reportada al norte de Miami (Florida) en aguas cercanas a Maratón en diciembre de 1999, en los alrededores de cayo Largo en septiembre de 2000 y en Islas Sunny en octubre de 2001 (Foley *et al.* 2003). En



California Central (USA) durante octubre de 2001 y noviembre de 2002 (Steiner *et al.* 2005). Al noreste de Cuba, en el Cayo Guajaba (Nuevitas) durante el mes de abril de 1997 (Moncada *et al.* 2000). En el sector del Atlántico Occidental Tropical se encontraron 72 individuos en marzo de 1975 desde Isla Margarita (al este de Venezuela) hasta el norte de Brasil, incluyendo Trinidad, Barbados, Guyana, Surinam, Guyana Francesa e Isla Devil's (Pritchard 1976). Además, se ha confirmado su anidación al norte de la costa de Trinidad (playa Madamas) en el mes de junio (Livingstone 2005) y al noreste de Brasil (playa de Patos) en el mes de abril (Lima *et al.* 2003).

Por otro lado, en Colombia se ha confirmado el sacrificio de 54 individuos de tortuga golfinia con fines comerciales en Cartagena (Medem 1983) y se ha evidenciado la desaparición paulatina de la mayoría de las colonias de golfinia que arribaban en el Archipiélago de San Andrés y los bancos de Serrana, Serranilla y Quitasueño (Córdoba y López 1997, Rodríguez *et al.* 2002).

3.2.2 Pacífico

Para esta región se han registrado eventos de anidación entre marzo y abril al sur de Tailandia (Isla de Phra Thong) (Aureggi *et al.* 1999) y entre julio y noviembre al Sur de Baja California-SBC (Cabo Pulmón) (López-Castro *et al.* 2004). También se han reportado la llegada de arribazones en mayo o junio para La Escobilla, Oaxaca (México), continuando en febrero o marzo del siguiente año (Márquez-M *et al.* 1996). Anida todo el año en El Salvador durante la estación lluviosa (Hasbún y Vásquez 1999).

3.2.3 Índico

Los reportes para esta región se presentan en Banyuwangi Sur, Java oriental (Indonesia), con pico anidatorio en el mes de julio (Suwelo 1999). En la costa de Andhra Pradesh, sur de Orissa (India) entre diciembre y abril, ya que aproximadamente 4000 nidos fueron encontrados esporádicamente entre enero y



marzo, lo cual hace pensar que este lugar pudiera estar recibiendo aportes de hembras que anidan en Orissa (Tripathy *et al.* 2003). Sin embargo, India a pesar de ser uno de los sitios con características propicias para la anidación de tortugas, registró un caso de alta mortalidad entre 1997 y 1998, donde la captura de más de 30.000 tortugas golfinia en aparejos de pesca provocó la muerte de 13.575 individuos durante su época reproductiva (Pandav y Choudhury 1999).

3.3 NIVEL DE CONOCIMIENTO DE LA TORTUGA GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*) EN EL PACIFICO COLOMBIANO

En el Pacífico colombiano se ha identificado que el mayor número de registros de anidación, corresponde con aquellas playas donde la composición es arenosa, de relieve más bien plano y pendientes con poca inclinación (Amorocho *et al.* 1992, 1998, 2001). En el departamento del Chocó ha sido reportada para el Golfo de Cúpica y en la desembocadura del río San Juan, en febrero en las playas entre Cabo Corrientes y Bahía Solano (Rueda 1992), y entre los meses de agosto a noviembre para el Playón del Valle, el Parque Nacional Natural Utría (PNNU) y las playas de La Cueva y San Pichí (Ceballos-Fonseca *et al.* 2003), siendo La Cueva un importante sitio de anidación para la especie en Sudamérica (Martínez *et al.* 2000, Hinestroza *et al.* 2001). Para esta misma época se ha registrado en el departamento de Nariño como la especie más abundante entre el Parque Nacional Natural Sanquianga (PNNS) y cerca a la frontera con el Ecuador, hasta el río Mira (Amorocho *et al.* 1992, Amorocho *et al.* 2001, Jiménez 2001, Ceballos-Fonseca *et al.* 2003). De acuerdo con McCormick (1996) en playa Palmeras (PNNG) se reporta el mayor número de ascensos entre junio y diciembre, y según Pavía *et al.* (2006) se presenta entre julio y noviembre, con pico en septiembre, registrándose aproximadamente 2500 nidos durante la temporada de 2005.



Esta especie y sus subproductos han sido tradicionalmente una fuente importante de alimento para las comunidades del litoral Pacífico colombiano, sin embargo se han registrado mortalidades de tortuga golfinia por la acción combinada de la pesca industrial del camarón, el bolicheo del atún y trancadores para tiburones en 1992 que ocasionó la muerte de aproximadamente 600 individuos (principalmente de tortuga golfinia y negra) (Rueda 1992) en el PNNU, departamento del Chocó.

3.4 LOS MARCADORES MOLECULARES Y SU APLICACIÓN EN EL CONOCIMIENTO DE LA HISTORIA NATURAL Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS TORTUGAS MARINAS

En vista de los diversos casos de reducción y mortalidad que se han dado sobre las poblaciones de tortugas marinas en el mundo, es necesario conocer más sobre su biología reproductiva, manejo, recuperación y conservación de sus poblaciones (Richardson 2000). En este sentido, las técnicas de biología molecular, han demostrado ser en los últimos años herramientas fundamentales para aclarar aspectos de la historia natural de las tortugas marinas, como por ejemplo la estructura poblacional de los linajes maternos. De esta manera ha sido posible identificar las colonias reproductivas como una prioridad para definir demográficamente las UM y detectar diferencias genéticas entre aquellas de manera que se puedan implementar medidas de manejo que aseguren la diversidad poblacional de las especies (Abreu Grobois 2000, FitzSimmons *et al.* 2000).

A continuación se presentan por género y especies algunos de los estudios realizados que han empleado el marcador de ADNmt, el cual ha servido para caracterizar las colonias reproductivas de varias especies.



En el género *Lepidochelys sp*, el marcador ha permitido elucidar sobre las particiones genéticas que han ocurrido en el linaje ancestral, el cual fue dividido por el puente de América Central, dando origen a dos especies de tortugas: lora (Atlántico) y golfina (Pacífico), encontrando el haplotipo más divergente en la región del Indo – Pacífico oeste y del cual se cree surgió la más reciente radiación de éstos linajes (Bowen *et al.* 1998).

En tortuga golfina, pese a que es una de las especies más abundantes (Abreu-Grobois 2000), actualmente son pocos los trabajos a nivel molecular. Sin embargo, en cuanto a los estudios realizados sobre caracterización genética, se ha identificado el haplotipo K en la mayor parte de la población de la India, sugiriendo que los amplios rangos de expansión y distancias de colonización indican que el ancestro de las poblaciones de golfina contemporáneas proviene del océano Índico (Shanker *et al.* 2004); posteriormente se comprobó que las tortugas golfina reconocidas morfológicamente en aguas de Florida (noroeste del Atlántico) presentaban el haplotipo F característico del Atlántico (Foley *et al.* 2003). Empleando este marcador también se ha podido demostrar que en el Pacífico este (SBC), la diversidad genética en poblaciones peninsulares de tortuga golfina es más baja con respecto a la encontrada en poblaciones continentales, reflejando una reciente historia evolutiva en ésta región (López-Castro *et al.* 2005).

En otras especies se han resuelto preguntas sobre la estructura filogeográfica entre los sitios de anidación: en tortuga cabezona se han encontrado dos linajes (Atlántico-Mediterráneo e Índico-Pacífico) posiblemente por un reciente flujo de genes interoceánicos debido a su adaptabilidad para utilizar hábitats alrededor del sureste de África (Bowen *et al.* 1994), y posteriormente, en el linaje del Atlántico-Mediterráneo se distinguieron dos linajes filogenéticos distintos para la misma especie que cumplían con la teoría del *natal homing* (que habla sobre el retorno de las tortugas a anidar cerca o a los mismos sitios donde ellas emergieron como cría), conformando agregaciones reproductivas aisladas (Encalada *et al.* 1998). En



tortuga laúd se encontraron poblaciones fuertemente subdivididas en los linajes maternos a una escala global, ya que la distribución de los haplotipos indicaban que la especie pudo haber radiado de un refugio limitado en el Índico-Pacífico durante la temprana glaciación del Pleistoceno (Dutton *et al.* 1999). En tortuga verde ha permitido revelar la divergencia existente entre las colonias del este y del oeste en el Gran Caribe (Lahanas *et al.* 1994) y comprobar su filopatría en Florida y Costa Rica al regresar a desovar a su playa natal (Allard *et al.* 1994). Y en tortuga lora se ha identificado el haplotipo D en las colonias del Atlántico de los Estados Unidos y el Golfo de México, presentando una distribución restringida debido a una posible migración transoceánica a través del estrecho de Gibraltar que la llevó al mar mediterráneo (Tomás *et al.* 2003).

Otra aplicación que tiene la identificación genética mediante el análisis del ADNmt es resolver la composición de las poblaciones de tortugas marinas en la historia de vida temprana, como en la etapa juvenil y/o adulta cuando individuos provenientes de diferentes colonias reproductivas confluyen en las áreas de alimentación o se agrupan a lo largo de las rutas migratorias. En tortuga verde esto ha sido observado en Gran Inagua – Bahamas, donde se encontró predominancia del haplotipo III en juveniles, el cual es característico de las colonias anidantes al oeste del Caribe, posiblemente debido a la influencia de las corrientes oceánicas del gran Atlántico que dispersan y distribuyen las crías de esta especie, facultando la mezcla de diferentes cohortes (Lahanas *et al.* 1998). En tortuga carey las técnicas de identificación mediante ADNmt también han sido empleadas en áreas de forrajeo ubicadas en Puerto Rico y Cuba donde se encontraron individuos pertenecientes a colonias anidantes de otras naciones, debido posiblemente a la proximidad de sus áreas de anidación, hábitats de forrajeo, condiciones oceanográficas y comportamiento migratorio propio de esta especie en el Caribe (Bass 1999).



Además de los estudios realizados con ADNmt se ha avanzado en el empleo de marcadores polimórficos como los microsátélites, los cuales emplean ADNn permitiendo observar el flujo de genes mediado por el macho y la hembra dentro de las poblaciones de tortugas marinas (Bowen *et al.* 1996). Así, entre las poblaciones anidantes de tortuga golfinia en la costa este de la India se observó una alta variabilidad genética al encontrarse seis *loci* altamente polimórficos (Ramesh 2004). También se encontró múltiple paternidad en los nidos de tortuga cabezona (de 70 nidos registrados) en *Melbourne Beach* – Florida, en donde 22 de ellos tuvieron más de un padre y seis tuvieron más de dos padres (Moore y Ball 2002).

Finalmente, al combinar estudios de análisis de secuencias de ADNmt y ADNn con microsátélites, se ha podido evidenciar la hibridización de linajes, como por ejemplo los de tortuga lora y cabezona durante la temporada de anidación de 1999 en Rancho Nuevo, México (Barber *et al.* 2003).



4. ÁREA DE ESTUDIO

La presente investigación se llevó a cabo en playa Palmeras - PNNG, departamento del Cauca, Colombia. A continuación se presenta la descripción general y características del sitio de estudio.

4.1 GENERALIDADES

El PNNG se encuentra ubicado entre los 2° 55' 45" - 3° 00' 55" N y 78° 09' - 78° 14' 30" W, cuenta con una extensión total de 616.8 Km² de los cuales 13.7 Km² corresponden a Gorgona y Gorgonilla (Figura 6). La máxima elevación es el cerro La Trinidad con una altura de 338 msnm. La pluviosidad oscila cada año entre los 4.164 y los 8.176 mL/m³, siendo alta por localizarse dentro de la zona de convergencia intertropical (Díaz *et al.* 2001). La humedad relativa es superior al 90%, y la temperatura media anual del aire es de 26° C. Los períodos climáticos de lluvia van de mayo a octubre, y de diciembre a febrero con menor precipitación (IDEAM 2000).

4.2 GEOLOGÍA

Gorgona es de origen volcánico, tectónicamente activa por su ubicación en el margen occidental de la placa de Suramérica. Estudios previos postulan tres posibles escenarios tectónicos, pero el estudio más reciente se basa en rocas volcánicas komatiitas, revelando que la isla es posiblemente un fragmento desprendido de la placa oceánica del Caribe hace aproximadamente unos 100-75 millones de años sobre el punto candente de Galápagos. Las playas y sublitorales del costado oriental presentan arenas de grano medio, de origen coralino y rocoso,



mezclada con gravas y cantos rodados. Hasta los 30 m de profundidad posee arenas de grano grueso mezclada con cascajo bioclástico y por debajo de los 40-50 m tiende a ser de naturaleza lodosa (Díaz *et al.* 2001). Posee suelos de coloración amarillo rojizo, arcillosos, pesados, poco permeables, ácidos, mal aireados, con niveles freáticos superficiales y muy susceptibles a la erosión (UAESPNN, en línea: www.parquesnacionales.gov.co).

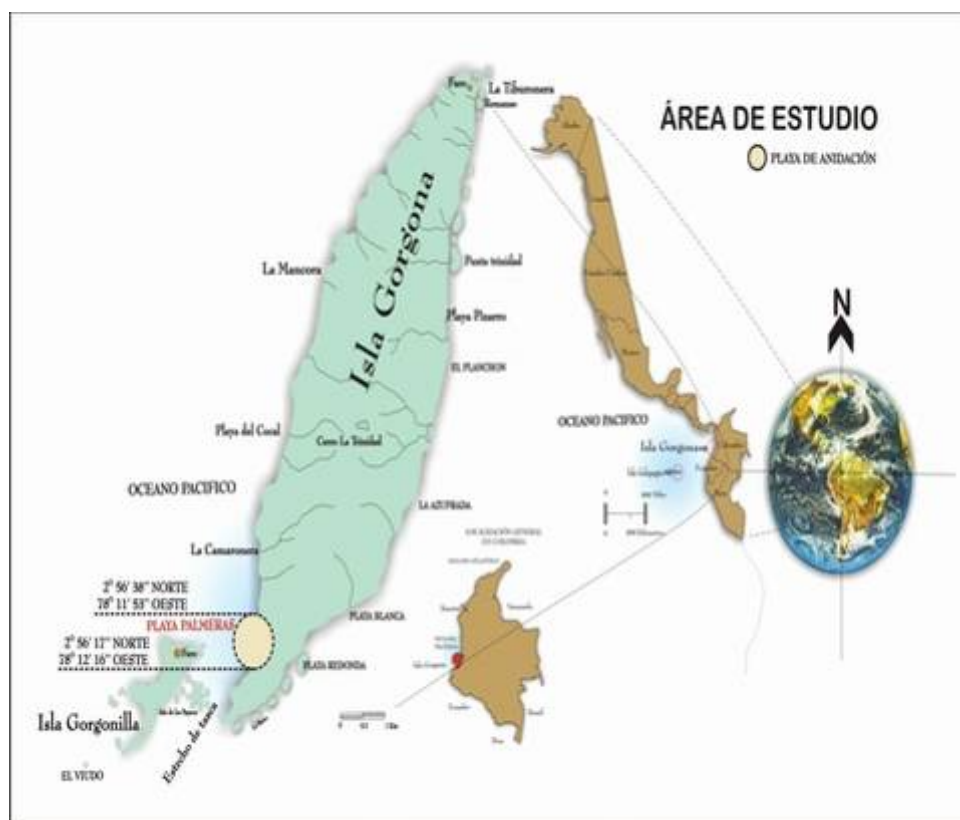


Figura 6. Mapa del área de estudio. PNNG. (Tomado del Centro de Investigación para el Manejo Ambiental y el desarrollo - CIMAD 2004).



4.3 OCEANOGRAFÍA Y RÉGIMEN HIDROGRÁFICO

Las mareas en el Pacífico llegan a tener una amplitud máxima de 5 m y una mínima de 0.6 m según reportes del IDEAM en el 2000. La velocidad de corriente es de 14.2 m/min tanto en superficie como en profundidad. La temperatura promedio mensual del agua en superficie está entre 26° C (al final del año) y 28° C (mayo – junio). La salinidad promedio mensual del agua en superficie en torno a las islas está entre 28 y 32. La transparencia del agua se ubica entre 6 y 12 m, con un promedio de 8 m durante todo el año (Díaz *et al.* 2001).

4.4 PLAYA PALMERAS

Ubicada en el extremo suroccidental de la isla Gorgona, a 4 km del Poblado, con coordenadas geográficas de 2°56'23.3"N y 78°12'31.8"W. Presenta una extensión total de 1.15 km (Figura 6), con una amplitud de 50 m, 13.9 m y 3.9 m de zonas baja, media y alta. En el sector sur de la playa se concentran rocas aisladas que dificultan el acceso a la playa, prefiriendo las tortugas desovar en el sector norte. Playa Palmeras no presenta problemas de intervención antrópica (Ceballos-Fonseca *et al.* 2003), aunque sucesos más recientes en 2005 y 2006 reportan un número considerable de individuos muertos o afectados por actividades de origen humano (Pavía *et al.* 2005).



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 FASE DE MUESTREO

De la temporada reproductiva llevada a cabo durante los meses de octubre a noviembre de 2004 en playa Palmeras (PNNG) se obtuvieron ocho muestras y de la temporada de septiembre a diciembre de 2005 se colectaron 21, para un total de 29 (Tabla 2). Para esta fase se contó con el apoyo técnico de investigadores y voluntarios del CIMAD.

Tabla 2. Listado de muestras de tejido empleadas para la obtención de ADN. RTG: Reproducción Tejido Gorgona y RSG: Reproducción Sangre Gorgona.

MUESTRAS	ORIGEN MUESTRA TEJIDO	
	HEMBRA REPRODUCTORA	NEONATO
RSG1		X
RSG2	X	
RSG3		X
RSG4		X
RSG5		X
RTG 1		X
RTG 6	X	
RTG 7	X	
RTG 8	X	
RTG 9	X	
RTG 10	X	
RTG 11	X	
RTG 12	X	
RTG 13	X	
RTG 14	X	
RTG 15		X
NIDO2		X
NIDO3		X
NIDO6		X
NIDO8		X
NIDO10		X
NEO2		X
NEO3		X
NEO4		X
NEO14		X
NEO15		X
EXHUMACIÓN	X	



La playa fue dividida en seis sectores, cada uno de 200 m aproximadamente, a lo largo de los cuales se realizaron patrullajes diurnos y nocturnos durante la quiebra (marea baja) o dos horas después de empezar a bajar durante la puja (alta). Durante estos recorridos, se registró el ascenso de hembras anidantes, se contabilizaron el número de huellas observadas y se relocizaron nidos en peligro, los cuales fueron monitoreados hasta la eclosión de los neonatos.

Al interceptar una hembra en proceso de anidación, se esperaba a que la tortuga empezara a desovar para tomar las medidas morfométricas (Tabla 3). Este momento era aprovechado además para colectar muestras de sangre del sinus cervical y/o tejido dérmico a unos 3mm del hombro del animal. Estas muestras fueron almacenadas en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL con buffer de colecta que contenía una solución de 0.1M Tris, 0.1M EDTA, 0.01M NaCl y 0.5% SDS (AMCC, en línea: <http://research.amnh.org/amcc/labfacilities6.html>) proporcionado por el laboratorio de Biología Molecular y Colección de Tejidos del IAvH para la posterior caracterización genética de la especie. Antes de empezar a tapar el nido la hembra era marcada en la segunda escama de cada una de sus aletas delanteras con placas metálicas tipo Monel 861s, cuidando de dejar un espacio adecuado entre la escama y la placa, para no afectar el crecimiento y funcionamiento normal de las extremidades anteriores del animal.

Posteriormente en cada nido se tomaron distancias entre nido - línea de marea, nido - línea de vegetación, y el diámetro de la huella interna y externa de la tortuga anidante. Se reubicaron nidos que presentaban problemas por inundación, conservando el mismo diámetro y profundidad del nido original. Los huevos fueron transportados en un balde con arena del nido original (Figura 7) y de cada nido se tomaron 10 huevos al azar, los cuales fueron medidos y pesados (Figura 8). Cuando se encontraron nidos destapados por la marea y/o depredados en la playa (Figura 9), se procedió a realizar su respectiva exhumación, además de tomar



medidas morfométricas de los huevos (Tabla 4), para luego ser tapados con arena en el mismo sitio (Pavía *et al.* 2006).

Tabla 3. Formato de campo empleado durante los patrullajes nocturnos en playa Palmeras, PNNG.

Ficha patrullaje nocturno				
Fecha:		Hora:		
Tiempo: seco	Viento: calmado	Oleaje: calmado		
nublado	moderado	moderado		
lluvia	fuerte	fuerte		
Medidas				
1. LCC	Longitud curva -caparazón			
2. ACC	Ancho curva caparazón			
3. LC	Longitud cabeza			
4. AC	Ancho cabeza			
5. LRC	Longitud recto caparazón			
6. ARC	Ancho recto caparazón			
7. LP	Longitud plastrón			
8. AP	Ancho plastrón			
9. H	Altura			
10. LPC	Longitud plastrón-cloaca			
11. LCCo	Longitud cloaca-cola			
12. LcoCa	Longitud cola-caparazón			
13. Peso		Diagrama huellas		
14. T. cloacal		Línea vegetación		
15. Marca				
16. Huella interna			Playa	
17. Huella externa			Mar	
Muestras tejido:		Sanguíneo	<input type="checkbox"/>	Muscular <input type="checkbox"/>
Nido #		Huevos		
1. Distancia línea marea		#	Diámetro (mm)	Peso (g)
2. Distancia línea vegetación		1		
3. Diámetro nido		2		
4. Profundidad nido (Z)		3		
Observaciones:				



a). Ubicación del nido y extracción de arena.



b). Ubicación de los huevos.



c). Transporte de huevos al nuevo nido con arena del nido original.



d). Construcción del nuevo nido con las medidas iniciales del nido original.



e). Cerca y rotulación del nido para protección.

Figura 7. Pasos para la reubicación de huevos de tortuga golfinia a un nuevo nido construido replicando las condiciones originales.



Figura 8. Medición y pesaje de huevos de tortuga golfinia escogidos al azar.



Figura 9. Huevos de tortuga golfinia depredados en la playa por cangrejos ermitaños (*Coenobita* sp.).



Tabla 4. Formato de campo empleado durante la exhumación de nidos en los patrullajes en playa Palmeras, PNNG.

Ficha de exhumación de nidos				
Fecha:		Hora:		
Nido No.		No. Huevos	No. neonatos	
Total huevos sembrados:		Continuar línea divisoria		
1. Profundidad				
2. Cascarones vacíos				
3. Huevos sin embrión				
4. Huevos con embrión				
5. Huevos perforados				
6. Huevos infértiles				
7. Huevos descompuestos				
8. Neonatos vivos				
9. Neonatos muertos				
10. Neonatos deformes				
Registro morfométrico de neonatos				
Fecha:		Hora:		
Muestras de tejido: Sanguíneo <input type="checkbox"/> Muscular <input type="checkbox"/>				
Nido #		Huevos		
1. Distancia línea marea		#	Diámetro (mm)	Peso (g)
2. Distancia línea vegetación		1		
3. Diámetro nido		2		
4. Profundidad nido (Z)		3		
Observaciones:				

5.2 FASE DE LABORATORIO

Para realizar la caracterización genética de la especie en estudio, fueron empleadas un total de 29 muestras de tejido, discriminadas de la siguiente manera: 1) cinco muestras de tejido sanguíneo y 2) 24 muestras de tejido muscular. Actualmente las muestras de tejido y ADN de golfinia se encuentran preservadas en nitrógeno líquido en la Colección de Tejidos del IAvH.



Para la extracción de ADN, la amplificación de PCR y la secuenciación de la región control (*D-loop*) del ADNmt, inicialmente fue aislado el ADN genómico empleando el protocolo de Fitzsimmons *et al.* (1996) (Tabla 5) y el Kit *Qiagen* para obtener ADN de tejido sanguíneo y muscular, respectivamente. Después de la extracción, se realizó la amplificación de la región control (*D-loop*) mediante un proceso cíclico llamado Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) el cual permitió fabricar miles de copias de fragmentos de ADN en cortos períodos de tiempo (Mullis *et al.* 1987), basándose en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos empleados como cebadores encargados de delimitar la secuencia de ADN de doble cadena (Ferreira *et al.* 1998), el protocolo a seguir (Tabla 6) empleó los cebadores LTCM2-HDCM2 (Lahanas *et al.* 1994) y FDL01-RDL01 diseñados durante la fase de laboratorio, empleando el programa *Primer 3* (Rozen *et al.* 2000). Los productos de PCR fueron purificados con Polietilenglicol (PEG 8000 y NaCl) al 20%, con lo cual se retiraron restos de nucleótidos, cebadores, dNTPs y enzima empleadas durante la amplificación, evitando la interferencia de éstos durante la secuenciación. La secuenciación de estos productos fue realizada en un Multi – Color Capillary Electrophoresis (ABI 310 - 3100) en ambas direcciones usando los cebadores LTCM2 - HDCM2 (Lahanas *et al.* 1994) amplificando 526 nucleótidos (n=8) y FDL01 - RDL01 amplificando 291 pares de bases (n=21).



Tabla 5. Protocolo de extracción de ADN (Fitzsimmons *et al.* 1996) y evaluación de la calidad del ADN de tejido animal.

Nº	Procedimiento
1	Pesar 0.025 g o medir 100 µL según el tipo de tejido respectivamente, y llevar a un tubo eppendorf de 1.5 mL, adicionar 300 µL de buffer de lisis (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, 1% SDS del total de ml a preparar, debe adicionarse al final).
2	Dejar en hielo por 30 minutos las muestras con el buffer.
3	Agregar 10 µL de proteinasa K (10mg/mL) e incubar durante toda la noche (55-60° C).
4	Adicionar 150 µL de acetato de amonio (NH ₄) 7.5M y mezclar invirtiendo los tubos.
5	Congelar a – 80° C por 20 minutos y centrifugar a 13.000 rpm por 10-20 minutos (se formará un precipitado de proteínas en el fondo del tubo).
6	Retirar el sobrenadante en un nuevo tubo de centrifuga (en ocasiones es difícil retirarlo por emplear demasiada sangre).
7	Adicionar 2 ml de etanol al 100% frío por volumen de sobrenadante (se sugiere 1 mL). Invertir el tubo para ayudar a precipitar el ADN.
8	Congelar a -80° C por 20 minutos, centrifugar por 20 minutos a 13.000 rpm y remover cuidadosamente el etanol dejando el pellet de ADN en el tubo.
9	Adicionar 600 µL de etanol al 70% y homogenizar la muestra (invirtiendo el tubo varias veces, limpiando así el pellet de ADN).
10	Centrifugar a 13.000 r.p.m. por 10 minutos y remover el etanol dejando el pellet de ADN en el tubo. Para eliminar las últimas cantidades de etanol, centrifugar por 5 minutos a 13.000 r.p.m. usando una pipeta limpia para remover el etanol.
11	Dejar secar la muestra a temperatura ambiente hasta que el etanol se evapore, posteriormente adicionar de 50-100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, proporción 1:10) para resuspender el ADN.
Evaluación del ADN	
Mezclar 2 µL de producto con 2 µL de solución tampón de carga (glicerol 30% y azul de bromofenol 0.05% p/v), colocar la mezcla en un gel de agarosa al 0.8%, TBE 10X y 500 ug/uL de bromuro de etidio. Correr el gel en cámara de electroforesis con TBE 0.5X a 100V, hasta que la línea azul de bromofenol del tampón de carga migre aproximadamente 2 cm. Luego colocar el gel bajo fluorescencia de luz ultravioleta y verificar la calidad del ADN mediante la presencia de una banda única y sin barrido entre el rango de peso de la región en estudio.	



Tabla 6. Protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Pasos	Procedimiento
1. Cóctel de PCR	Las concentraciones a utilizar de cada reactivo para una reacción de 25uL son: 10X de solución tampón 10X (200mM Tris-HCl, pH 8.4 y 500mM KCl), 25mM de MgCl ₂ , 5mM de dNPT's, 10uM de cada CEBADOR LTCM2, HDCM2 (Lahanas <i>et al.</i> 1994) y FDL01 y RDL01, 50 ng/uL de ADN y de 3-4 U/uL de Taq polimerasa.
2. Perfil de PCR	Desnaturalización inicial de 2min a 94°C, seguido por 35 ciclos de: 94°C por 20seg, 53°C por 30seg, 72°C por 30 seg y 72°C por 2min de extensión final (Saiki <i>et al.</i> 1998), empleando un MJ Research PTC – 100™ Programmable Thermal Controller.
3. Evaluación del Producto de PCR	Mezclar 2 µL de producto con 2 µL de solución tampón de carga (glicerol 30% y azul de bromofenol 0.05% w/v), colocar la mezcla en un gel de agarosa al 1%, TBE 10X y 500 ug/uL de bromuro de etidio. Correr el gel en cámara de electroforesis con TBE 0.5X a 100V, hasta que la línea azul de bromofenol del tampón de carga migre aproximadamente 2 cm. Luego colocar el gel bajo fluorescencia de luz ultravioleta y verificar la amplificación de la región mediante la presencia de una banda única y entre el rango de pares de bases que tiene dicha región.
4 Secuenciación del ADN	Los productos de PCR fueron secuenciados en un Multi - Color Capillary Electrophoresis (ABI 310 - 3100).

5.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las secuencias fueron editadas y ensambladas en el programa SEQUENCHER versión 4.1 y posteriormente fueron alineadas en CLUSTAL W versión 1.74 (Thompson *et al.* 1997). Cada cambio de nucleótido encontrado en las secuencias de los individuos fue considerado como un haplotipo diferente.

Para hallar la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) se empleó ARLEQUIN versión 2.0 (Schneider *et al.* 2000). También se evaluó el modelo evolutivo al cual se acomodaban las secuencias mediante MODELTEST versión 3.7 para Macintosh (Posada y Crandall 1998). Para describir los haplotipos encontrados en Gorgona se compararon las secuencias obtenidas versus 14 reportadas en la base de datos del *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information, USA: NCBI Home page* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para el mismo *locus* en diferentes zonas geográficas del Pacífico, Atlántico e Indico, debido al bajo número de



individuos obtenidos de la población de esta tortuga en Gorgona, y por ende, de haplotipos (Tabla 7). Cabe resaltar que inicialmente se realizaron diferentes ensayos con aproximadamente 25 secuencias registradas en la base de datos, de las cuales se decidió trabajar solo con 14 de ellas, debido a que la mayoría contenían la misma información pero con nombre diferente.

Para verificar las relaciones entre los haplotipos de Gorgona con los del resto del mundo para la tortuga golfina, se incluyeron también 10 secuencias pertenecientes a la clase Reptilia (9 de otras especies de tortugas marinas y una de cascabel - *Crotalus mitchelli*), como parte del grupo externo para garantizar un mejor agrupamiento entre los haplotipos, empleando dos métodos de análisis: 1) *Neighbor-Joining* (NJ) de PHYLIP versión 3.6 (Felsenstein 1985) basado en una matriz de distancia (Saitou y Nei 1987) soportada en 100 réplicas con una tasa de transición / transversión de 2.0, un gamma de 0.5, y empleando la regla de la mayoría extendida (MRe) para el análisis de múltiples datos aleatorios para registrar los posibles cambios ocurridos entre ellos; y 2) Máxima Parsimonia (MP) con MEGA versión 3.1 (Kumar *et al.* 2004) empleando 10 réplicas que relaciona caracteres para encontrar el árbol con el menor número de cambios que explique los datos obtenidos. En ambos casos el soporte estadístico de los nodos fue con un *bootstrap* de 500 réplicas y las topologías finales fueron visualizadas utilizando el software *TreeView* 1.6.6 (Page 1996). El número de acceso, origen y haplotipo a nivel mundial de estas secuencias se presentan en la Tabla 7, además del código para identificar las Unidades Taxonómicas Operativas – OTUs (unidad de clasificación, sin importar entidad biológica) en cada uno de los árboles concenso.



Tabla 7. Descripción de las secuencias empleadas del *GenBank*. La columna No. 1 (CÓDIGO/HAPLOTIPO) describe el código de identificación en los árboles de *Neighbor-Joining* y *Máxima Parsimonia*, así como el nombre del haplotipo designado según la base de datos utilizada. Los haplotipos presentes en la colonia del PNING han sido señalados con un triángulo.

CÓDIGO / HAPLOTIPO	ESPECIE	UBICACIÓN GEOGRÁFICA	ACCESIÓN GENBANK	AUTOR
M	<i>Lepidochelys olivacea</i>	Sur Baja California	AY920520	López-Castro <i>et al.</i> 2005.
N		Sur Baja California	AY920521	
K		Sur Baja California	AY920519	
NCR		Nancite Costa Rica	U40661	Dutton <i>et al.</i> 1996
K(PGC)▲		Palmeras Gorgona Colombia		
O		Sur Baja California	AY920523	López-Castro <i>et al.</i> 2005.
E(SBC)		Sur Baja California	AY920522	
E(PGC) ▲		Palmeras Gorgona Colombia		
J		Este India: Gahirmatha	AF513541	Shanker <i>et al.</i> 2004
New 4		Este India: Gahirmatha	AF513545	
New 5		Este India: Gahirmatha	AF513546	
New 1		Este India: Madras - Gahirmatha	AF513542	
New 2		Este India: Madras	AF513547	
New 3		Este India: Rushikulya	AF513543	
K *		Sri. Lanka (India)	AF051775	Bowen <i>et al.</i> 1997
F		Atlántico	AF051773	



GRUPO EXTERNO	UBICACIÓN GEOGRÁFICA	ACCESIÓN GENBANK	AUTOR
<i>Lepidochelys kempii</i>	Estados Unidos, Atlántico y Golfo de México	AF051777 AF374401 AF374403 U40657	Bowen <i>et al.</i> 1997 Barber <i>et al.</i> (en prensa) Barber <i>et al.</i> (en prensa) Dutton <i>et al.</i> (en prensa)
<i>Chelonia mydas</i>	Atlántico y Mediterráneo	Z50139	Encalada <i>et al.</i> 1996
<i>Natator depressus</i>	Atlántico y Pacífico	U40662	Dutton <i>et al.</i> 1996
<i>Caretta caretta</i>	Mediterráneo	AY742913	Carreras <i>et al.</i> 2006
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Israel (Mar Rojo)	AJ421797	Daya, A. y M. ILan (en prensa)
<i>Dermochelys coriacea</i>	Guyana francesa	U40663	Dutton <i>et al.</i> 1996
<i>Crotalus mitchelli</i>	?	AY016051	Ashton, K.G. y de Queiroz, A. 2001.



6. RESULTADOS

6.1 ABUNDANCIA RELATIVA DE NIDOS Y HUEVOS DE LA COLONIA REPRODUCTIVA

En las salidas de campo de 2005 en las cuales se tomaron parte de las muestras para este estudio, se reportaron 19 nidos en playa Palmeras, de los cuales 16 fueron reubicados durante las tres primeras horas después de la ovoposición evitando causar daño en el desarrollo normal del embrión, ya que se encontraban más propensos a ser inundados o arrastrados durante la marea alta. En 18 nidos se encontraron 1753 huevos (no se obtuvieron huevos del nido 19), y de siete exhumaciones realizadas se contabilizaron 678 huevos. Al finalizar la temporada un total de 2431 huevos se contabilizaron en 25 nidos (18 nidos más las siete exhumaciones).

6.2 EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE PCR

El ADN obtenido a partir de tejido muscular y sanguíneo fue de buena calidad (Figura 10). De las 29 muestras amplificadas ocho se obtuvieron empleando cebadores específicos para tortugas: LTCM2 y HDCM2 (Lahanas *et al.* 1994) entre un rango de 500 a 600 pares de bases. Las 21 restantes fueron amplificadas a partir de nuevos cebadores, FDL01 y RDL01, entre 300 a 400 pares de bases, diseñados a partir de las secuencias anteriores (Figura 11), los cuales permitieron mejorar significativamente la calidad del amplificado, lo cual no se logró con los cebadores iniciales.

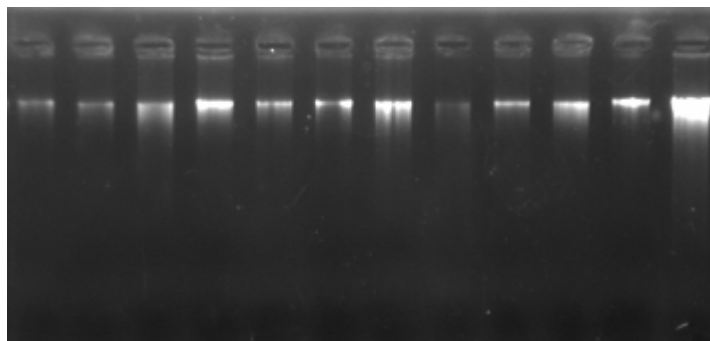


Figura 10. Visualización de extracción de ADN de tortuga golfina con Kit Qiagen.

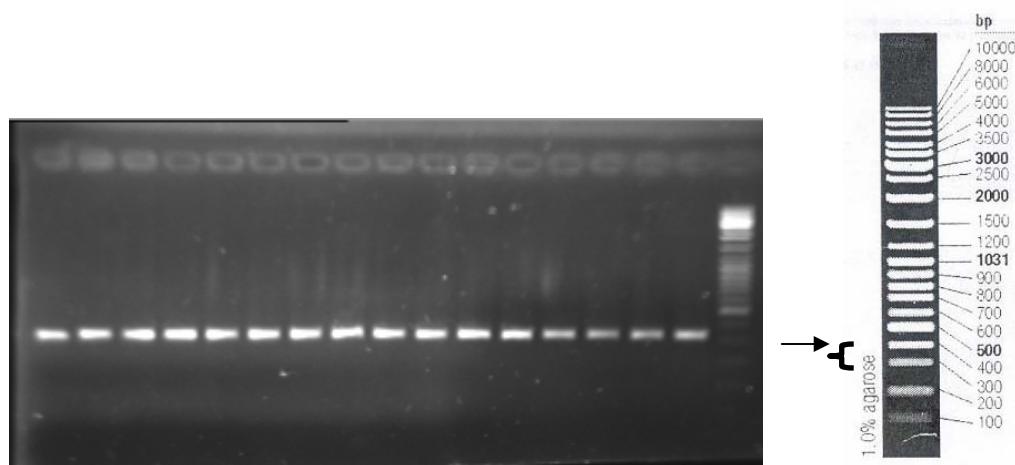


Figura 11. Amplificación de la región control (*D-loop*) entre una longitud de 300 – 400 pares de bases, empleando cebadores FDL01 y RDL01.

6.3 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL (*D-loop*) DEL ADNmt

Las secuencias de nucleótidos obtenidas presentaron picos definidos, y después de ser editadas y alineadas tuvieron una longitud aproximada de 526 pares de bases con los cebadores LTCM2 y HDCM2, y de 291 pares de bases con FDL01 y RDL01 (Figura 12).

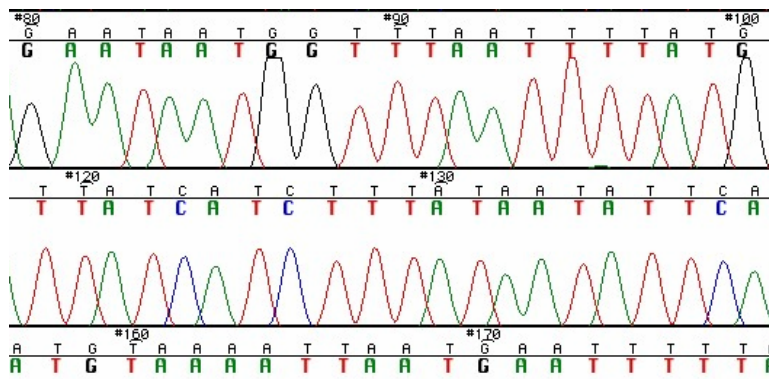


Figura 12. Ejemplo de un cromatograma de una muestra de tortuga golfinia empleando el cebador FDL01.

6.4 DIVERSIDAD GENÉTICA BASADA EN UN SEGMENTO DE LA REGIÓN CONTROL (*D-loop*) DE LA MITOCONDRIA

De las 29 muestras secuenciadas en el presente estudio, se identificaron dos haplotipos en la población del PNNG (Tabla 8) en 291 nucleótidos analizados de la región control, longitud en la cual todas las secuencias se alinearon. Estos haplotipos son similares a los previamente reportados para el Sur de Baja California (SBC) - México por López-Castro *et al.* (2005). El haplotipo K fue el más abundante presentándose en 28 individuos con una frecuencia haplotípica de 0.966; y el haplotipo E se encontró en un solo individuo, el cual difiere del anterior por presentar un sitio polimórfico en la posición 193 de C a T (transversión) con una frecuencia de 0.0345. Los dos haplotipos corresponden a los números de acceso del *Genbank*: AY920519 y AY920522, respectivamente. Asimismo, la diversidad nucleotídica fue de 0.000237 ± 0.0000552 y la composición de nucleótidos en la población de Gorgona fue de: C = 15.11%, T = 35.06%, A = 38.49% y G = 11.34% para un total del 100%.



El porcentaje de homologías, es decir, los sitios que no presentaron cambios sobre el total de nucleótidos comparados correspondió al 99%, y el porcentaje de sitios polimórficos, entendiéndose como el número de sitios informativos en las secuencias sobre el total de nucleótidos comparados, fue de 0.34%.

Por otra parte, con el fin de verificar si no se estaba perdiendo información (presencia de otros sitios polimórficos) en el fragmento que no entró en el alineamiento de 291 nucleótidos analizados, se realizó un segundo alineamiento (con secuencias de 526 pb) encontrando un segundo sitio polimórfico en la posición 457 (transición: A a G) que corrobora la descripción del haplotipo E (Tabla 9). Al comparar las posiciones de los sitios polimórficos entre los alineamientos realizados se presenta un cambio de posición del sitio identificado de C a T (transversión) (original: posición 193; adicional: posición 277), debido posiblemente al número de nucleótidos (291 pb y 526 pb) y de secuencias alineadas (21 y 8), respectivamente.



Tabla 8. Secuencias de haplotipos encontrados en la colonia reproductiva de playa Palmeras – PNNG, al alinear 291 pares de bases de la región control del ADNmt. Las homologías son señaladas con un asterisco y el sitio polimórfico de color rojo.

```

      10          20          30          40          50          60
K CAGAACAATAGCCATACTATCTATCTATGTATTATTGTACATCTACTTATTTACCGTTAG
E CAGAACAATAGCCATACTATCTATCTATGTATTATTGTACATCTACTTATTTACCGTTAG
*****

      70          80          90          100         110         120
K CATATGATCAGTAATATTGTCGATTAATTTGGCTTTAAACATAAAAATTCATTAATTTTA
E CATATGATCAGTAATATTGTCGATTAATTTGGCTTTAAACATAAAAATTCATTAATTTTA
*****

     130         140         150         160         170         180
K CATAAACTGTTTTTACCAAATGAATATTATAAAGATGATAATAGTGAAATGATATAGGAC
E CATAAACTGTTTTTACCAAATGAATATTATAAAGATGATAATAGTGAAATGATATAGGAC
*****

     190         200         210         220         230         240
K ATAAAATTA AACATTATTCTCGACCATGAATATCGTCCACAGTAATTGGTTATTTCTTAG
E ATAAAATTA AACATTATTCTCGACCATGAATATCGTCCACAGTAATTGGTTATTTCTTAG
*****

     250         260         270         280         290
K TTCAACTCATCACGAGAAATAAGCAATCCTTGTTAACAAGATACAACATTA
E TTCAACTCATCACGAGAAATAAGCAATCCTTGTTAACAAGATACAACATTA
*****
```




Tabla 9. Secuencias de haplotipos encontrados en la colonia reproductiva de playa Palmeras – PNNG, al alinear aproximadamente 527 pares de bases de la región control del ADNmt en el cual se registran los dos sitios polimórficos del haplotipo E. Las homologías son señaladas con un asterisco y los sitios polimórficos de color rojo.

	10	20	30	40	50	60
K	AAAACCGGAATCCTATAATTAACCTACCCTTTGGCGCAAAAAGCGCCAACGTATAAACTT					
E	-----GGAATCCTATAATTAACCTACCCTTTGGCGCAAAAAGCGCCAACGTATAAACTT					

	70	80	90	100	110	120
K	ACCTTAATTCTCTGCCGTGCACAACAGAACAATAGCCATACTATCTATCTATGTATTATT					
E	ACCTTAATTCTCTGCCGTGCACAACAGAACAATAGCCATACTATCTATCTATGTATTATT					

	130	140	150	160	170	180
K	GTACATCTACTTATTTACCGTTAGCATATGATCAGTAATATTGTCGATTAATTTGGCTTT					
E	GTACATCTACTTATTTACCGTTAGCATATGATCAGTAATATTGTCGATTAATTTGGCTTT					

	190	200	210	220	230	240
K	AAACATAAAAATTCATTAATTTTACATAAACTGTTTTTACCAAATGAATATTATAAAGAT					
E	AAACATAAAAATTCATTAATTTTACATAAACTGTTTTTACCAAATGAATATTATAAAGAT					

	250	260	270	280	290	300
K	GATAATAGTGAAATGATATAGGACATAAAATTAACCATTATTCTCGACCATGAATATCG					
E	GATAATAGTGAAATGATATAGGACATAAAATTAACATTATTCTCGACCATGAATATCG					

	310	320	330	340	350	360
K	TCACAGTAATTGGTTATTTCTTAGTTCAACTCATCACGAGAAATAAGCAATCCTTGTTAA					
E	TCACAGTAATTGGTTATTTCTTAGTTCAACTCATCACGAGAAATAAGCAATCCTTGTTAA					

	370	380	390	400	410	420
K	CAAGATACAACATTACCAGTTTCAGGCCATTAACTACGACGTACATAACTGATCTATT					
E	CAAGATACAACATTACCAGTTTCAGGCCATTAACTACGACGTACATAACTGATCTATT					

	430	440	450	460	470	480
K	CTGGCCTCTGGTTGTTTTTTCAGGCACATTAAGGTAATGAAGTTCATTGTTCCCTCTTTA					
E	CTGGCCTCTGGTTGTTTTTTCAGGCACATTAAGGTAATGAAGTTCATTGTTCCCTCTTTA					

	490	500	510	520		
K	AAAGGCCTTTGGTTGCACGATAAATGAGTTCTATACATTGAATTTA					
E	AAAGGCCTTTGGTTGCACGATAAATGAGTTCTATACATTGAATTTA					



6.5 ANÁLISIS DE UN SEGMENTO DE LA REGIÓN CONTROL (*D-loop*) A PARTIR DE INFERENCIA FILOGENÉTICA

Al alinear las 26 secuencias empleadas (correspondientes a las especies emparentadas: golfinia y lora; y al *outgroup* conformado por: tortuga cabezona, carey, laúd, verde, espalda plana y la serpiente cascabel) se encontraron 80 sitios conservados sobre un total de 299 nucleótidos analizados, equivalente al 26% de homologías presentadas, y 215 sitios variables sobre la misma cantidad de nucleótidos, indicando un 71% de sitios polimórficos. Al analizar los árboles consenso obtenidos a partir de los métodos de *Neighbor-Joining* (NJ) con una distancia de 10 (substituciones/cambio/año), y Máxima Parsimonia (MP) bajo el modelo evolutivo HKY+G, el cual considera diferencias en las frecuencias de transversiones y transiciones, y variación de las frecuencias en las bases (Hasegawa *et al.* 1985), se presentaron cuatro *clades* claramente diferenciados de acuerdo a la especie y distribución geográfica (Figura 13 y 14).

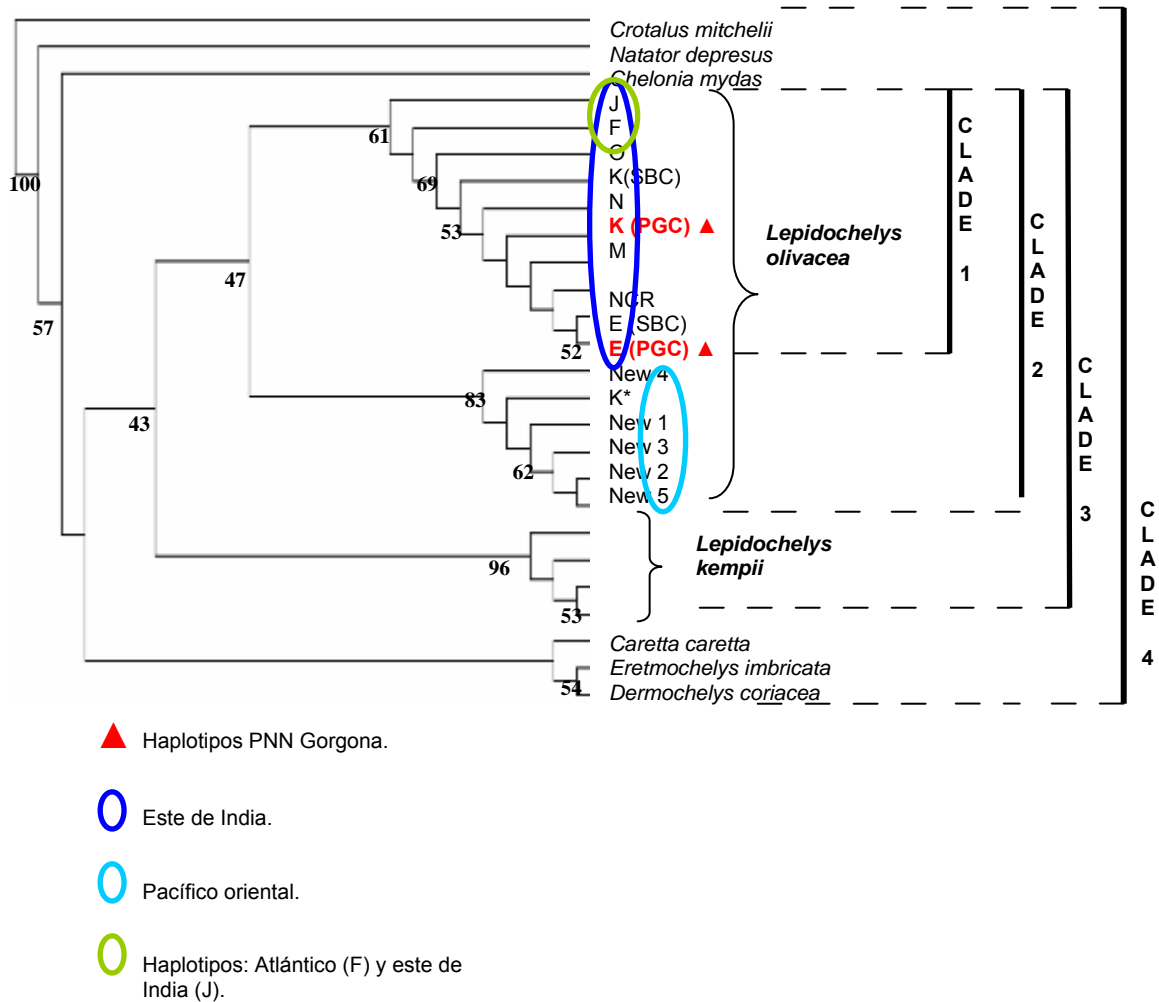
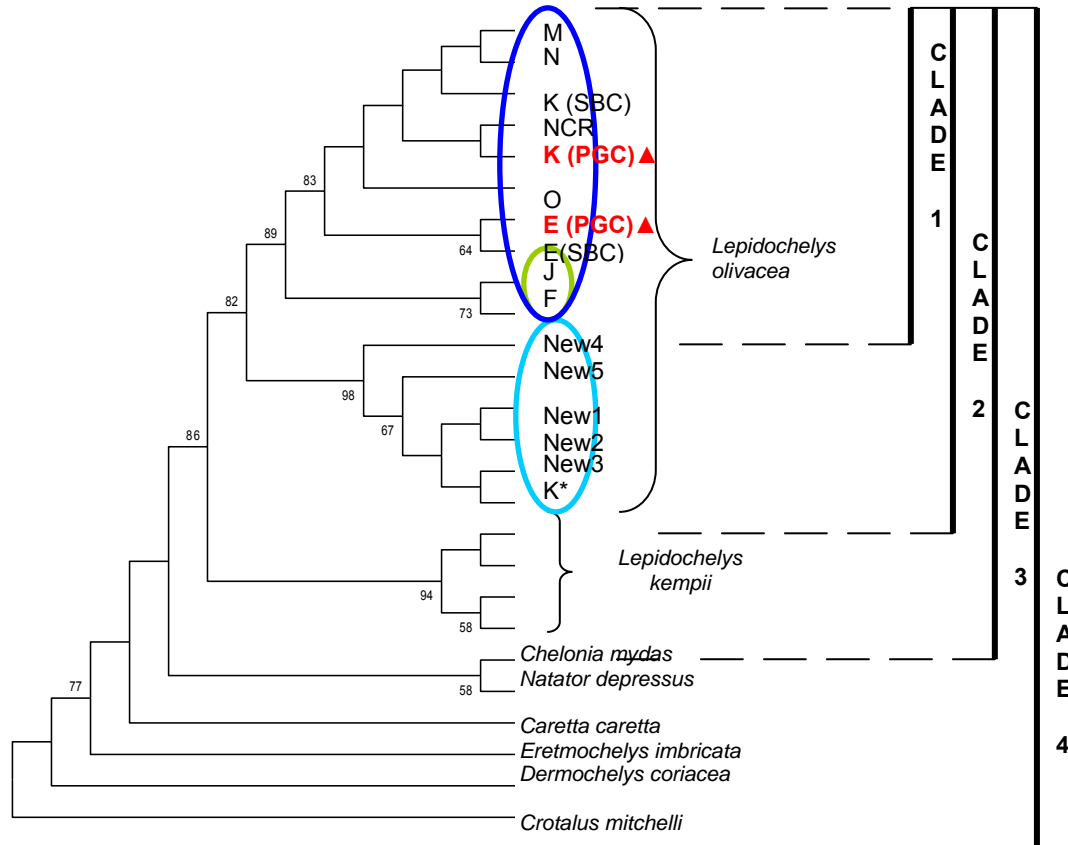


Figura 13. Árbol consenso obtenido bajo el método de distancia - *Neighbor Joining*. Sobre cada rama se muestra el valor del soporte *bootstrap*, y en la mayoría de los casos se incluyeron los soportes mayores al 50%.



- ▲ Haplotipos PNN Gorgona.
- Este de India.
- Pacífico oriental.
- Haplotipos: Atlántico (F) y este de India (J).

Figura 14. Árbol consenso obtenido bajo el método de Máxima Parsimonia. Sobre cada rama se muestra el valor del soporte *bootstrap*, y en la mayoría de los casos se incluyeron los soportes mayores al 50%.



6.5.1 Clade 1

Los haplotipos identificados en el PNNG se asocian con los haplotipos del Pacífico oriental (SBC y Costa Rica, especialmente), este grupo está soportado por un valor de *bootstrap* del 83% en el árbol de MP y 61% en el árbol de NJ. Se observa una estrecha relación entre E(SBC) (López-Castro *et al.* 2005) y E(PGC), soportada con *bootstrap* del 64% en MP y 52% en NJ, al compartir los mismos cambios en la secuencia de los haplotipos. También se observa la agrupación de los haplotipos J y F, a pesar de que geográficamente corresponden al este de la India y al Atlántico, respectivamente.

6.5.2 Clade 2

Este grupo se encuentra soportado por un valor de *bootstrap* del 82% en MP y 47% en NJ. Está compuesto por 14 haplotipos de golfinia representados por la región del Pacífico oriental (n=6), Atlántico (n=1), y este de la India (n=7) incluyendo cuatro localidades diferentes (Gahirmatha, Madras, Rushikulya y Sri Lanka), observándose un posible agrupamiento de los haplotipos en dos regiones geográficas: Pacífico oriental y este de la India, a excepción de los haplotipos F y J (con *bootstrap* en MP=73% y NJ=61%), los cuales se agrupan al presentar similitud en sus secuencias y compartir un cambio de nucleótido de A a G (Transición) en la posición 199.

Para explicar este agrupamiento por regiones geográficas, fue observado el alineamiento de las secuencias y se encontró que: 1). Los siete haplotipos de la India comparten el mismo nucleótido en nueve posiciones diferentes (70, 112, 137, 144, 160, 169, 210, 225, 275) del alineamiento, 2). Los haplotipos del Pacífico oriental tienen igual nucleótido en las mismas posiciones anteriores, y 3). Los haplotipos J y F comparten con los haplotipos de la India los mismos nucleótidos en las posiciones 137 y 210, así como en las posiciones restantes (70, 112, 144, 160, 169, 225, 275) con los haplotipos del Pacífico oriental. Por lo tanto se observa



en los árboles consenso una mayor cercanía de J y F con los haplotipos del Pacífico oriental (Tabla 10).

Tabla 10. Sitios polimórficos característicos de los haplotipos en cada una de las regiones geográficas (Pacífico oriental, India y Atlántico).

POSICIÓN NUCLEÓTIDO	Pacífico oriental	Este India	J(EIG)Lo y F(A)Lo
70	T	C	T
112	C	T	C
137	T	A	A*
144	T	C	T
160	G	A	G
169	G	C	G
210	G	A	A*
225	C	T	C
275	T	C	T

6.5.3 Clade 3

Grupo conformado por la estrecha relación presentada entre las especies hermanas: tortuga lora y golfinia, el cual está soportado por un valor del 86% en MP y 43% en NJ, pese a presentarse en éste último un valor menor del 50%.

6.5.4 Clade 4

En esta rama se observa una relación definida entre el *out-group* (o grupo externo) y los haplotipos estudiados con el fin de soportar basalmente la inferencia filogenética de los haplotipos.



7. DISCUSIÓN

7.1 NOMENCLATURA HAPLOTÍPICA

Al comparar los haplotipos encontrados en el PNNG con los reportados en el *Genbank*, presentan similitud con dos de los cinco haplotipos característicos del SBC (Número acceso *Genbank*: AY920519 y AY920522), correspondiendo a los haplotipos K y E, respectivamente. Sin embargo, hay una diferencia notable en el nombre de los haplotipos, tanto en la base de datos (K, M, N, E y O), como en lo confirmado por López-Castro *et al.* (2005) (L, N, O, U y V), ya previamente reportados por Bowen *et al.* (1998), quienes designan también cinco haplotipos (L, M, N, O y P) para el este del Pacífico de los cuales sólo tres corresponden a los mismos del SBC (M, N y O). Debido a lo anterior y para evitar confusiones, en el presente estudio se nombraron los haplotipos de acuerdo a lo reportado en el *GenBank*, ya que es posible conocer las secuencias y compararlas con las obtenidas.

Vale la pena resaltar que en la base de datos del *GenBank* existen haplotipos con igual nomenclatura para diferentes secuencias, por ejemplo se presenta el haplotipo K en la región de India (AF513540, AF513539, AF051775 y AF314651) y en el SBC (AY920519). Esto mismo pasa con el haplotipo E, el cual se reporta para el SBC (AY920522) y es referenciado por Bowen *et al.* (1998) para la región del Atlántico y no para el Pacífico oriental.



7.2 DIVERSIDAD GENÉTICA EN LA COLONIA DEL PNNG

A nivel general, se han realizado varios estudios en divergencia genética en muchas taxa, incluyendo las tortugas marinas, y pese a las técnicas empleadas y comparando pequeños segmentos de información (~300 pb por individuo, o ~2% del ADNmt), similares a los de este estudio, se presenta siempre una baja divergencia en las tortugas en comparación con los otros vertebrados, soportadas además, por evidencias geológicas o patrones filogeográficos de las diferentes taxa (Awise *et al.* 1992). En dichos estudios se han encontrado varios eventos de mutación al emplear esos segmentos cortos de la región control, donde el número de haplotipos revelado por esas secuencias fueron similares a las obtenidas para la región *D-loop* completa usando datos de *Restriction Fragment Length Polymorphism* -RFLP- (Bernatchez y Danzmann 1993), por lo tanto la longitud de secuencia empleada en esta investigación, pese a ser pequeña, brinda también cambios importantes para el propósito para el cual fue amplificada.

Las secuencias de la región control de golfinia en el PNNG indican niveles altos de A y T (>30%) y bajos de G y C (11.34% y 15.11%, respectivamente), similares a los encontrados en *C. mydas* -verde- (Lahanas *et al.* 1994), confirmando la composición característica de las secuencias *D-loop* en vertebrados planteada por Saccone *et al.* (1987), las cuales son típicamente deficientes en G y C.

Esta baja diversidad intraespecífica exhibida en el grupo de los Testudines (Bowen *et al.* 1995; Awise *et al.* 1992) explica en parte los valores de variabilidad genética (expresada en diversidad haplotípica: $h=0.069$ y diversidad nucleotídica: $\pi=0.023\%$) obtenidos en la colonia de tortuga golfinia del PNNG. Estos valores son similares a los encontrados por López-Castro *et al.* (2005) en las colonias peninsulares del SBC ($h=0.16$ y $\pi=0.06\%$), para lo cual ellos postulan que su baja diversidad es posible que se deba a diferencias marcadas entre las colonias peninsulares y continentales con respecto a morfología, etología y tipo de



anidación. Siendo característico en la península la anidación solitaria similar a la presentada en el PNNG, la cual puede reducir el tamaño efectivo de la población por el número bajo de hembras anidantes. Así mismo, los resultados son mucho mas bajos al compararlos con otras poblaciones continentales del Pacífico oriental donde se registraron valores de $h=0.60$ y $\pi=0.26\%$, y en el este de la India de $h=0.72$ y $\pi=2.07\%$ para Sri Lanka (López-Castro *et al.* 2005), y de $h=0.27$ y $\pi=0.3\%$ para Orissa (Shanker *et al.* 2004).

También se han encontrado similitudes de estos valores de diversidad en otras especies de tortugas marinas al compararlos con los del PNNG (colonias=1; $n=29$; $h=0.069$; $\pi=0.023\%$) como por ejemplo los encontrados en tortuga carey en el mar Caribe y oeste del Atlántico (colonias=7; $n=103$; rangos de $h=0.124-0.782$ y $\pi=0.03-2.51\%$) (Bass *et al.* 1996), los cuales a su vez, son más bajos a los valores obtenidos en otras especies, tales como: tortuga laúd en colonias del Atlántico, Indo-Pacífico y Este del Pacífico (colonias= 10; $n=175$; $h=0.667$) (Dutton *et al.* 1999); tortuga cabezona en Pacífico, Atlántico, Indico y mar Mediterráneo (colonias=8; $n=176$; $h=0.732$ y $\pi=0.2\%$) (Bowen *et al.* 1994), y tortuga verde en colonias anidantes de Costa Rica, Surinam, Florida e Isla Aves (colonias=4; $n=44$; $h=0.2000$, 0.2572 , 0.6182 y 0.2500 ; $\pi=0.04\%$, 0.06% , 0.11% y 0.06% , respectivamente) (Lahanas *et al.* 1994).

Otras posibles explicaciones a estos bajos valores de diversidad encontrados en la colonia de playa Palmeras (PNNG) son: 1) la predominancia del haplotipo k, presentándose en 99.6% de los individuos; 2) la longevidad de la mayoría de las tortugas y su baja tasa metabólica (Awise *et al.* 1992); 3) la presencia de dos haplotipos característicos sugiriendo una colonia relativamente joven, ya que según López-Castro *et al.* (2005) la diversidad alta en colonias continentales puede significar colonias viejas, lo cual es consistente con la baja diversidad haplotípica encontrada; y 4) un efecto de cuello de botella reciente en esta población natural (Lahanas *et al.* 1994), aproximadamente de 25 años, debido a



una captura indiscriminada reportada a finales de los años 70 y principios de los 80, donde diariamente eran colectadas entre 50 y 60 tortugas que frecuentaban aguas cercanas a Gorgona (Aguíño *com. per.* 2006).

Vale la pena resaltar un evento raro (representado por un neonato con el haplotipo E) encontrado para la temporada reproductiva de 2004, explicado tal vez por la visita frecuente de hembras a las áreas de alimentación en la isla (dada por la oferta de arrecifes coralinos) (Ceballos *et al.* 2003), la desorientación y las condiciones favorables de la playa para la anidación (Pavía *et al.* 2006). De acuerdo a lo anterior, posiblemente la colonia que anida en el PNNG cumpliría con la teoría del *natal homing* la cual propone que las tortugas retornan a anidar cerca o a los mismos sitios donde ellas emergieron como cría, y aunque hay pocas evidencias que soportan ésta hipótesis, algunos estudios genéticos han confirmado que esto ocurre en ciertas poblaciones de tortugas marinas (Lutz y Musick 1996).

7.3 COMENTARIOS ACERCA DE LA BIOGEOGRAFÍA DEL GÉNERO *Lepidochelys*

Según Bowen *et al.* (1998) el haplotipo más divergente de golfinia es observado en el oeste del Indo-Pacífico, considerando esa región como el origen más reciente de la radiación de los linajes de ésta especie. En el *Clade 2* se presenta claramente una separación de los haplotipos de la India con respecto a los del Pacífico oriental, y de acuerdo con ese autor, se corrobora que las poblaciones de golfinia presentes en cada región son diferentes haplotípicamente.

En el *Clade 3* de los árboles consenso presentados, se observa la agrupación de las dos especies pertenecientes al género *Lepidochelys*, y además se corrobora según lo descrito por Bowen *et al.* (1998), que la tortuga lora del Atlántico y golfinia



del Pacífico son especies diferentes. El presente trabajo aporta a la diversidad haplotípica de esta región (*Clade 1*) y complementa en parte los argumentos del modelo biogeográfico del género *Lepidochelys*, el cual postula: 1) una separación vicariante entre las dos especies de *Lepidochelys* al emerger el Istmo de Panamá, y 2) un reciente evento de dispersión de tortuga golfina desde el Indico hacia el Atlántico (vía cabo de Buena Esperanza), quedando la tortuga lora restringida en su distribución al Golfo de México (Pritchard 1969 y Hughes 1972). Se aclara que los resultados son derivados de la información disponible en la base de datos del *GenBank* para otras playas de anidación de golfina en el mundo, confirmando lo expresado por Abreu-Grobois *et al.* (1996, En: Bowen *et al.* 1998) en que aún existen grandes colonias del Pacífico oriental que no se han caracterizado en su totalidad.

7.4 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

La golfina es considerada una de las especies de tortugas marinas más numerosas en el mundo (*Lutz et al.* 1996), la cual es más susceptible a la explotación humana debido a los cientos de huevos dejados en las playas de anidación ya que se cree que su elevada capacidad reproductiva le permite soportar altas tasas de mortalidad (Bowen y Avise 1995; Frazier 1999). Por esto, la condición de Parque Natural y gracias al monitoreo que CIMAD realiza durante la época reproductiva de tortugas desde el 2003, actualmente esta colonia no presenta problemas de orden antrópico.

Sin embargo, los análisis genéticos demostraron valores bajos de diversidad, razón por la cual es importante su conservación a largo plazo. Por lo tanto, es necesario aumentar la población reproductiva y su variabilidad en tiempo y espacio, implementando acciones en pro de las tortugas en los planes de manejo de ésta área protegida, lo cual según Su *et al.* (2003) también podría favorecer la







introducción de nuevo material al acervo genético por inmigración. Por otra parte, al presentarse similitud entre algunos de los haplotipos del SBC con los encontrados en el PNNG, se puede pensar en la presencia de un flujo genético, es decir, la transferencia de genes de una población a otra facilitada por la migración. Estas dos colonias podrían ser consideradas dentro de una misma unidad de manejo según lo descrito por López-Castro *et al.* (2005) para el SBC, si se consideran los dos haplotipos que comparten. Se abre así la posibilidad de eventos de re-colonización entre estas poblaciones en caso de que alguna de ellas sea extirpada. De este modo, se mantendría el potencial reproductivo de las hembras. Sin embargo, la falta de información genética de algunas colonias del sur y del centro del Pacífico oriental, imposibilita actualmente tener certeza sobre este tipo de acciones.


La conservación a largo plazo de ésta especie implica: biológicamente, considerar su longevidad y madurez tardía; físicamente, la preservación de los diferentes ambientes en los cuales se desarrolla; y políticamente, un acuerdo de cooperación internacional debido a las grandes migraciones que realiza y que involucran jurisdicciones de otros países. Así como también, la aplicación de la legislación nacional con el fin de disminuir la sobreexplotación, y declinación de la población actual.





8. CONCLUSIONES


-  En el proceso de extracción se logró estandarizar una buena cantidad de ADN a partir de 20uL de sangre, a diferencia de lo sugerido en el protocolo de Fitzsimmons *et al.* (1996), el cual indica el empleo de 100uL. Resultando más efectivo el trabajar con kits comerciales, pese a sus altos costos.
-  Los cebadores FDL01 y RDL01 diseñados a partir de LTCM2 y HDCM2 (Lahanas *et al.* 1994), resultaron más efectivos para la amplificación de aproximadamente 300 pb de la región control del ADNmt de tortuga golfinia.
-  Es necesario homologar la nomenclatura de los haplotipos presentes tanto en el *GenBank* como en los artículos científicos publicados (p. e. López-Castro *et al.* (2005) y Bowen *et al.* (1998)).
-  Los valores bajos de diversidad genética encontrados en la colonia de Gorgona pueden ser explicados por:
 - la condición insular de la población,
 - el tipo de anidación solitaria semejante a las poblaciones peninsulares del SBC,
 - presentar un haplotipo predominante (K) en la mayoría de los individuos,
 - ser una colonia joven por la presencia de dos haplotipos (K y E),
 - la longevidad y baja tasa metabólica de la mayoría de las tortugas, ó,
 - por un efecto de cuello de botella reciente en esta población natural.




-  La diversidad genética (índice haplotípico y nucleotídico) determinada a partir de un segmento de la región control de la mitocondria en la colonia reproductiva de *L. olivacea* es similar a la reportada para el SBC, y parecida a la registrada en otras tortugas marinas y regiones geográficas, corroborando la baja diversidad que presenta el grupo de los Testudines.


-  Los haplotipos K y E encontrados en la colonia del PNNG, son similares a los del SBC de acuerdo a las secuencias disponibles del *GenBank*.


-  Las agrupaciones presentadas en los árboles consenso obtenidos para *L. olivacea* indican la presencia de dos regiones geográficas (Pacífico oriental y este de la India) claramente diferenciadas haplotípicamente, así como la relación de las dos especies hermanas del género *Lepidochelys*.

-  La diversidad genética está influenciada por:
 - el número de muestras y colonias a analizar,
 - el número de hembras anidantes,
 - la longitud de la playa de anidación,
 - las amenazas naturales, la sobreexplotación, y
 - las condiciones medio ambientales (temperatura, humedad, marea y Vegetación), entre otras.

-  El tipo de anidación (masiva o solitaria) es, posiblemente, una de las características determinantes para definir la variabilidad genética para posteriores estudios en poblaciones continentales, peninsulares e insulares.





-  La colonia reproductiva de Gorgona por su similitud haplotípica posiblemente hace parte de la unidad de manejo del SBC, lo cual permitiría re-colonizar las playas donde ocurre en caso de ser extirpada alguna de ellas, permitiendo preservar el potencial reproductivo de la especie.


-  La identificación genética de la población de golfinia en el PNNG ayudará a definir las unidades demográficas o de manejo (UM) en el Pacífico colombiano y oriental, importantes para el diseño de estrategias de conservación local, regional, nacional e internacional.




9. RECOMENDACIONES

-  El ADNmt al no recombinarse ha permitido estudiar la historia matrilineal de las tortugas marinas. Sin embargo, al escoger trabajar con éste marcador, es importante analizar al menos dos genes mitocondriales, con lo cual se evite contar la historia del gen.

-  Es necesario seguir realizando anualmente colecta de muestras en el PNNG con fines moleculares para corroborar los valores de diversidad presentada y los haplotipos encontrados; además de confirmar si persisten similitudes con los haplotipos registrados en el SBC. Esto también ayudaría a reafirmar la teoría del *natal homing* en Gorgona.

-  Es necesario muestrear y comparar con otras colonias continentales del Pacífico colombiano para confirmar si comparten los mismos haplotipos encontrados en el PNNG o si por el contrario se identifican otros diferentes, así como para confirmar si se presenta un intercambio genético entre el continente y la isla.

-  Es necesario complementar los estudios de ADN mitocondrial con ADN nuclear que permitan elucidar el flujo genético aportado por ambos progenitores, lo cual ayudaría a reconocer si una hembra puede ser copulada por más de un macho en los sitios de alimentación o durante las migraciones que realizan.



REFERENCIAS

Abreu Grobois, F.A. 2000. Genética Poblacional y Filogeografía de las Tortugas Marinas Golfina (*Lepidochelys olivacea*) y Laúd (*Dermochelys coriacea*) en el Pacífico Mexicano (proyecto G-007). 55pp.

Allard, M., M. Miyamoto, K. Bjorndal, A. Bolten, and B. Bowen. 1994. Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. *Copeia* 1994: 34-41.

Alvarado, J. y T.M. Murphy. Periodicidad en la Anidación y el Comportamiento entre Anidaciones: pp. 132-136. 2000. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.

AMCC - Ambrose Monell Cryo Collection. (En línea). Field Material. American Museum of Natural History (AMNH). <http://research.amnh.org/amcc/labfacilities6.html>.

Amorocho, D., H. Rubio y W. Diaz 1992. *Observaciones sobre el estado actual de las tortugas marinas en el Pacífico colombiano*. pp. 155-179. En: Rodríguez, J. y Sánchez, H. (Eds) *Contribución al conocimiento de las tortugas marinas de Colombia*. 1992. Bogotá, Biblioteca Andrés Posada Arango. Libro 4. 190 pp.

Amorocho, D. 1998. Biología Reproductiva de la Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*) en Playa Larga, Chocó: pp. 345-349. En: M. E. Chávez y N. Arango (Eds). Informe Nacional sobre el Estado de la Biodiversidad. Instituto von Humboldt, PNUMA, Ministerio del Medio Ambiente. Santa Fe de Bogotá, Colombia, Vol. 3.



Amorocho, D., F. Sánchez y D. Quiroga. 2001. *El encanto de las tortugas marinas en el Parque Nacional Natural Gorgona*: pp. 141-148. En: Barrios, L. y López-Victoria, M. (Eds). *Gorgona marina: contribución al conocimiento de una isla única*. INVEMAR, Serie Publicaciones Especiales No. 7, Santa Marta, 160 pp.

Amorocho, D. 2002. Prioritising research-driven management and public participation in sea turtle conservation in Colombia. School of Resources, Environment and Society. Canberra, Australian National University, 143 pp.

Avise, J. C., B. W. Bowen, T. Lamb, A. B. Meylan and E. Bermingham. 1992. Mitochondrial DNA Evolution at a Turtle's Pace: Evidence for Low Genetic Variability and Reduced Microevolutionary Rate in the Testudines. *Molecular Biology Evolution*, 9(3): 457-473.

Avise, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7: 371-379.

Aureggi, M., G. Gerosa and S. Chanthrapornsyl. 1999. Marine Turtle Survey at Phra Thong Island, South Thailand. *Marine Turtle Newsletter*, 85: 4-5.

Barber, R., C. Fontaine, J. Flanagan and E. Louis Jr. 2003. Natural Hybridization Between a Kemp's Ridley (*Lepidochelys kempii*) and Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*) Confirmed by Molecular Analysis. *Chelonian Conservation and Biology*, 4(3): 701-704.

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 behaviour and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricate*, with mtDNA sequences. *Molecular Ecology*, 5: 321-328.

Bass, A.L. 1999. Genetic Analysis to Elucidate the Natural History and Behavior of Hawksbill Turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Wider Caribbean: a review and Re-Analysis. *Chelonian Conservation and Biology*, 3(2):195-199.

Bellairs, A. and J. Attridge 1975. Reptiles. London, Hutchinson and Co.

Bermingham, E. and C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7, 367-369.



Bernatchez, L. and R.G. Danzmann. 1993. Congruence in control region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Molecular Biology Evolution*, 10: 1002-1014.

Bjorndal, K.A. Prioridades para la Investigación en Hábitats de Alimentación: pp. 13 – 15. 2000. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.

Bowen, B., A. Meylan, J. Ross, C. Limpus, G. Balazs and J. Avise. 1992. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution*, 46: 868-881.

Bowen, B.W., W.S. Nelson y J.C. Avise. 1993. A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment and conservation relevance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5574-5577.

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

Bowen, W.B. and J.C. Avise. 1995. Conservation genetics of marine turtles, pp. 190-237. In: J.C. Avise y J.L. Hamrick (Eds). *Conservation Genetics: Case histories from nature*. Columbia University Press. New York.

Bowen, B. W. and W. N. Witzell. 1996. Sea Turtle Conservation Genetics: pp. 1-7. En: Bowen, B. W. and W. N. Witzell (Editors). Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. 173pp.

Bowen, B., A. Clark, F. Abreu-Grobois, A. Cháves, H. Reichart and R. Ferl. 1998. Global phylogeography of the ridley turtles (*Lepidochelys spp.*) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genetica*, 101: 179-189.

Cailliet, G.M., M.S. Love & A.W. Ebeling. 1986. Fishes. A field and laboratory manual on their structure, identification, and natural history. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California. 194 pp.



Carr, A. 1987. New perspectives of the pelagic stage of sea turtle development. *Conservation Biology*, 1(2): 103–121.

Castaño-Mora, O. (Ed). 2002. Libro Rojo de Reptiles de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional-Colombia. Bogotá. Colombia. pp. 29-36, 88-91.

Ceballos-Fonseca, C., L. Martínez y D. Quiroga. 2003. Distribución, Amenazas y Esfuerzos de Conservación de las Tortugas Marinas en el Pacífico Colombiano. Informe Final Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives de Andrés”. Santa Marta, 78 pp.

Ceballos-Fonseca, C. 2004. Distribución de playas de anidación y áreas de alimentación de tortugas marinas y sus amenazas en el Caribe colombiano. Santa Marta, Colombia. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras, 33: 79-99.

Chacón, D., N. Valerín y M. Cajiao. 2000. Manual para mejores prácticas de conservación de las tortugas marinas en Centroamérica. 139 pp.

CMS (En línea). Convención sobre la conservación de las especies migratorias de animales silvestres. [http:// www.cms.int/](http://www.cms.int/).

CIT - Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas (En línea). Comentarios Introdutorios <http://www.myspy.us/cgi-bin/nph-paidmember.cgi/111011A/http/www.seaturtle.org/iac/castellano>.

Córdoba, J. y C. López. 1997. Diagnóstico Actual de las Tortugas Marinas, 1996, en el Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina. Tesis. Biólogo Marino y Bióloga con Énfasis en Marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano y Universidad del Valle. Facultad de Biología Marina y Facultad de Ciencias. 210 pp.

Díaz, J., J. Pinzón, A. Perdomo, L. Barrios y M. López-Victoria. 2001. Generalidades. p.17. En: Barrios, L. y López-Victoria, M. (Eds). Gorgona marina: contribución al conocimiento de una isla única. INVEMAR, Serie Publicaciones Especiales No. 7, Santa Marta, 160 pp.



Duque-Goodman, F. 1988. Observaciones sobre la captura de Tortugas marinas por un buque arrastrero camaronero, en aguas someras del Pacífico Colombiano. *Trianea*, (2): 351 – 372.

Dutton, P. 1996. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies: p 17. En: Bowen, B.W. and W. N. Witzell (Eds). *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics*. NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-396, 173 pp.

Dutton, P., B. Bowen, D. Owens, A. Barragan and S. Davis. 1999. Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *The Zoological Society of London*, 248: 397-409.

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

Eckert, K.L. Diseño de un Programa de Conservación: pp. 6 – 8. 2000. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4*.

Felsenstein, J. 1985. PHYLIP. The Phylogeny Inference Package, versión 3.5. *American Naturalist*, 125: 1– 15.

Ferreira, M. y D. Grattapaglia. 1998. *Introducción al Uso de Marcadores moleculares en el Análisis Genético*. 1ª Ed. Brasíla: EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20: 220pp.

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



Fitzsimmons, N., C. Moritz and B. Bowen. Identificación de Poblaciones: pp. 83 – 89. 2000. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.

Foley, A.M., P.H. Dutton, K.E. Singel, A.E. Redlow and W.G. Teas. 2003. The First Records of Olive Ridleys in Florida, USA. *Marine Turtle Newsletter*, 101: 23-25.

Frankham, R., D. Ballou and D. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge.

Frazier, J. 1980. Marine turtles and problems in coastal management. Vol 3. pp. 2395-2411. En: EDGE (Ed). Coastal zone '80: *Proceedings of the Second Symposium on coastal and ocean management*. American Society of Civil Engineers, New York.

Frazier, J. 1999. Generalidades de la Historia de Vida de las Tortugas Marinas. 24 pp. En: "Conservación de Tortugas Marinas en la Región del Gran Caribe – Un Diálogo para el Manejo Regional Efectivo". Santo Domingo. Sesión I. pp. 3-16.

Frazier, J. G. 2000. Conservación basada en la comunidad. pp. 16–20. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Consolidated Graphic Communications, Blanchard. Pennsylvania USA. 278 pp.

Gaffney, E. and P. Meylan. 1988. A phylogeny of turtles, pp. 157-219. En: M. J. Benton (Editor). *The Phylogeny and Classification of Tetrapods*. Clarendon Press, Oxford.

Gibson, J. y G. Smith. Reducción de las Amenazas a los Hábitats de Alimentación: pp. 211-216. 2000. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.



Gillespie, J. 1986. Variability of evolutionary rates of DNA. *Genetics*, 113: 1077-1091.

Godfrey, M.H., A.F. D'Amato, M.A. Marcovaldi and N. Mrosovsky. 1999. Pivotal temperature and predicted sex ratios for hatchling hawksbill turtles from Brazil. *Canadian Journal Zoological*, 77(9): 1465-1473.

Griffiths, A., J. Miller, D. Suzuki, R. Lewontin y W. Gelbart. 1993. Genética. Capítulo I: Genética y ser vivo. pp. 1-19. Quinta edición. McGraw – Hill – Interamericana. España.

Harrison, R. 1989. Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. *Tree*, 4 (1): 6-11.

Hartl, D. and A. Clark. 1997. Principles of population genetics. Sunderland, Sinauer Associates, Inc.

Hasbún, C.R., M. Vásquez. 1999. En: Brendan J.G. y A.C. Broderick. Noticiero de Tortugas Marinas, 85: 1-36.

Hasegawa, M., Y. Iida, T. Yano, F. Takaiwa and M. Iwabuchi. 1985. Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. *Journal Molecular Evolution*, 22: 32-38.

Hinestroza, L. M. y V. P. Páez. 2001. Anidación y Manejo de la Tortuga Golfinia (*Lepidochelys olivacea*) en la Playa La Cueva, Bahía Solano, Chocó, Colombia. *Cuad. herpetol.*, 14 (2): 131-144.

Hughes, G.R. 1972. The olive ridley sea-turtle (*Lepidochelys olivacea*) in South-east Africa. *Biology Conservation*, 4: 128-134.

IDEAM, 2000. Pronóstico de pleamares y bajamares en la costa Pacífica colombiana para el año 2000. Instituto de Asuntos Ambientales, Bogotá, s.p.

Jiménez, P. y C. Collada. 2000. Técnicas para la Evaluación de la Diversidad Genética y su uso en los programas de Conservación. Universidad Politécnica de Madrid, 12 pp.

Jiménez, L. A. 2001. Programa de Conservación de las Tortugas Marinas en el Parque Nacional Natural Sanquianga. En: Comisión Permanente del Pacífico Sur – CPPS *et al.*



Karl, S. A. and B.W. Bowen. 1999. Evolutionary Significant Units versus Geopolotocal Taxonomy: Molecular Systematics of an Endangered Sea Turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology*, 13(5): 990-999.

Kumar, S. K Tamura, and M Nei. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5:150-163.

Lahanas, P.N, M.M. Miyamoto, K.A. Bjorndal and A.B. Bolten. 1994. Molecular evolution and population genetics of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Genetica*, 94:57-67.

Lahanas, P., K. Bjorndal, A. Bolten, S. Encalada, M. Miyamoto, R. Valverde and B. Bowen. 1998. Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Marine Biology*, 130: 345-352.

Lambert, M. 1997. Reptiles. Dorling Kindersley Publishing Inc., New York, 128 pp.

Lanteri, A. y V. Confalonieri. 2003. "Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos". En: Morrone, JJ y J. Llorente Bousquets (Eds). *Una Perspectiva Latinoamericana de la Biogeografía*. Las Presas de la Ciencia, UNAM, Méxio, D.F, pp. 185-193.

Lewin, B. 1997. Genes VI. Oxford University Press. New York, pp. 720-723.

LEY 356 de 1997 (enero 21). Protocolo Relativo a las Áreas y a la Flora y Fauna Silvestres Especialmente Protegidas del Convenio para la Protección y el Desarrollo Del Medio Marino en la Región del Gran Caribe) de la Convención en Cartagena de Indias, Colombia, marzo de 1983, (En línea: <http://web.minambiente.gov.co/html/neginternal/AcuerdosRegionales/Spaw/Index.htm>).

Lima, E. H.S.M., M.T.D. Melo and P.C.R. Barata. 2003. First Record of Olive Ridley Nesting in the State of Ceará, Brazil. *Marine Turtle Newsletter*, 99:20.



Livingstone, S.R. 2005. Report of Olive Ridley Nesting on the North Coast of Trinidad. *Marine Turtle Newsletter*, 109: 6-7.

López-Castro, M.C., R. Carmona and W.J. Nichols. 2004. Nesting characteristics of the olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*) in Cabo Pulmón, southern Baja California. *Marine Biology*, 145: 811-820.

López-Castro, M.C. and A. Rocha-Olivares. 2005. The panmixia paradigm of eastern Pacific olive ridley turtles revised: consequences for their conservation and evolution biology. *Molecular Ecology*, 14: 3325-3334.

Lutz, P.L. and J.A. Musick. 1996. The Biology of Sea Turtles. pp. 125-126.

Marcovaldi, M., J. Thomé y J. Frazier. 2003. Marine Turtles in Latin America and the Caribbean: A Regional Perspective of Successes, Failures and Priorities for the Future. *Marine Turtle Newsletter*, 100: 38-42.

Marquez-M. R., C. Peñaflores y J. Vasconcelos. 1996. Olive Ridley Turtles (*Lepidochelys Olivacea*) Show Signs of Recovery at La Escobilla, Oaxaca. *Marine Turtle Newsletter*, 73: 5-7.

Martínez, I. 2001. Evaluación del Éxito de Eclosión y reclutamiento en nidos trasladados de tortuga Laúd *Dermochelys coriacea*, Playa Cipara, Península de Paria, Venezuela. Santiago de Cali. 51pp. Trabajo de Grado (Biólogo). Universidad del Valle.

Martínez, L. y V. Páez. 2000. Ecología de Anidación de la tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*) en la Playa de La Cueva, Costa Pacífica Chocoana, Colombia, en 1998.

McCormick, C. 1996. Contribución al Conocimiento de la Ecología y Biología Reproductiva de las Tortugas Marinas en la Isla Gorgona. Santiago de Cali. 91 pp. Trabajo de Grado (Biólogo Marino). Universidad del Valle.

Medem, F. 1983. Las Tortugas Marinas Sacrificadas en el Mercado de Cartagena. Lozania, Acta Zoológica Colombiana, Vol. 44, 14pp.

Meylan, A. y P. Meylan. Introducción a la Evolución, Historias de Vida y Biología de las Tortugas Marinas. 2000. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). Técnicas de Investigación y Manejo para la



Conservación de Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas
UICN/CSE Publicación No. 4. pp. 3 – 5.

Miller, J. 1997. Reproduction in sea turtles. En: Lutz, P.L. and J.A. Musick (Eds.). *The Biology of Sea Turtles*. CRC, New York, 53pp.

Moncada-G, F., A. M. Rodríguez, R. Márquez-M. and E. Carrillo. 2000. Report of the Olive Ridley Turtle (*Lepidochelys olivacea*) in Cuban Waters. *Marine Turtle Newsletter*, 90:13-15.

Montenegro, B., N. Bernal y A. Martínez. 1984. Estudio del contenido estomacal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, en la costa de Oaxaca, México. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Contribución 485 del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

Moore, M. and M. Ball. 2002. Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nest on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 11: 281-288.

Morrone, J. 2001. Sistemática, Biogeografía, Evolución. Los patrones de la biodiversidad en tiempo – espacio. Primera edición. México. pp. 31- 70.

MRosovsky, N. and P.C.H. Pritchard. 1971. Body Temperatures of *Dermochelys coriacea* and other Sea Turtles. *Copeia*, 4: 624-631.

MRosovsky, N. 1980. Thermal biology of sea turtles. *American Zoological*, 20: 531-547.

MRosovsky, N. y C. Yntema. 1980. Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implications for conservation practices. *Biological Conservation*, 18: 271-280.

Mullis, K. y F. Faloona. 1987. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase – Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, Vol. 155, parte F, pp. 335 – 350.

Musick, J. Sea Turtles. Virginia Institute of Marine Science, USA. pp. 2018-2028. (<http://www.seaturtle.org>).



Nason, J. 2002. La estructura genética de las poblaciones de árboles. Ecología y conservación de bosques neotropicales. M.R. Guariguata and G.H. Catan. Cartago, Libro Universitario Regional -LUR-. pp. 299-328.

NCBI (*National Center for Biotechnology Information, USA*). Home page <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Nei, M. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273.

Nei, M. and F. Tajima 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97: 145-163.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA, 456pp.

Oravetz, C. Reducción de la Captura Incidental en Pesquerías: pp. 6 – 8. 2000. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4*.

Owens, D., J. Alvarado., R. Byles., R. Marquez., L. Ogren y P. Pritchard. 1989. 90 minute tow time restrictions to Project sea turtles from accidental mortality. Kemp's Ridley Recovery Team, mecanografiado. 2-10 pp.

Page, R. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.

Pandav, B. and B. Choudhury. 1999. An Update on the Mortality of the Olive Ridley Sea Turtles in Orissa, India. *Marine Turtle Newsletter*, 83:10-12.

Pavía, A., Rodríguez-Zuluaga, J.A., Amorocho, D.F. 2006. "Monitoreo de la biología reproductiva de la tortuga caguama del Pacífico (*Lepidochelys olivacea*) en el Parque Nacional Natural Gorgona – Pacífico de Colombia". Informe final CIMAD, Cali, Colombia. 34 pp.

Posada, D. and K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817-818.



Pritchard, P.C.H. 1969. Studies of the Systematics and Reproductive Cycles of the Genus *Lepidochelys*. Ph.D. Thesis, University of Florida, Gainesville, FL.

Pritchard, P.C.H. 1976. Post-nesting movements of marine turtles (Cheloniidae and Dermochelyidae) tagged in the Guianas. *Copeia*. pp. 749-754.

Pritchard, P. 1979. Encyclopedia of Turtles. Sea Turtles, Chapter 9. England: T. F. H. Publications.

Pritchard, P.C.H. 1999. Status of the black turtle. *Conservation Biology*, 13: en prensa.

Pritchard, P. y J. Mortimer. Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies: pp. 23 - 41. 2000. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.

Proyecto Karumbé. (En línea). Tortugas Marinas del Uruguay. Generalidades sobre las Tortugas Marinas. <http://www.geocities.com/karumbe> 1999.

Ramesh, K., T. Velavan, D. Udaykumar, P. Hendre, K. Shanker, B. Choudhury and L. Singh. 2004. Development and characterization of novel microsatellite markers from the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Molecular Ecology Notes*, 4, 77-79.

Renjifo, J. y M. Lundberg. 1999. Anfibios y Reptiles de Urrá. Skanska (Ed.). Editorial Colina, Medellín, Colombia. 96 pp.

Richardson, J.I. Prioridades para los Estudios sobre la biología de la reproducción y de la Anidación: pp. 9 – 12. 2000. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.



Rodríguez, C., D. Vaca, D. Caicedo y V. Rueda. 2002. Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales en Colombia. Ministerio del Medio Ambiente, primera edición, 63 pp.

Rozen, S. and H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.

Rueda, J., G. Ulloa, S. A. y B. Medrano, Estudio sobre la Biología reproductiva, La Ecología y El Manejo de la Tortuga Canal (*D. coriacea*) en el Golfo de Uraba .1992. En: Contribución al Conocimiento de las Tortugas Marinas de Colombia. Libro 4. Serie de Publicaciones Especiales del Inderena, 132pp.

Rueda, J. 1992. Anotaciones sobre un Caso de Mortalidad Masiva de Tortugas Marinas en la Costa Pacífica de Colombia. En: Contribución al Conocimiento de las Tortugas Marinas de Colombia. Libro 4. Serie de Publicaciones Especiales del Inderena. pp. 181-190.

Rueda, J. 1988. Notas sobre la nidación de Tortugas Marinas en el Pacifico Colombiano. Revista Trianea. Bogotá, Biblioteca Andrés Posada Arango. No. 1: 79-86.

Rueda, J. 1999. Anfibios y Reptiles amenazados de extinción en Colombia. En: Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Bogotá – Colombia. Volumen XXII, Suplemento especial. pp. 475-497.

Rueda, J., J. Rodríguez, J. Rueda, R. Mast, A. González y D. Amorocho. 2005. Tortugas Marinas Neotropicales. Serie Libretas de Campo. 88 pp.

Russell, F. 1980. Snake Venom Poisoning. J.B. Lippincott Co. Philadelphia – Toronto, 562 pp.

Saconne, C., M. Attimonelli and E. Sbisá. 1987. Structural elements highly preserved during the evolution of the d-loop- containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *Journal Molecular Evolution*, 26: 205-211.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, 4: 406 – 425.



Sánchez, F. y D. Quiroga. 2001. Determinación de Hábitos y Comportamiento Alimenticio de las Tortugas Marinas en El Parque Nacional Natural Isla Gorgona - Pacifico Colombiano. Facultad de ciencias Naturales, Programa de Ecología. Popayán, Popayán Foundation University, 105 pp.

Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. (2000). Arlequin ver.2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Secretaría CIT. 2004. Una Introducción a las Especies de Tortugas Marinas del Mundo. Octubre 2004, San José, Costa Rica. 10pp.
<http://www.iacseaturtle.org>

Seminoff. 2000. IUCN Red list global status assessment, green turtle *Chelonia mydas*. IUCN Marine Turtle Specialist Group Review. 93pp.

Shanker, K., B. Pandav and H.B. Andrews. 2003. Sea Turtle Conservation: Research and Management Techniques, A GOI – UNDP Project Manual, Centre for Herpetology / Madras Crocodile Bank Trust, Mamallapuram, Tamil Nadu, India. pp. 8 - 9.

Shanker, K., J. Ramadevi, B. Choudhury, L. Singh and R. Aggarwalt. 2004. Phylogeography of oliver ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) on the east coast of India: implications for conservation theory. *Molecular Ecology*, 13: 1899 -1909.

Steiner, T. and R. Walder. 2005. Two Records of Live Olive Ridleys from Central California, USA. *Marine Turtle Newsletter*, 107:9-10.

Spotila, J. R, A.E. Dunham, A.J Leslie, A.C. Steyermark, P.T. Plotkin and F.V. Paladino. 1996. *Worldwide Population Decline of Dermochelys coriacea: Are Leatherback Turtles Going Extinct? Chelonian Conservation and Biology*, 2: 209-222.

Spotila, J. R., R.D. Reina, A.C. Steyermark, P.T. Plotkin and F.V. Paladino. 2000. *Pacific leatherback turtles face extinction. Nature*, 405: 529-530.



Suwelo, I.S. 1999. Registros sobre la Tortuga Golfina Procedentes de Banyuwangi Sur, Java Oriental. En: Brendan J.G. y A.C. Broderick. Noticiero de Tortugas Marinas, 85: 1-36.

Su, H., L – J. Qu, K. He, Z. Zhang, J. Wang, Z. Chen and H. Gu. 2003. The Great Wall of China: a physical barrier of gene flow?. *Heredity*, 90 (3): 212-219.

Tomás, J., A. Formia, M. Fernández y J. Raga. 2003. Occurrence and genetic analysis of a Kemp's Ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*) in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 67 (3): 367-369.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25:4876-4882.

Tripathy, B.; Shanker, K. and Choudhury, C. 2003. Important nesting habitats of olive ridley turtles *Lepidochelys olivacea* along the Andhra Pradesh coast of eastern India. *Oryx*, 37 (4): 454-463.

UAESPNN (En línea). Parque Nacional Natural Isla Gorgona. <http://www.parquesnacionales.gov.co>.

Yntema, C.L. and N. MRosovsky. 1982. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. *Canadian Journal of Zoology*, 60: 1012-1016.

Weber, M. 1989. Socioeconomic importance of sea turtle: Incidental capture. pp. 50-73. In: OGREN (Ed. in Chief). *Proceedings of the Second Western Atlantic Symposium*. NOAA. Tech. Memo. NMFS-SEFC-226. 401p.

Wiley, E. Phylogenetics. 1981. The theory and Practice of Phylogenetic Systematics. Kansas, Lawrence. Interscience Publication. 439 pp.

Witherington, B. Reducción de las Amenazas al Hábitat de Anidación: pp. 204-210. 2000. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.



White, P.S. and L.D. Densmore. 1992. Mitichondrial DNA isolation. Molecular genetic Analysis of Populations: a practical approach. Press at Oxford Univ.Press, pp. 29-58.

Zunino, M. y A. Zullini. 2003. Biogeografía, la dimensión espacial de la evolución.. Primera edición. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 359pp.