

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA COLONIA REPRODUCTIVA DE LA TORTUGA MARINA GOLFINA –*LEPIDOCHELYS OLIVACEA*– EN EL PARQUE NACIONAL NATURAL GORGONA (PACÍFICO COLOMBIANO) A PARTIR DE SECUENCIAS DE ADN MITOCONDRIAL

Lindamar Camacho-Mosquera¹, Diego Amorocho²,
Luz M. Mejía-Ladino¹, Juan D. Palacio-Mejía³ y Fernando Rondón-González⁴

- 1 Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR), Sede Pacífico, AA 6713 casilla 36, Cali, Colombia. lcamachomosquera@yahoo.com (L.C.M.); mardeluz@invemar.org.co (L.M.M.L)
- 2 Centro de Investigación para el Manejo Ambiental y el Desarrollo-CIMAD. Cra. 1 oeste No. 9-89 / Apto. 301, Cali, Colombia. damorocho@cimad.org
- 3 Instituto de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”-IAvH, Colección de Tejidos/Laboratorio de Biología Molecular, AA 6713, Cali, Colombia. jdpalacio@humboldt.org.co
- 4 Universidad del Valle, Departamento de Biología, Sección Genética, Laboratorio de Genética Molecular Humana, AA 25360, Cali, Colombia. fercho_gen@yahoo.com

RESUMEN

Con el fin de caracterizar genéticamente la colonia anidante de *Lepidochelys olivacea* en playa Palmeras-Parque Nacional Natural Gorgona (PNNG) y contribuir a la implementación de estrategias de conservación para la especie, se secuenció un fragmento de la región + (D-loop) del ADN mitocondrial en 29 individuos, a partir del cual se estimó la diversidad genética y se infirieron las posibles relaciones filogenéticas al comparar la misma secuencia con datos publicados en el GenBank. El análisis de las secuencias reveló la presencia de dos haplotipos N (96.55%) y E (3.45%), de acuerdo con las secuencias registradas para esa especie. La diversidad genética y nucleotídica de la colonia estudiada es $h=0.069$ y $\pi=0.023\%$, respectivamente. Estos resultados corroboran que los Testudines presentan una baja diversidad genética. Los valores de diversidad son bajos comparados con las poblaciones continentales de *L. olivacea* del sur de Baja California ($h=0.16$ y $\pi=0.06\%$), Pacífico oriental ($h=0.60$ y $\pi=0.26\%$) y este de la India (Sri Lanka, $h=0.72$ y $\pi=2.07\%$; Orissa, $h=0.27$ y $\pi=0.3\%$) a pesar del diferente número de colonias. El análisis de inferencia filogenética, empleando el método de Neighbour – Joining, confirmó el agrupamiento de los haplotipos en dos regiones geográficas (Pacífico oriental y este de la India). Se concluye que la presencia del haplotipo N corrobora la hipótesis del natal homing (es decir, las tortugas regresan a desovar a su lugar de origen) de *L. olivacea* en Playa Palmeras,

con lo cual se pueden definir las unidades de manejo requeridas para la implementación de estrategias de conservación para la especie.

PALABRAS CLAVE: Diversidad haplotípica y nucleotídica, *Lepidochelys olivacea*, ADNmt, Región control (D-loop), Conservación.

ABSTRACT

Genetic characterization of the olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* in Gorgona National Natural Park (Colombian Pacific) from mitochondrial DNA sequences. To genetic characterize the nesting colony of *L. olivacea* in Palmeras beach-Gorgona National Natural Park- and to contribute to the implementation of strategies of conservation for the species, a fragment of the mitochondrial DNA control region (D-loop) was sequenced in 29 individuals for studying the genetic diversity and phylogenetic relationships in comparison with data published in GenBank. The analysis of the sequences revealed the presence of two haplotypes N (96.55%) and E (3.45%), according to the sequences reported for this species. The genetic (h) and nucleotide (π) diversity of the studied colony was $h=0.069$ and $\pi=0.023\%$, these results corroborate that the Testudines presents a low genetic diversity. These values of diversity are low when they were compared with continental populations of *L. olivacea* of the South of Baja California ($h=0.16$ and $\pi=0.06\%$), Eastern Pacific ($h=0.60$ and $\pi=0.26\%$) and east of India (Sri Lanka with $h=0.72$ and $\pi=2.07\%$; Orissa with $h=0.27$ and $\pi=0.3\%$) in spite of different number of colonies. The analyses of phylogenetic inference, using the Neighbour-Joining method, confirm the cluster of the haplotypes in two geographical regions (eastern Pacific and east India). We conclude that the presence of the haplotype N corroborate the hypothesis of natal homing (adult females return to lay eggs in the general region where they were born) of *L. olivacea* in Palmeras beach, this information contribute in the definition of management units required for the implementation of conservation strategies for the species.

KEY WORDS: Haplotipic and nucleotidic diversity, *Lepidochelys olivacea*, DNAmT, Control region (D-loop), Conservation.

INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas son especies con un ámbito de distribución geográfica amplio en el Pacífico oriental que cubre desde la Patagonia hasta Alaska. *Lepidochelys olivacea* (golfina) habita en mares tropicales y subtropicales del planeta, siendo abundante en las costas de los océanos Pacífico, Índico y en el sur del Atlántico (Pritchard, 1979). Las playas colombianas son importantes para la reproducción de esa especie en el Pacífico oriental (Amorocho *et al.*, 1992; Jiménez, 2001). En el Parque Nacional Natural Gorgona (PNNG) la mayor actividad reproductiva se ha registrado entre junio y diciembre (McCormick, 1996), con mayor frecuencia en septiembre (Pavía *et al.*, 2006). También ha sido registrada en el Parque Utría-PNNU- (Chocó) entre agosto y noviembre (Amorocho

et al., 1992, 2001; Jiménez, 2001); en Cabo Corrientes hasta Bahía Solano (Chocó) en febrero (Rueda, 1992); en el Golfo de Cúpica y la desembocadura del río San Juan hasta el río Mira y en el Parque Sanquianga-PNNS- (Nariño) hasta la frontera con el Ecuador (Ceballos-Fonseca *et al.*, 2003).

Las poblaciones de la tortuga golfinia en los últimos años han sido afectadas especialmente por actividades de origen humano, tales como el consumo y la comercialización de huevos, carne, aceite y caparazones, la degradación de su hábitat (Eckert, 2000), la captura incidental por pesca artesanal e industrial (Oravetz, 2000), la contaminación de los mares por hidrocarburos, derivados del petróleo y material no biodegradable (Frazier, 1980; Carr, 1987; Gibson y Smith, 2000; Witherington, 2000). Al final de la década de los ochentas, se estimó que aproximadamente 8321 tortugas marinas eran atrapadas anualmente en redes camaroneras de los barcos arrastreros del Pacífico colombiano (Duque-Goodman, 1988). Actualmente la golfinia se encuentra en peligro (EN), de acuerdo con los listados para especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza - UICN (Groombridge, 1982) y en el Libro Rojo de Reptiles de Colombia (Castaño-Mora, 2002).

En Colombia, la conservación de la tortuga golfinia ha sido orientada al estudio de sus colonias reproductivas (Amorocho *et al.*, 1992), a la protección de las playas que emplean para anidar (Ceballos-Fonseca *et al.*, 2003) y a los hábitos reproductivos (Pavía *et al.*, 2006), más que a la caracterización genética de la especie. Con esa información es posible intentar dilucidar cuáles son las playas de origen de las hembras reproductoras, a qué población corresponden, así como, reconocer esos individuos cuando se mezclan con otros de la misma especie en los hábitats de alimentación (FitzSimmons *et al.*, 2000). Además ayuda a confirmar si se cumple con la teoría del natal homing, es decir, que las tortugas regresan a desovar a su lugar de origen (Lutz y Musick, 1996), lo cual es importante para complementar las estrategias de conservación de la golfinia en el Pacífico oriental.

A nivel mundial, algunos marcadores moleculares se han aplicado para conocer la historia natural y distribución geográfica de las tortugas marinas, tal es el caso de la información obtenida a partir del uso del ADN mitocondrial (ADNmt), la cual ha permitido realizar hipótesis sobre el origen y centro de dispersión de *L. olivacea*. En ese sentido, Bowen *et al.* (1998) intentó dar sustento a la idea de Pritchard (1969) sobre la separación vicariante de las especies *Lepidochelys olivacea* y *Lepidochelys kempii* al emerger el istmo de Panamá, seguido de un reciente evento de dispersión desde el océano Índico hacia el Atlántico. A partir del análisis de 470 pares de bases de la región control (D-loop), ellos caracterizaron cuatro haplotipos en *L. kempii* (A-D) y 12 en *L. olivacea* (E-P), siendo el haplotipo K restringido al Índico y más cercano a los haplotipos de la



especie hermana. Asimismo el análisis de la diversidad genética medida en términos de la diversidad haplotípica mitocondrial, mostró una fuerte estructura poblacional entre las colonias de anidación estudiadas. Resultados similares obtuvieron Shanker *et al.* (2004), los cuales analizaron 400 pares de bases de la región control (D-loop) del ADNmt en 81 muestras de *L. olivacea* en poblaciones de la India y Sri Lanka. Por otra parte, López-Castro y Rocha-Olivares (2005) registraron que el haplotipo N es el más frecuente (91.6%) en el Sur de Baja California (SBC) y que las poblaciones peninsulares de golfinia tienen una diversidad genética baja comparada con las continentales, reflejando una reciente historia evolutiva en esa región y planteando que ambas zonas de anidación son unidades de manejo diferentes.

A nivel nacional, el presente trabajo es pionero en la caracterización genética de la colonia reproductiva de la tortuga marina *L. olivacea* en el PNNG, a partir de un segmento de la región control del ADNmt con el fin de contribuir al conocimiento de su historia natural, y contar con herramientas científicas que permitan definir mejores estrategias para la conservación de esa especie, que actualmente se encuentra en peligro de extinción.

ÁREA DE ESTUDIO

Playa Palmeras se encuentra ubicada en el extremo sur occidental del PNNG, con una extensión total de 1.2 km (Figura 1). El sector sur de la playa presenta rocas aisladas, dificultando probablemente el acceso de las tortugas golfinia para arribar a desovar. Por el contrario, el sector norte es más arenoso y presenta la mayor actividad reproductiva. No presenta problemas de intervención antropogénica (Ceballos-Fonseca *et al.*, 2003), aunque sucesos más recientes en 2005 y 2006 han permitido registrar algunos individuos muertos o afectados por actividades naturales o de origen humano (Pavía *et al.*, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Durante las temporadas reproductivas de 2004 y 2005 (septiembre-diciembre) se colectaron un total de 29 muestras de tejido sanguíneo y/o muscular a nivel del sinus cervical y a 3 mm del hombro, respectivamente. Las muestras fueron almacenadas en buffer de colecta (0.1 M Tris, 0.1 M EDTA, 0.01 M NaCl y 0.5% SDS) y depositadas en el Laboratorio de Biología Molecular y Colección de Tejidos del Instituto Alexander von Humboldt (IAvH).

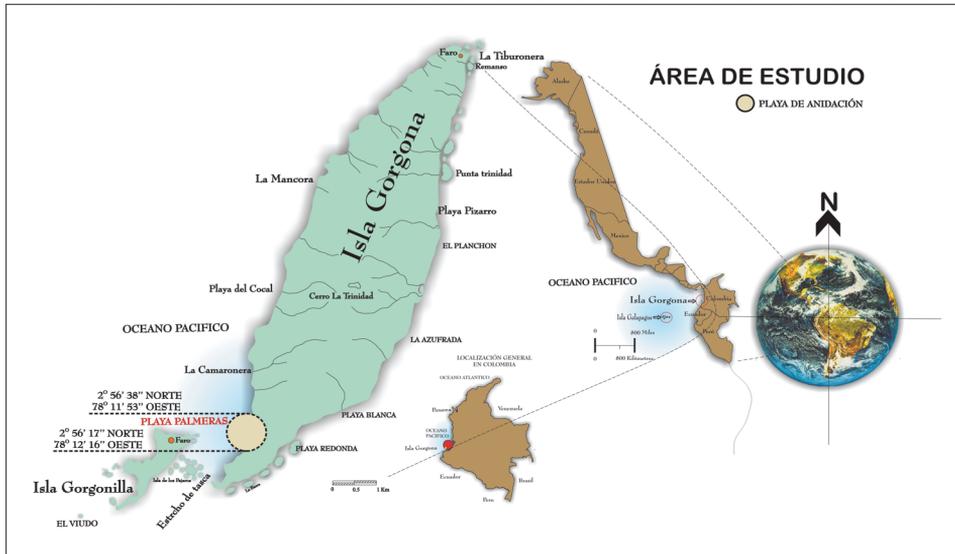


Figura 1. Área de estudio: Playa Palmeras, Parque Nacional Natural Gorgona (Tomado de CIMAD, 2004).

Extracción de ADN, amplificación de PCR y secuenciación

El ADN genómico fue aislado empleando dos protocolos: FitzSimmons *et al.* (1996) para las muestras de tejido sanguíneo y el manual del Kit Qiagen para las de tejido muscular. La región control del ADNmt fue amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores específicos para tortugas: LTCM2 y HDCM2 (Lahanas *et al.*, 1994) entre un ámbito de 500 a 600 pares de bases para seis muestras. Las 23 restantes fueron amplificadas a partir de nuevos cebadores, FDL01 - RDL01 (TTTAATGGGCCTGAAACTGG – TAATTCTCTGCCGTGCACAA) entre 300 a 400 pares de bases, diseñados a partir de las secuencias anteriores, que permitieron mejorar significativamente la calidad del amplificado, lo cual no se logró con los cebadores iniciales.

El volumen de reacción final fue de 25 µl, conteniendo: 50 ng/µl de ADN total, 1U de *Taq* polimerasa (INVITROGEN), 10 µM de cada cebador (IDT), 5mM de dNTP's, 25mM de MgCl₂ y Buffer 10X (KCl 500 mM y 200 mM Tris-HCl pH 8.4). La desnaturalización, hibridación y extensión se realizaron a 94 °C por 20 segundos, a 53 °C por 20 segundos y a 72 °C por 20 segundos, respectivamente, para un total de 35 ciclos; la primera desnaturalización y la última extensión fueron realizadas durante dos minutos (Saiki *et al.*, 1998). Los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y posteriormente fueron purificados con el método de Polietilenglicol (PEG 8000 y NaCl) al 20%, para ser secuenciados por

electroforesis capilar multicolor en un equipo (ABI 310 - 3100) en ambas direcciones usando los mismos cebadores empleados durante el proceso de PCR.

Análisis de las secuencias

Las secuencias fueron editadas y ensambladas usando el programa SEQUENCHER 4.1 y alineadas en CLUSTAL X 1.74 (Thompson *et al.*, 1997), cada cambio de nucleótido encontrado en las secuencias de los individuos fue considerado como un haplotipo diferente. La evaluación del modelo evolutivo se realizó con MODELTEST 3.7 (Posada y Crandall, 1998). Para describir los haplotipos encontrados en el PNNG se compararon las secuencias obtenidas con 14 secuencias para el mismo segmento, registradas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information-NCBI-para diferentes zonas geográficas: Pacífico, Atlántico e Índico (Tabla 1). La diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) se estimaron utilizando el programa ARLEQUIN 2.0

Tabla 1. Descripción de las secuencias de las diferentes especies empleadas del GenBank. En la columna Unidad Taxonómica Operativa/Haplotipo se presenta el código de identificación empleado en los árboles de Neighbour-Joining y Máxima Parsimonia.

Especie	Unidad taxonómica operativa/Haplotipo	Ubicación geográfica	Accesión Genbank	Autor
<i>Lepidochelys olivacea</i>	N (GPC1)	Gorgona, Colombia		Presente trabajo
	E (GPC2)			
	M (SBC)		AY920520	
	N (SBC)		AY920521	López-Castro <i>et al.</i> (2005)
	K (SBC)	Sur Baja California, México	AY920519	
	O (SBC)		AY920523	
	E (SBC)		AY920522	
	NCR	Nancite, Costa Rica	U40661	
	F (OA)	Atlántico	AF051773	Bowen <i>et al.</i> (1998)
	J (IP)	Indo-Pacífico	AF051774	
	K* (SL)	Sri Lanka, India	AF051775	
	N* (EP)	Este Pacífico	AF051776	
	New 1	Madras y Gahirmatha, este India	AF513542	
	New 2	Madras, este India	AF513547	Shanker <i>et al.</i> (2004)
	New 3	Rushikulya, este India	AF513543	
New 4	Gahirmatha, este India	AF513545		
New 5	Gahirmatha, este India	AF513546		
Grupo externo	Ubicación geográfica		Accesión Genbank	Autor
<i>Lepidochelys kempii</i>	Estados Unidos, Atlántico y Golfo de México		U40657	Dutton <i>et al.</i> (en prensa)

(Schneider *et al.*, 2000) y la evaluación de las distancias genéticas (Nei, 1987) basadas en las frecuencias de los haplotipos encontrados, se realizó a partir de comparaciones con las frecuencias reportadas por Bowen *et al.* (1998) y Shanker *et al.* (2004) realizadas con el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2006).

Para verificar las relaciones entre los haplotipos del PNNG con las registradas en el GenBank, se incluyó también una secuencia perteneciente a la especie *L. kempii* como grupo hermano externo. El análisis se realizó con el método Neighbour-Joining (NJ) basado en una matriz de distancia (Saitou y Nei, 1987) soportada en 100 réplicas (tasa de transición/transversión: 2.0; gamma: 0.5) para múltiples datos aleatorios con el fin de registrar los posibles cambios ocurridos entre ellos y 1000 réplicas de remuestreo de la topología o bootstrap. El árbol consenso se obtuvo mediante la regla de la mayoría extendida (MRE). Todos esos análisis se realizaron en el programa filogenético PHYLIP 3.6 (Felsenstein, 1985) y la topología final se visualizó utilizando el software TreeView 1.6.6 (Page, 1996). La descripción de cada una de las Unidades Taxonómicas Operativas (usada como unidad de clasificación, sin importar entidad biológica) en cada uno de los árboles consenso, se encuentra consignada en la Tabla 1.

RESULTADOS

Descripción y diversidad de haplotipos

De las 29 muestras secuenciadas en el presente estudio se obtuvieron dos segmentos de diferente tamaño de la región control del ADNmt, seis de las secuencias con aproximadamente 526 pares de bases y las 23 restantes, con 291 pares de bases. Al realizar los análisis de las secuencias obtenidas para el PNNG versus las registradas en el GenBank, se encontró que al alinear 466 nucleótidos se observaron dos haplotipos diferentes en las secuencias de mayor tamaño. Uno fue similar a los haplotipos N (GenBank AF051776: Bowen *et al.*, 1998) y K (AY920519: López-Castro y Rocha-Olivares, 2005) distribuidos geográficamente para el este del Pacífico y el SBC-México, respectivamente; y otro al haplotipo E (GenBank AY920522, López-Castro y Rocha-Olivares, 2005) también registrado para el SBC-México. Al alinear 300 nucleótidos, las secuencias de menor tamaño obtenidas no mostraron el sitio polimórfico definido para el haplotipo E en el segmento comparado con las secuencias de mayor tamaño. Teniendo como base esos resultados, se asume que tanto las secuencias de 526 y 291 pares de bases diferentes al haplotipo E corresponden al haplotipo N registrado por Bowen *et al.* (1998).

El haplotipo N fue el más abundante en la colonia del PNNG ya que se presentó en 28 individuos y su frecuencia haplotípica fue de 0.9655. El haplotipo E se encontró



en un individuo, con una frecuencia de 0.0345, el cual difiere del anterior por presentar dos sitios polimórficos dados por las transiciones en las posiciones 261 (C-T) y 441 (A-G) de las secuencias obtenidas (Tabla 2). Asimismo, la diversidad haplotípica fue de 0.0690 ± 0.0632 , la diversidad nucleotídica fue de 0.000237 ± 0.0000552 , y la composición de nucleótidos en la secuencia caracterizada en Gorgona fue C = 15.11%, T = 35.06%, A = 38.49% y G = 11.34%. Las homologías presentadas correspondieron al 99.61% y de sitios polimórficos fue del 0.39%.

Tabla 2. 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 están sombreados.

N-GPC1	AATTAACTACCCCTTGGCGCAAAAAGCGCCAACGTATAAACTTACCTTAATCTCTGCC
E-GPC2	AATTAACTACCCCTTGGCGCAAAAAGCGCCAACGTATAAACTTACCTTAAITCTCTGCC *****
N-GPC1	GTGCACAACAGAACAATAGCCATA CTATCTATCTATGTATTATTGTACATCTACTTATTT
E-GPC2	GTGCACAACAGAACAATAGCCATACTATCTATCTATGTATTATTGTACATCTACTTATTT *****
N-GPC1	ACCGTTAGCATATGATCAGTAATATTGTCGATTAATTTGGCTTT AACATAAAAAATTCAT
E-GPC2	ACCGTTAGCATATGATCAGTAATATTGTCGATTAATTTGGCTTTAAACATAAAAAATTCAT *****
N-GPC1	TAATTTTACATAAACTGTTTTACCAAATGAATATTATAAAGATGATAAATAGTGAATGA
E-GPC2	TAATTTTACATAAACTGTTTTACCAAATGAATATTATAAAGATGATAAATAGTGAATGA *****
N-GPC1	TATAGGACATAAAATTAAC CATTATTCTCGACCATGAATATCGTCCACAGTAATTGGTTA
E-GPC2	TATAGGACATAAAATTA AAC TATTATTCTCGACCATGAATATCGTCCACAGTAATTGGTTA *****
N-GPC1	TTTCTTAGTTCAACTCATCAGAGAAATAAGCAATCCTTGTTAACAAGATACAACATTAC
E-GPC2	TTTCTTAGTTCAACTCATCAGAGAAATAAGCAATC CTGTGTTAACAAGATACAACATTAC *****
N-GPC1	CAGTTTCAGGCCATTAAACTACGACGTACATAACTGATCTATTCTCGCCCTTGTTGTT
E-GPC2	CAGTTTCAGGCCATTAAACTACGACGTACATAACTGATCTATTCTCGCCCTTGTTGTT *****
N-GPC1	TTTTCAGGCACATTAAGGTA ATGAAGTTCATTCTCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGC
E-GPC2	TTTTCAGGCACATTAAGGTA GTGAAGTTCATTCTCTCTTTAAAAGGCCCTTGGTTGC *****
N-GPC1	ACGATAAATGAGTTCTATACATTGAATTTA
E-GPC2	ACGATAAATGAGTTCTATACATTGAATTTA *

Estructura y distancias genéticas

Con base en las frecuencias haplotípicas encontradas en el presente estudio, se realizó una comparación con las distancias genéticas registradas en las colonias de anidación estudiadas por Bowen *et al.* (1998) y Shanker *et al.* (2004). Para esto se efectuó un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) en el cual se encontró que la variación

entre colonias de anidación fue del 62.07% y un índice de fijación de subestructuración poblacional o F_{ST} de 0.62072. El análisis también destacó el hecho que la colonia de anidación que evaluaron Bowen *et al.* (1998) en Costa Rica presenta cercanía desde el punto de vista genético con el PNNG, lo cual se evidenció con el bajo valor de distancia genética (0.40) y el alto valor del estimado de migración interpoblacional ($N_m = 0.754$) encontrados. En contraste, el cálculo de los mismos estimados, al comparar el PNNG con la colonia de anidación en Brasil (Bowen *et al.*, 1998), mostraron una distancia genética de 0.95 y un N_m de 0.024 (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las parejas de distancias genéticas (F_{ST}) y el estimador de migración interpoblacional (N_m) a partir de frecuencias de haplotipos de la región control del ADNmt, entre PNNG y 12 colonias de anidación de *Lepidochelys olivacea*. Se señalan en negrita los valores máximos y mínimos.

Colonia de anidación	Distancias genéticas (F_{ST})	Estimado de migración interpoblacional (N_m)
Surinam	0.86	0.081
Brasil	0.95	0.024
Guinea	0.94	0.032
Sri Lanka	0.67	0.250
Malasia	0.94	0.031
Australia	0.82	0.113
Costa Rica	0.40	0.754
Gahirmatha-offshore	0.87	0.076
Gahirmatha-nesting	0.81	0.114
Devi Mouth	0.90	0.053
Rushikulya	0.86	0.078
Madras	0.81	0.114

Inferencia filogenética

Al analizar el árbol consenso obtenido a partir del método de Neighbour-Joining (NJ) 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 encontró que las 18 secuencias comparadas que incluyen haplotipos del PNNG y del GenBank, formaron tres grupos claramente diferenciados (Figura 2). Los códigos de las unidades taxonómicas operativas presentadas en el árbol se señalan en la Tabla 1.

En el Grupo 1 con bootstrap del 97% se encuentran los haplotipos de *L. olivacea* registrados para el Pacífico oriental (SBC y Costa Rica) e incluye los haplotipos caracterizados para el PNNG (N y E). Se observó una estrecha relación entre los haplotipos E (SBC) (López-Castro y Rocha-Olivares, 2005) y E (GPC2), soportados con 81% de bootstrap indicando que comparten los mismos cambios en la secuencia. El haplotipo N presente en la secuencia del este del Pacífico (EP) y en Gorgona (GPC1) se

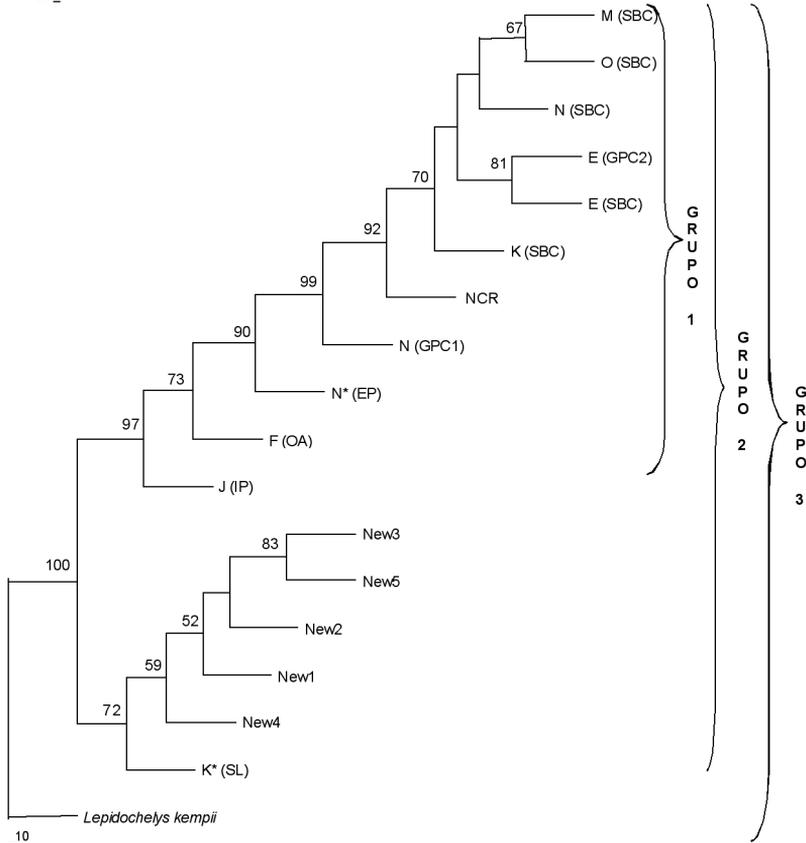


Figura 2. Árbol consenso estricto obtenido bajo el método de distancia Neighbour Joining. Sobre cada rama se muestra el valor del soporte bootstrap mayor al 50%.

encuentra relacionado con los haplotipos del SBC (K, M, N, O y E), hecho soportado en el 90% de remuestreos a partir de EP y en el 99% a partir de GPC1. En ese grupo también se observó la agrupación de los haplotipos J (Indo-Pacífico) y F (Atlántico) soportada con bootstrap de 97%.

El Grupo 2 está compuesto por el grupo del Pacífico oriental y el del este de la India, soportado con 100 de bootstrap, el cual está conformado por seis haplotipos de *L. olivacea* distribuidos en cuatro localidades diferentes: Gahirmatha, Madras, Rushikulya y Sri Lanka (Shanker *et al.*, 2004). El Grupo 3 muestra la estrecha relación de las especies hermanas *L. kempii* y *L. olivacea* y da sustento a los resultados obtenidos por Bowen *et al.* (1998), en el sentido que las poblaciones de *L. olivacea* del este de la India (representadas con el haplotipo K) están más cercanas a las poblaciones de *L. kempii*.

DISCUSIÓN

Diversidad, estructura y distancia genética en la colonia de *L. olivacea* del PNNG

Las secuencias de la región control caracterizadas en el presente estudio mostraron niveles altos de A y T (>30%) y bajos de G y C (<15%) similares a los encontrados en *Chelonia mydas* (Lahanas *et al.*, 1994), con lo cual se confirma lo planteado por Saccone *et al.* (1987), quienes afirman que las secuencias de la región control en vertebrados son deficientes en G y C. Los bajos valores obtenidos a partir de la diversidad haplotípica ($h=0.069$) y diversidad nucleotídica ($\pi=0.023$ %) encontrados en la colonia reproductiva de *L. olivacea* en el PNNG son explicados, en parte, por la baja diversidad exhibida en el grupo de los Testudines (Awise *et al.*, 1992; Bowen y Awise, 1995) y por el tipo de anidación solitaria (ya que se reduce el tamaño efectivo de la población por el número bajo de hembras anidantes), similar a lo encontrado por López-Castro y Rocha-Olivares (2005) en las colonias peninsulares del SBC. Así mismo, los valores encontrados en el PNNG son incluso más bajos con respecto a Costa Rica ($h=0.76$ y $\pi=0.29$ %), al SBC ($h=0.16$ y $\pi=0.06$ %) y otras poblaciones continentales del Pacífico oriental ($h=0.60$ y $\pi=0.26$ %) (López-Castro y Rocha-Olivares, 2005), en Sri Lanka ($h=0.72$ y $\pi=2.07$ %) y Orissa ($h=0.27$ y $\pi=0.3$ %) al este de la India (Shanker *et al.*, 2004).

La predominancia del haplotipo N en PNNG se puede explicar por algunos factores, tales como: i) el modo de replicación del ADNmt en células germinales difiere del modo en que lo hace el ADN nuclear, no siendo necesariamente coincidentes con el proceso de división celular (Rabinowitz y Swift, 1970); ii) el hecho en que los mecanismos de replicación de esa molécula en tortugas involucre enzimas más eficientes para la corrección de errores durante o posterior a ese proceso, la longevidad de la mayoría de las tortugas y su baja tasa metabólica, probablemente podrían tener ingerencia en la generación de menos errores mutacionales durante la replicación del ADN en las líneas germinales (Awise *et al.*, 1992), lo que permite suponer que, con una elevada frecuencia se presentará un mismo haplotipo; y iii) un efecto de cuello de botella reciente en esa colonia reproductiva, aproximadamente hace 25 años, debido a la captura indiscriminada en aguas cercanas a Gorgona registrada en los años setentas y ochentas, que aproximadamente oscilaba entre 50-60 tortugas/día (Aguíño com. per. 2006), reduciendo potencialmente la diversidad haplotípica dejando como consecuencia la fijación de un haplotipo.

De acuerdo con lo anterior, la colonia que anida en el PNNG presentó el haplotipo N durante dos temporadas reproductivas, cumpliendo posiblemente 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 (Lutz y Musick, 1996). El presente estudio destaca también que durante la temporada de anidación 2004 se presentó en un neonato la aparición del haplotipo E, lo cual es explicado por las posibles visitas de hembras a las áreas de alimentación del PNNG, dada por la oferta de arrecifes coralinos; las condiciones favorables de las playas para la anidación (Ceballos-Fonseca, 2003; Pavía *et al.*, 2006) o la presencia al azar de la hembra por desorientación. A partir de lo anterior se esperaría la repetibilidad del haplotipo E en futuras generaciones.

De acuerdo con Bowen *et al.* (1998) el análisis AMOVA realizado entre las colonias de anidación indicó una fuerte estructuración poblacional. El valor de F_{ST} sustenta que tanto la colonia del PNNG como las demás colonias de anidación comparadas de *L. olivacea*, son unidades genéticamente independientes, ya que el valor de $F_{ST} > 0.25$ (Hartl y Clark, 1997) es indicativo de diferenciación poblacional en términos de estructura genética. Pese a que la diversidad genética en las secuencias analizadas del PNNG fue baja, la elevada estructuración sustentada en el N_m de 0.754 y la distancia genética de 0.40 permitiría verificar que el flujo génico hacia o desde esa colonia de anidación, se estaría realizando a partir de la colonia presente en Costa Rica. Sin embargo, el aporte de secuencias dado por migración, también se puede estar realizando a partir de otras colonias de anidación en el Pacífico oriental.

Comentarios acerca de la biogeografía del género *Lepidochelys*

Según Bowen *et al.* (1998) el haplotipo más divergente (K) de *L. olivacea* es observado en el oeste del Indo-Pacífico, considerando esa región como el origen más reciente de la radiación de los linajes de esa especie. En el Grupo 2 (Figura 2) se presenta claramente una separación de los haplotipos de la India con respecto a los del Pacífico oriental y, de acuerdo con esos autores, se corrobora que las poblaciones de golfina presentes en cada región son diferentes haplotípicamente, hecho también sustentado en el alto índice de fijación de estructuración subpoblacional hallado por Bowen *et al.* (1998) ($F_{ST} = 0.586$) y confirmado en el presente estudio ($F_{ST} = 0.621$).

En el Grupo 3 se observa la agrupación haplotípica de las especies del género *Lepidochelys*, corroborando según lo descrito por Bowen *et al.* (1998) que las especies *L. kempii* del Atlántico y *L. olivacea* del Pacífico son diferentes. El presente trabajo aporta a la diversidad haplotípica del Pacífico oriental (Grupo 1) y complementa en parte los argumentos del modelo biogeográfico del género *Lepidochelys*, el cual postula: i) una separación vicariante entre las dos especies de *Lepidochelys*, al emerger el istmo de Panamá y ii) un reciente evento de dispersión de *L. olivacea* desde el Indico y algunas regiones del Pacífico occidental hacia el Atlántico (vía cabo de Buena Esperanza), quedando la tortuga *L. kempii* restringida al Golfo de México (Pritchard, 1969; Hughes,

1972). Vale la pena aclarar que los resultados son derivados de la información disponible en el GenBank para otras playas de anidación de *L. olivacea* en el mundo, y de acuerdo con Bowen *et al.* (1998) se confirma que aún existen grandes colonias del Pacífico oriental que no se han caracterizado en su totalidad.

Implicaciones para la genética de la conservación

Lepidochelys olivacea es considerada una de las especies de tortugas marinas más numerosa en el mundo (Lutz y Musick, 1996), la cual es susceptible a la explotación humana debido a los cientos de huevos dejados en las playas de anidación y, además, se cree que su elevada capacidad reproductiva le permite soportar altas tasas de mortalidad (Bowen y Avise, 1995; Frazier, 1999). Por esto los bajos valores de diversidad obtenidos a partir del análisis genético realizado ayudarían a implementar estrategias dirigidas a la conservación de la especie a largo plazo, permitiendo aumentar la población reproductiva y la variabilidad en tiempo y espacio; 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 (López-Castro y Rocha-Olivares, 2005) con los encontrados en el PNNG se puede pensar en la presencia de un flujo genético entre esas zonas, tal como se evidenció en las comparaciones de frecuencias realizadas con la colonia de anidación de Costa Rica (Tabla 3) estudiada por Bowen *et al.* (1998). Sin embargo, la falta de información genética adicional de algunas colonias del sur y del centro del Pacífico oriental no ha permitido definir las unidades de manejo para *L. olivacea*.

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

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero, técnico y logístico brindado durante el desarrollo del proyecto por parte del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives de Andrés”-Invemar, el Laboratorio de Biología Molecular y Colección de Tejidos del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”-IAvH-, el Centro de Investigación para el Manejo Ambiental y el



Desarrollo-CIMAD-, Conservación Internacional-CI- Colombia y Universidad del Cauca. A la Unidad de Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT-. Al Dr. Jason Rausher y al equipo de investigación en campo y en laboratorio, por su constante colaboración y aportes valiosos durante el desarrollo de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Amoroch, D., H. Rubio y W. Díaz. 1992. Observaciones sobre el estado actual de las tortugas marinas en el Pacífico colombiano. 155-179. En: Rodríguez, J. y H. Sánchez (Eds.). Contribución al conocimiento de las tortugas marinas de Colombia. Univ. Nacional de Colombia, Bogotá. 35 p.
- Amoroch, D., F. Sánchez y D. Quiroga. 2001. El encanto de las tortugas marinas en el Parque Nacional Natural Gorgona. 141-148. En: Barrios, L. y M. López-Victoria (Eds.). Gorgona marina: contribución al conocimiento de una isla única. INVEMAR, Santa Marta. 160 p.
- Avise, J., B. Bowen, T. Lamb, A. Meylan y E. Bermingham. 1992. Mitochondrial DNA evolution at a Turtle's Pace: Evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the testudines. *Mol. Biol. Evol.*, 9 (3): 457-473.
- Bowen, W. y J. Avise. 1995. Conservation genetics of marine turtles. 190-237. En: Avise, J. y J. Hamrick (Eds.). Conservation genetics: Case histories from nature. Columbia Univ. Press, Nueva York. 56 p.
- Bowen, B., A. Clark, F. Abreu-Grobois, A. Chaves, H. Reichart y R. Ferl. 1998. Global phylogeography of the ridley turtles (*Lepidochelys* spp.) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genética*, 101: 179-189.
- Carr, A. 1987. New perspectives of the pelagic stage of sea turtle development. *Cons. Biol.*, 1 (2): 103-121.
- Castaño-Mora, O. 2002. Libro rojo de reptiles de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional-Colombia, Bogotá. 129 p.
- 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, INVEMAR, Santa Marta. 78 p.
- 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 sample for sea turtle genetic studies. 17-18. En: Bowen, W. y W. Witzell (Eds.). Proceedings of the International Symposium of sea turtle conservation genetic. NOAA Technical memorandum NMFF-SEFFC-396. 173 p.
- Dutton, P., F. David, T. Guerra y D. Owens (en prensa). Direct submissions. *Journal Biology*. Submitted 12/11/1995. Texas University. TX78843. Texas.
- Eckert, K. 2000. Diseño de un programa de conservación. 6 - 8. 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, México. 278 p.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2006. ARLEQUIN. An integrated software package for population genetics data analysis, version 3.1. University of Berne, Gland, Switzerland. 35 p.

- Felsenstein, J. 1985. PHYLIP. The phylogeny inference package, versión 3.5. Amer. Natur., 125: 1–15.
- FitzSimmons, N., C. Moritz, C. Limpus, J. Miller, C. Parmenter y R. Prince. 1996. Comparative genetic structure of green, loggerhead, and flatback populations in Australia based on variable mtDNA and nDNA regions. 2-25. En: Bowen, B. y W. Witzell (Eds.). Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics. NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-396, Washington. 173 p.
- FitzSimmons, N., C. Moritz y B. Bowen. 2000. Identificación de poblaciones. 83 – 89. 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, Washington. 278 p.
- Frazier, J. 1980. Marine turtles and problems in coastal management. 2395-2411. En: Amer. Soc. Civ. Eng. (Ed.). Coastal zone 80. Proceedings of the second symposium on coastal and ocean management, Nueva York. 3120 p.
- Frazier, J. 1999. Generalidades de la historia de vida de las tortugas marinas. 3-16. En: Bowen, B. y W. Witzell (Eds.). Conservación de tortugas marinas en la región del Gran Caribe – Un diálogo para el manejo regional efectivo. Sinauer Associates, Santo Domingo. Sesión I: 24 p.
- Gibson, J. y G. Smith. 2000. Reducción de las amenazas a los hábitats de alimentación. 211-216. 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, México. 278 p.
- Groombridge, B. 1982. The IUCN Amphibia–Reptilia Red Data Book, Part 1. Olive ridley. 209-223. En: Internacional Union for the Conservation of Nature and Natural resources (IUCN). Gland, Switzerland. 426 p.
- Hart, D. y A. Clark. 1997. Molecular population genetics. 315-392. En: Avise, J. y J. Hamrick (Eds.). Principles of population genetics. Sinauer Associates, Massachusetts. 423 p.
- Hasegawa, M., Y. Iida, T. Yano, F. Takaiwa y M. Iwabuchi. 1985. Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. J. Mol. Evol., 22: 32-38.
- Hughes, G. 1972. The olive ridley sea-turtle (*Lepidochelys olivacea*) in South-east Africa. Biol. Cons., 4: 128-134.
- Jiménez, L. 2001. Programa de conservación de las tortugas marinas en el Parque Nacional Natural Sanquianga. 54-56. En: Comisión Permanente del Pacífico Sur – CPPS. Bogotá. 85 p.
- Lahanas, P., M. Miyamoto, K. Bjorndal y A. Bolten. 1994. Molecular evolution and population genetics of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. Genética, 94: 57-67.
- López-Castro, M. y 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. y J. Musick. 1996. The biology of sea turtles. CRC Press, Washington. 170 p.
- McCormick, C. 1996. Contribución al conocimiento de la ecología y biología reproductiva de las tortugas marinas en la Isla Gorgona. Tesis Biol., Universidad del Valle, Cali. 91 p.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, Nueva York. 456 p.

- Oravetz, C. 2000. Reducción de la captura incidental en pesquerías. 6 – 8. 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, México. 278 p.
- Page, R. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Applic. Biosc.*, 12: 357-358.
- Pavía, A., J. Rodríguez-Zuluaga y D. Amorocho. 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. 34 p.
- Posada, D. y K. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817-818.
- Pritchard, P. 1969. Studies of the systematics and reproductive cycles of the genus *Lepidochelys*. Tesis Biol., University of Florida, Gainesville. 254 p.
- Pritchard, P. 1979. Encyclopedia of turtles. Sea turtles, Chapter 9. England Publications, Londres. 389 p.
- Rabinowitz, M. y H. Swift. 1970. Mitochondrial nucleic acids and their relation to the biogenesis of mitochondria. *Physiol. Rev.*, 50: 376-427.
- Rueda, J. 1992. Anotaciones sobre un caso de mortalidad masiva de tortugas marinas en la costa pacífica de Colombia. 181-190. En: Contribución al conocimiento de las tortugas marinas de Colombia. Libro 4. Inderena, Bogotá. 235 p.
- Saconne, C., M. Attimonelli y E. Sbisá. 1987. Structural elements highly preserved during the evolution of the d-loop- containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 26: 205-211.
- Saiki, R., K., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mulis y H. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Grand.
- Shanker, K., J. Ramadevi, B. Choudhury, L. Singh y R. Aggarwal. 2004. Phylogeography of olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) on the east coast of India: implications for conservation theory. *Mol. Ecol.*, 13: 1899-1909.
- Su, H., L. Qu, K. He, Z. Zhang, J. Wang, Z. Chen y H. Gu. 2003. The great wall of China: a physical barrier of gene flow? *Heredity*, 90 (3): 212-219.
- Thompson, J., T. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. Higgins. 1997. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids. Res.*, 25: 4876-4882.
- Witherington, B. 2000. Reducción de las amenazas al hábitat de anidación. 204-210. 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, México. 278 p.

FECHA DE RECEPCIÓN: 22/10/06

FECHA DE ACEPTACIÓN: 10/04/08