

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROFUNDIZACIÓN GENÉTICA

Tesina de Grado

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS TORTUGAS
CABEZONAS (*Caretta caretta*) QUE VARAN A LO LARGO DE LA
COSTA URUGUAYA**



Juan Manuel Cardozo Balmelli

Orientadora: Dra. Susana González

Co-orientadora: Msc. Ma. Noel Caraccio

Departamento de Genética, Laboratorio de Genética de la Conservación.

IIBCE – Facultad de Ciencias-UdelaR

Mayo 2013
Montevideo – Uruguay

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Susana González por aceptarme en su laboratorio y darme todo su apoyo desde un principio en mis proyectos e ideas, demostrando siempre una gran calidez humana.

A mi co-tutora Ma. Noel Caraccio por introducirme en el mundo de la genética en tortugas marinas y guiarme en mis primeros pasos como investigador, siempre desde la buena onda.

A mis compañeras de laboratorio y a los "Humanos" por aguantar las mil y una preguntas, siempre con muy buena disposición a ayudarme. Soy afortunado de ser parte de este grupo de buena gente, que hace del laboratorio un ambiente de trabajo divertido y comprometido con lo que hacemos.

A Karumbé por abrirme las puertas desde un principio y contagiarme el entusiasmo por conservar a las tortugas marinas y la fauna marina en general. Agradezco especialmente la confianza depositada al brindarme acceso a las muestras de varamientos de tortugas cabezonas colectadas a lo largo de 13 años de trabajo.

A Alejandro Márquez por sus interesantes aportes a lo largo del desarrollo de la investigación, su gran ayuda en aspectos técnicos y también sus acertados consejos.

A Graciela García por formar parte del tribunal corrector.

A mis padres, mis hermanos y la abuela, y al resto de mi familia, por alentarme desde siempre a hacer lo que me hace feliz y enseñarme a recorrer el camino con alegría. Soy lo que soy y llegué hasta acá gracias a su amor. Esta meta alcanzada va dedicada a ustedes!

A todos aquellos que desde más cerca o más lejos formaron parte de esta etapa, pero especialmente a:

Yayi por tantos años de linda amistad y vida cotidiana compartida, Barbi, Elo (concubinato, la vida misma) y Gonza

Lu por el tiempo que juntos compartimos, el aprendizaje y los lindos recuerdos

La barrita de ciencia viva, Sole, Flor, Feli, Nati chica y Joha, por hacer que trabajar los fines de semana fuera divertido, incluso con un enterito naranja!

Nati y Rafa por todas las veces que nos matamos de risa!

Mauri, Alf y Mari, por tantos momentos vividos juntos, Salú!

La barra de ciencias, Vice, Valen, Romi, Rafa Ruíz, Fola, Marce, Vicky, Fran, Caio, Vickyginia y Mai, por hacer que la carrera fuera un disfrute. Agradecido de encontrar tan linda gente en el camino.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	7
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Tortugas marinas en Uruguay	16
1.2. Características generales de <i>Caretta caretta</i>	11
1.2.1. Ciclo de Vida	13
1.2.2. Las aguas uruguayas como importante hábitat de desarrollo	15
1.3. Estado de Conservación	15
1.3.1. Amenazas para la especie	17
1.4. Herramientas para la conservación de tortugas marinas.....	19
1.4.1. La genética aplicada a la conservación de las tortugas marinas.....	21
1.4.2. Análisis genéticos previos para <i>Caretta caretta</i> en Uruguay	23
1.5. Factores que influyen en la composición de un stock mixto	24
1.6. Justificación de la investigación.....	26
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
2.1. Hipótesis.....	27
2.2. Objetivo general	27
2.3. Objetivos específicos	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Área de estudio.....	28
3.2. Muestras utilizadas en el presente estudio	28
3.3. Extracción de ADN y Amplificación de la secuencia de interés	31
3.3.1. Análisis de las secuencias del ADN mitocondrial.....	33
3.3.2. Análisis filogenético	34
3.3.3. Correspondencia geográfica de los haplotipos encontrados en playas uruguayas ..	35
4. RESULTADOS	36

4.1. Análisis de las secuencias.....	36
4.2. Variabilidad haplotípica	37
4.3. Origen geográfico de los individuos muestreados	41
5. DISCUSIÓN	44
5.1. Variabilidad haplotípica y nucleotídica.....	44
5.2. Origen geográfico de los individuos	46
5.2.1. La corriente cálida del Brasil como factor estructurador del stock mixto.....	47
5.2.2. Las aguas uruguayas como área de alimentación relevante para colonias anidadoras lejanas	49
5.2.4. Inferencias acerca del origen geográfico de los nuevos haplotipos.....	42
6. IMPLICANCIAS PARA LA CONSERVACIÓN	50
6.1. Impacto de las pesquerías industriales.....	50
6.2. Stocks genéticos como Unidades de Manejo.....	50
6.3. Fortalecimiento de la Unidad Regional de Manejo propuesta para la región ASO	51
6.4. Fortalecimiento y evaluación de áreas marítimo-costeras protegidas	51
7. CONCLUSIONES	53
8. PERSPECTIVAS.....	54
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO I	65
ANEXO II.....	66

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Estimación de la divergencia evolutiva entre secuencias. Se muestra el número de diferencias nucleotídicas entre las secuencias. Las mismas se encuentran agrupadas según el número de diferencias entre sí; en colores se detalla a que haplotipo pertenecen los agrupamientos. Análisis evolutivo realizado con MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011).....**37**

Figura 1. Individuo juvenil de tortuga cabezona. Pueden observarse características típicas de la especie como el gran tamaño del cráneo en relación al cuerpo (en comparación con el resto de las especies de tortugas marinas) y su caparazón de color café-rojizo (Foto cedida por Karumbé).....**11**

Figura 2. Distribución geográfica de la tortuga Cabezona. En azul oscuro se observa su amplia distribución, lo que la convierte en una especie cosmopolita (Tomada de Caraccio 2008).....**12**

Figura 3. Esquema general del ciclo de vida de las tortugas marinas (modificado de Miller 1997).....**14**

Figura 4. Mapa donde se observa la distribución de capturas incidentales de *Caretta caretta* en la pesquería de palangre pelágico correspondiente a barcos uruguayos y brasileros en el período comprendido entre abril de 1988 a octubre de 2004. Puede notarse la alta concentración de capturas incidentales en aguas uruguayas (Tomado de Domingo *et al.* 2006).....**17**

Figura 5. Distribución de las “RMU” propuestas para la tortuga cabezona en todos los océanos del planeta. Puede observarse que las aguas uruguayas forman parte de la única RMU propuesta para el Atlántico Sud-Occidental. (Tomado de Wallace *et al.* 2010).....**22**

Figura 6. Modelo que ilustra la estructuración poblacional en los tres estadios del ciclo de vida de las tortugas marinas. Las tortugas se originan en tres colonias de anidación (áreas de reproducción y playas de anidación) indicadas por los colores negro, rojo y verde (Tomado de Bowen *et al.* 2005).....**23**

Figura 7. Mapa de la costa uruguaya donde se detallan las áreas protegidas costeras de Uruguay. En azul se representan las áreas que pertenecen al SNAP, en amarillo las que están en proceso de ingreso y en verde las propuestas para formar parte (Sistema de información ambiental, DINAMA; Vélez Rubio 2011).....**27**

Figura 8. Se esquematiza el tamaño y ubicación de la secuencia a amplificar dentro de la región control del ADN mitocondrial, así como el sitio donde se adhieren los primers utilizados (Tomado de Abreu-Grobois *et al.* 2006).....**30**

Figura 9. Distribución de las principales colonias de anidación de la tortuga cabezona en el Mar Mediterráneo y los Océanos Atlántico, Índico, y Pacífico Sur (círculos grises) (Tomado de Caraccio *et al.* 2008).....**34**

Figura 10. Relación evolutiva de los haplotipos inferida a través del método de Unión de Vecinos. El árbol consenso de *bootstrap*, obtenido a partir de 1000 replicas, fue usado para representar la relación evolutiva entre los haplotipos encontrados. El porcentaje de árboles (replicados en la prueba de *bootstrap*) en el que se muestran los haplotipos asociados, se muestra al lado de las ramas. Aquellas asociaciones de haplotipos que no superan el 50 % de replicaciones en la prueba de *bootstrap* no fueron consideradas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama expresadas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferirlo. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el parámetro Kimura 2 del método Unión de Vecinos y se encuentran expresadas como el número de sustituciones de bases por sitio. Todas las posiciones ambiguas fueron removidas para cada par de secuencias. Análisis evolutivo realizado con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011).....**38**

Figura 11. Red de haplotipos. Cada haplotipo se representa con un color diferente y el área de los círculos es proporcional a su frecuencia. Los números muestran la posición donde se encuentran los cambios en los pares de bases (sitios polimórficos) que diferencian a los haplotipos. El diagrama fue construido con el programa Network 4.2.....**39**

Figura 12. Principales corrientes marinas del Océano Atlántico. En rojo se detallan las corrientes de agua cálida y en azul las de agua fría. Las aguas de la región (señaladas con una línea punteada) se encuentran caracterizadas por la interacción entre la corriente cálida del Brasil y la corriente fría de las Malvinas, las cuales colisionan conformando un frente marítimo que da lugar a una alta productividad orgánica.....**44**

Figura 13. Relación evolutiva de los haplotipos inferida a través del método de Unión de Vecinos. El árbol consenso de *bootstrap*, obtenido a partir de 1000 replicas, fue usado para representar la relación evolutiva entre los haplotipos encontrados. El porcentaje de árboles (replicados en la prueba de *bootstrap*) en el que se muestran los haplotipos asociados, se muestra al lado de las ramas. Aquellas asociaciones de haplotipos que no superan el 50 % de replicaciones en la prueba de *bootstrap* no fueron consideradas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama expresadas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferirlo. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el parámetro Kimura 2 del método Unión de Vecinos y se encuentran expresadas como el número de sustituciones de bases por sitio. Todas las posiciones ambiguas fueron removidas para cada par de secuencias. Análisis evolutivo realizado con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011).....**46**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Se detalla información de las muestras utilizadas como la fecha de colecta y su ubicación en la costa uruguaya.....**29**

Tabla 2. Se detallan los haplotipos encontrados a partir del análisis de las secuencias, su frecuencia en la muestra y su respectivo origen geográfico.....**36**

RESUMEN

Las tortugas marinas son componentes de gran importancia ecológica para los ecosistemas costero-marítimos, cumpliendo diversos roles en las comunidades y ocupando nichos ecológicos únicos. El carácter migratorio de estas especies sumado a una compleja estructura poblacional y una maduración reproductiva tardía, convierten a las tortugas marinas en especies especialmente vulnerables a amenazas de origen antropogénico.

La tortuga cabezona (*Caretta caretta*) utiliza las aguas uruguayas como área de alimentación y desarrollo durante todo el año y la principal amenaza en nuestras aguas es la captura incidental por parte de las pesquerías industriales.

Esta investigación se planteó caracterizar genéticamente una muestra de tortugas cabezonas varadas en la costa uruguaya utilizando una secuencia de 748 pb de la región control (*Dloop*) del ADN mitocondrial.

Se caracterizaron 6 haplotipos en 25 individuos, de los cuales el 52 % fueron juveniles o subadultos. La variabilidad haplotípica hallada ($H=0.648 \pm 0.100$) fue mayor a la reportada en estudios precedentes para la especie en aguas uruguayas y se identificaron tres nuevos haplotipos para la especie. Los haplotipos más frecuentes de la muestra, el CC-A4.1 (16 %) y el CC-A4.2 (60 %) provienen exclusivamente de las costas brasileras, mientras que un único individuo presentó el haplotipo CC-A2.1, caracterizado en playas de anidación del Mar Mediterráneo. Con respecto a los haplotipos nuevos, es posible que dos de ellos pertenezcan a playas de anidación exclusivamente brasileras, mientras que el otro probablemente provenga de las costas del Pacífico Sud Occidental.

Los resultados obtenidos comprueban que existe una coherencia en la composición haplotípica del stock mixto que habita aguas uruguayas, donde el patrón de diversidad genética observado en individuos varados es similar al reportado para individuos capturados incidentalmente en las pesquerías industriales. La alta predominancia de individuos juveniles y sub-adultos provenientes de playas de anidación exclusivamente brasileras, así como la presencia de algunos individuos de playas de anidación más lejanas; convierten a las aguas de la región ASO (Atlántico SudOccidental) en un área de gran importancia para las poblaciones de tortuga cabezona a nivel regional y global.

1. INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas son componentes singulares de sistemas ecológicos complejos que ocupan nichos ecológicos únicos, cumpliendo el rol de consumidores, presa, competidores, hospederos de parásitos, sustrato y vehículo de epibiontes, así como también, transportadores de nutrientes (Hendrickson 1980; Bjorndal & Bolten 2003; Wilson *et al.* 2010). Debido a esta diversidad de roles, estos reptiles pertenecientes a la megafauna marina, estructuran la comunidad del ecosistema costero-marino, lo que les confiere un importante valor ecológico y económico (Bjorndal & Jackson 2003; Troëng & Drews 2004; Heithaus *et al.* 2008). En este sentido, se interrelaciona con recursos comerciales explotables (incluyendo peces y moluscos); así como también, con “servicios ecosistémicos”, como la estabilización de áreas costeras (Bjorndal & Bolten 2003; Campbell 2003; Wilson *et al.* 2010). Las tortugas marinas comparten, en su mayoría, un ciclo de vida complejo, el cual se caracteriza por largos tiempos generacionales, maduración reproductiva tardía, y extensas migraciones entre áreas de alimentación, áreas de reproducción y áreas de cría (McClellan & Read 2007). A su vez, la estructura poblacional también es compleja, observándose solapamiento geográfico, donde poblaciones demográficamente independientes se mezclan en áreas de alimentación o durante las migraciones; y dispersión mediada por un solo sexo, donde el flujo génico entre poblaciones ocurre generalmente a través de los machos (Bowen *et al.* 2005; Bowen & Karl 2007). Estas características, convierten a las tortugas marinas en especies altamente vulnerables a factores como: pérdida y degradación del hábitat (debido a contaminación, desarrollo costero y cambio climático acelerado) y captura incidental en pesquerías industriales (Jackson *et al.* 2001; Tomás *et al.* 2008; Wallace *et al.* 2008; Hawkes *et al.* 2009). El importante impacto que las amenazas de origen antropogénico causan en las

poblaciones de tortugas marinas, sumado a su relevancia como estructuradores de la comunidad marina (Bjorndal & Bolten 2003; Herithaus *et al.* 2008), convierte a estas especies en indicadores de la salud de los ambientes costeros y marinos tanto a escala local como global (Bjorndal & Jackson 2003; Andreani *et al.* 2008; Wilson *et al.* 2010).

A su vez, las tortugas marinas son especies carismáticas que forman parte del entramado cultural de muchas regiones costeras y a nivel mundial son consideradas especies “bandera” de la conservación en relación al valor cultural que poseen, atrayendo atención y soporte para programas de conservación de diversa índole (Frazier 2005).

1.1. Características generales de *Caretta caretta*

La tortuga cabezona (*Caretta caretta*) (perteneciente a la familia Cheloniidae, orden Testudines, clase Reptilia) es una de las cinco especies de tortugas marinas que se encuentran en aguas uruguayas. Esta tortuga presenta un caparazón de color café rojizo y su cabeza es proporcionalmente mayor al resto del cuerpo, lo que da origen a su nombre común (Figura 1).



Figura 1. Individuo juvenil de tortuga cabezona. Pueden observarse características típicas de la especie como el gran tamaño del cráneo en relación al cuerpo (en comparación con el resto de las especies de tortugas marinas) y su caparazón de color café-rojizo (Foto: Karumbé).

Su distribución es circunglobal habitando las plataformas continentales, bahías, lagunas y estuarios de las aguas templadas, subtropicales y tropicales de todos los Océanos (Dodd 1988). Las playas de anidación de la especie se ubican en costas tropicales pero la especie migra a lo largo de su ciclo de vida hacia aguas subtropicales y templadas para alimentarse, estas migraciones usualmente implican recorridos de cientos a miles de kilómetros, lo que la convierten en una especie cosmopolita (Bolten *et al.* 1998; Boyle *et al.* 2009; Figura 2). Es una especie principalmente carnívora y oportunista; pudiendo alimentarse de medusas y/o peces (Dodd 1988). Posee un fuerte pico córneo el cual está adaptado, junto a la musculatura de la mandíbula, para romper las presas de las cuales se alimenta como la concha de diversos moluscos.



Figura 2. Distribución geográfica de la tortuga Cabezona. En azul oscuro se observa su amplia distribución, lo que la convierte en una especie cosmopolita (Tomado de Caraccio 2008).

El tamaño mínimo de las hembras de esta especie en las playas de anidación de Bahía (Brasil), tomado como referencia, es de 98 cm de Largo Recto de Caparazón (LRC)

(Marcovaldi & Chaloupka 2007). Por esta razón consideramos que los individuos encontrados en aguas de la plataforma continental uruguaya, con un Largo Curvo de Caparazón (LCC) de entre 50 y 111.5 cm, son juveniles y adultos (Domingo *et al.* 2006).

1.1.1. Ciclo de Vida

La tortuga cabezona, al igual que el resto de las tortugas marinas, presenta un ciclo de vida que transcurre entre playas de anidación y áreas de alimentación y/o desarrollo (Figura 3), caracterizándose por tiempos generacionales muy largos, y estimándose que la madurez sexual es alcanzada recién a los 45 años (Scott *et al.* 2012).

Los apareamientos ocurren en el agua, en los corredores migratorios o en las cercanías de las playas donde las hembras salen a anidar generalmente durante la noche (Miller 1997). Las hembras presentan un marcado comportamiento filopátrico que las lleva a poner sus huevos a las playas donde nacieron (Carr 1975; Lee *et al.* 2007). Al nacer, las crías alcanzan el mar e inician una fase oceánica donde se dispersan según el patrón de flujo de las primeras corrientes oceánicas con las que toman contacto; esto determina, en parte, los patrones de dispersión de la especie y la composición de individuos en las áreas de alimentación y desarrollo (Carr 1987; Musick & Limpus 1997; Bolten 2003a; Okuyama & Bolker 2005; Carreras *et al.* 2006; Blumenthal *et al.* 2009). En particular, se estima que la fase oceánica de los individuos de tortuga cabezona que nacen en playas de anidación del Atlántico dura entre 6.5 y 11.5 años (Bjorndal *et al.* 2000).

Una vez cumplida la fase oceánica comienza la fase nerítica. En esta fase los individuos, ya en estadio juvenil o subadulto, se reclutan en hábitats neríticos ubicados sobre la plataforma continental en donde la profundidad no excede los 200 m o en áreas cercanas al talud

continental (Musick & Limpus 1997; Bolten 2003b; Monzón Arguello *et al.* 2009). Los hábitats neríticos generalmente constituyen áreas de alimentación y desarrollo donde convergen tortugas originadas en más de una playa de anidación.

Cabe destacar que los juveniles y subadultos tienden a reclutarse en ambientes neríticos cercanos a las playas donde nacieron (Bowen *et al.* 2004; Bowen *et al.* 2005).

Durante la etapa adulta, las hembras y los machos realizan migraciones entre sus áreas de alimentación y de reproducción. Estas migraciones de reproducción ocurren cada 2 o 3 años en tortugas cabezonas y en general pueden implicar recorridos de cientos o miles de kilómetros a través de diversos hábitats oceánicos (Miller 1997; Bolten *et al.* 1998; McClellan & Read 2007; Chacon *et al.* 2008; Boyle *et al.* 2009).

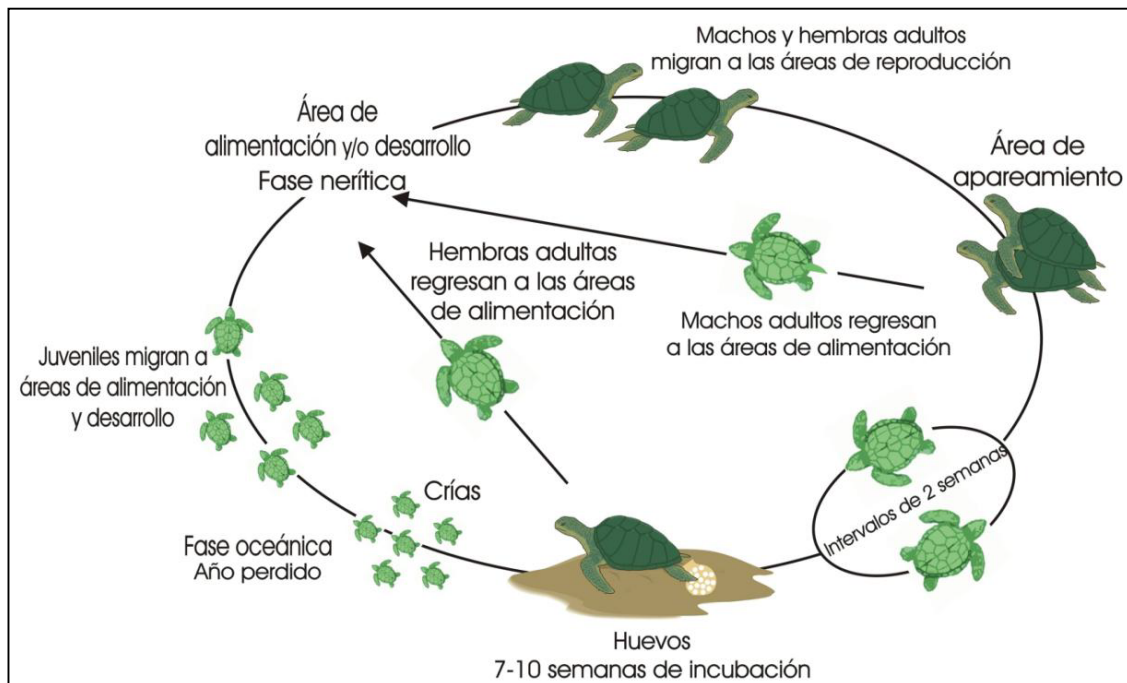


Figura 3. Esquema general del ciclo de vida de las tortugas marinas (modificado de Miller 1997).

1.1.2. Las aguas uruguayas como importante hábitat de desarrollo

Las aguas uruguayas son una importante área de alimentación y hábitat transitorio para individuos maduros e inmaduros de tortuga cabezona (Domingo *et al.* 2006; López-Mendilaharsu *et al.* 2007). Con respecto a las tallas de los individuos capturados por el palangre pelágico, se observa una gran predominancia de estadios inmaduros lo que hace suponer que el área representa una zona relevante para las poblaciones de la especie, constituyendo un área de cría para diferentes poblaciones de la misma (Sales *et al.* 2006; López-Mendilaharsu *et al.* 2007). A su vez, en individuos varados en la costa uruguaya, también se ha encontrado una predominancia de juveniles sobre adultos (López-Mendilaharsu *et al.* 2003; Vélez Rubio 2011).

El análisis de individuos capturados incidentalmente en las pesquerías industriales determinó que provienen de diversas playas de anidación, algunas de ellas ubicadas incluso en costas del Océano Índico o Pacífico (Caraccio *et al.* 2008). Esta diversidad de orígenes geográficos genera un stock mixto de individuos con una composición genética diversa, constituyendo un valioso grupo de individuos para diferentes poblaciones de la especie a nivel global.

1.2. Estado de Conservación

En las últimas décadas, la necesidad de proteger y recuperar las poblaciones de tortugas marinas ha capturado el interés de muchas agencias gubernamentales, ONGs y el público en general (Campbell *et al.* 2009; Hamann *et al.* 2010).

La tortuga cabezona se encuentra actualmente catalogada como “En Peligro” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2013) y a su vez es protegida por

numerosos acuerdos internacionales: Convenio de Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna Silvestre (CITES, apéndice I) y la Convención de Especies Migratorias y Animales Silvestres (CMS, apéndice I). También por convenios regionales: Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas (CIT) (San José 2001), Iniciativa para las Especies Migratorias del Hemisferio Occidental (WHMSI) (Chile 2003), así como leyes y decretos nacionales uruguayos. Entre estos últimos se destaca el Decreto 144/1998 (Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, DINARA) para la prohibición de captura, retención y transporte, comercialización, transformación y procesamiento de *C. caretta* y el resto de las especies que ocurren en aguas uruguayas.

Además, las tortugas marinas son consideradas como “Especies Prioritarias para la Conservación en Uruguay” por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) (DINAMA 2009).

1.2.1. Karumbé: Tortugas marinas del Uruguay

La ONG Karumbé, Tortugas Marinas del Uruguay fue fundada en 1999 con el objetivo de nuclear a un grupo de estudiantes, biólogos, veterinarios, pescadores y conservacionistas, interesados en la conservación de la biodiversidad marina, en especial las tortugas marinas.

Karumbé lleva adelante diversas actividades de investigación como estudios de captura/marcaje/recaptura, registro de varamientos, análisis genéticos de diversidad poblacional, monitoreo a través de avistamientos o telemetría, captura incidental en pesquerías artesanales, rehabilitación veterinaria de individuos, análisis de dieta y evaluación de la contaminación a través de estudios hematológicos entre otros.

Karumbé desarrolla además tareas de educación y desarrollo comunitario entre los

pescadores y sus familias, así como en la sociedad en general, con el fin de generar conciencia acerca de la importancia de la conservación de las especies marinas en nuestro país (www.karumbe.org).

1.2.2. Amenazas para la especie

La declinación de las poblaciones de la tortuga cabezona es muy evidente en el Océano Pacífico donde se ha observado una reducción de un 80 % de las poblaciones anidadoras (Alfaro-Shigueto *et al.* 2008; Lewison *et al.* 2004). Entre los factores que afectan a la especie, se encuentra el uso humano para consumo de carne y huevos, la predación de huevos por especies invasoras, perdida o degradación de playas de anidación, contaminación y captura incidental en pesquerías, entre otros (Jackson *et al.* 2001; Tomás *et al.* 2008; Wallace *et al.* 2008).

Sin embargo, la captura incidental en las pesquerías merece especial atención debido a que afecta a individuos subadultos y adultos (Lewison *et al.* 2004; Lewison & Crowder 2007). Esta franja etaria de individuos es clave en la supervivencia de las poblaciones ya que poseen altos valores reproductivos per cápita (Lewison & Crowder 2007; Wallace *et al.* 2008). Otro factor importante es la tardía maduración sexual de la especie (45 años) (Scott *et al.* 2012).

En Uruguay la principal amenaza para la especie es la interacción con la pesquería de palangre pelágico de superficie, siendo la tortuga cabezona la especie con mayores valores de captura incidental dentro del resto de las especies capturadas incidentalmente por este arte de pesca (Domingo *et al.* 2006). Estas pesquerías tienen como objetivo la captura de pez espada (*Xiphias gladius*), atún (*Thunnus spp.*) y tiburones, utilizando como carnada el calamar que forma parte de la dieta de las tortugas cabezonas.

A su vez las aguas pertenecientes al territorio uruguayo comprenden la zona donde se registra el mayor número de capturas incidentales en la región Atlántico Sud-Occidental (ASO) (Domingo *et al.* 2006; Lopez Mendilaharsu *et al.* 2007; Giffoni *et al.* 2008; Figura 4). La tasa de captura incidental estimada es de 0.64 individuos/1000 anzuelos (López-Mendilaharsu *et al.* 2007). Este valor es mayor al reportado en otras áreas, lo que indica que la región ASO es una zona de importante concentración para la especie (Kotas & Gallo 2004; Domingo *et al.* 2005; Sales *et al.* 2006;).

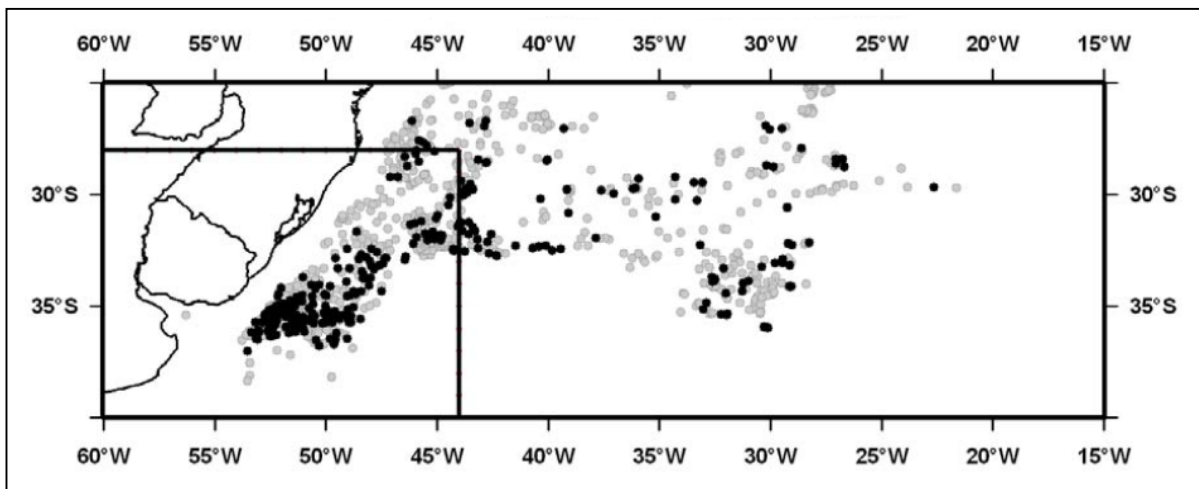


Figura 4. Mapa donde se observa la distribución de capturas incidentales de *Caretta caretta* en la pesquería de palangre pelágico correspondiente a barcos uruguayos y brasileros en el período comprendido entre abril de 1988 a octubre de 2004. Puede notarse la alta concentración de capturas incidentales en aguas uruguayas (Tomado de Domingo *et al.* 2006).

Más recientemente, Pons *et al.* (2010) registraron un total de 3778 tortugas capturadas para el periodo 1998-2007 (media de la captura anual = 378 individuos), detectando capturas de estas tortugas en el 31% de los lances. A pesar de que muchas de las tortugas capturadas incidentalmente son devueltas vivas al mar, una gran proporción de estas son liberadas con

el anzuelo ingerido, lo que les genera graves daños como infecciones, incapacidad de alimentarse correctamente, etc., causando finalmente la muerte del individuo (Lewison *et al.* 2004; López-Mendilaharsu *et al.* 2007; Lewison & Crowder 2007).

Por otro lado, en la pesquería de arrastre costero de fondo, la tortuga cabezona también es la especie mayormente capturada, (94 individuos en un período de 3 años) con la diferencia de que en estos casos la mortalidad es elevada ya que los individuos se ahogan debido a la larga duración de los lances (Karumbé: datos no publicados; Vélez Rubio 2011).

Se ha constatado que la interacción con pesquerías industriales es una de las causas de varamiento más importantes (Tomás *et al.* 2008, Vélez Rubio 2011); donde se puede observar: asfixia por estrangulación en redes, ahogamiento debido a la imposibilidad de salir a respirar, amputación de extremidades, infecciones causadas por heridas internas o externas, inanición por incapacidad de alimentarse o nadar correctamente.

1.3. Herramientas para la conservación de tortugas marinas

En la implementación de estrategias de manejo de especies en peligro de extinción resulta clave definir que grupos de individuos deben ser conservados, ya que resulta imposible abarcar a todos, especialmente cuando hablamos de especies altamente migratorias y distribuidas globalmente.

En este sentido, son utilizadas las Unidades de Manejo "MU" del inglés "*Management Units*". Estas identifican grupos de individuos con divergencias significativas entre sí en las frecuencias alélicas a nivel del ADN mitocondrial o nuclear (Moritz 1994; Wallace *et al.* 2010). Las MU identifican grupos funcionalmente independientes y pueden ser caracterizadas por otras herramientas o indicadores, además de los marcadores genéticos,

como ser rasgos de historia de vida, comportamiento o morfología, aplicándose en la gestión a corto plazo de la especie (Moritz 1994).

A pesar de que el uso de las MU está muy extendido en la conservación de especies, se han identificado (específicamente para poblaciones de tortugas marinas) factores o amenazas que varían a escala regional los cuales disminuyen la efectividad de las MU en la conservación de estas especies (Wallace *et al.* 2010).

Las tortugas marinas presentan características biológicas complejas (Bowen *et al.* 2005; McClellan & Read 2007), entre las que se destacan:

- maduración sexual tardía
- filopatría en hembras
- flujo génico asimétrico mediado por machos
- superposición de poblaciones y generaciones tanto en los corredores migratorios como en áreas de alimentación y desarrollo
- amplios rangos geográficos, utilizando distintos ambientes en diferentes etapas de su ciclo de vida

Debido a estas características biológicas complejas, se dificulta la implementación y determinación de "MU" en poblaciones de tortugas marinas, por lo cual Wallace *et al.* (2010) plantean la utilización del concepto de Unidades de Manejo Regionales "RMU" del inglés "*Regional Management Units*".

Este concepto incluye los aspectos biogeográficos de las especies como: sitios de anidación, "stocks" genéticos (que en muchos casos son equivalentes a las "MU") y distribuciones geográficas basadas en estudios de monitoreo (Godley *et al.* 2010).

Las "RMU" integran espacialmente una gran cantidad de información, incorporando así la complejidad en la estructuración poblacional de las tortugas marinas, lo que proporciona un

marco flexible y dinámico para la evaluación de las amenazas, la identificación de áreas de alta diversidad y la evaluación del estado de conservación de las especies.

En este sentido, las aguas uruguayas, forman parte de una de las “RMU” definida por Wallace *et al.* (2010) para la tortuga cabezona nivel global (Figura 5).

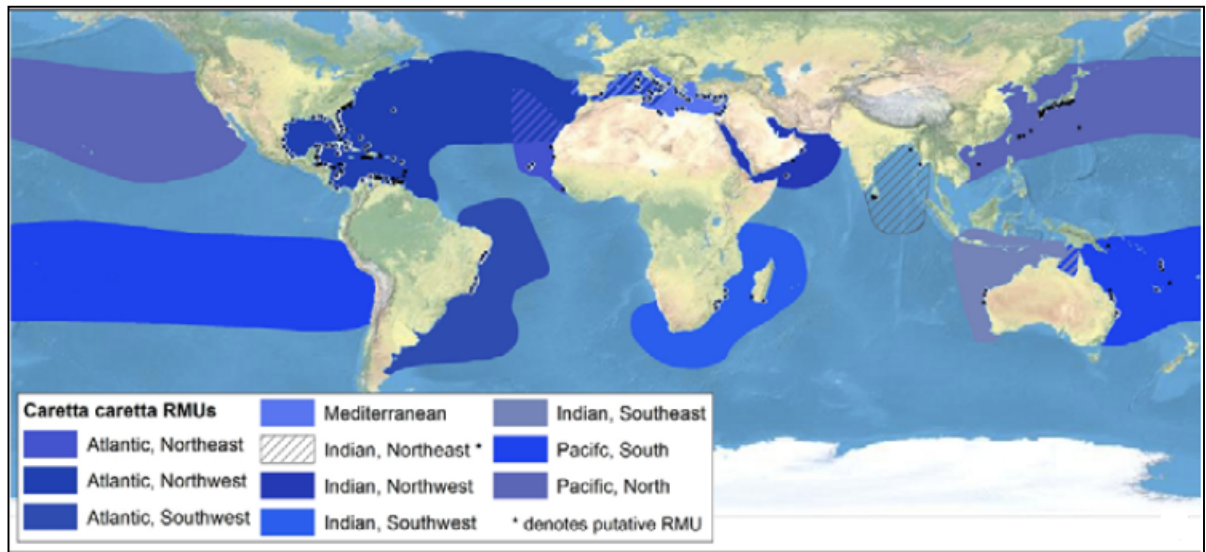


Figura 5. Distribución de las “RMU” propuestas para la tortuga cabezona en todos los océanos del planeta. Puede observarse que las aguas uruguayas forman parte de la única RMU propuesta para el Atlántico Sud-Occidental. (Tomado de Wallace *et al.* 2010)

1.3.1. La genética aplicada a la conservación de las tortugas marinas

Existe un vacío de información con respecto a algunos aspectos biológicos de las tortugas marinas durante gran parte de su ciclo de vida, especialmente en su fase oceánica y áreas de alimentación y desarrollo donde es difícil observar y estudiar a los individuos (Awise 1998). La genética, en conjunto con otras herramientas, permite responder algunas interrogantes relacionadas a aspectos comportamentales que determinan la distribución geográfica de las especies (rutas migratorias) y su estructuración poblacional (paternidad múltiple, filopatría).

Por otro lado, permite dilucidar patrones filogeográficos globales que influyen la especiación y niveles de hibridación entre las especies con sus respectivas consecuencias evolutivas para el grupo (Avice 1987; Okuyama & Bolker 2005; Bowen *et al.* 2005; Lara-Ruiz *et al.* 2006; Bowen & Karl 2007). Finalmente, entre otras utilidades, la genética es muy importante a la hora de evaluar la diversidad de los stocks mixtos que ocurren en las áreas de alimentación y desarrollo para así definir prioridades con respecto a sobre cuales áreas enfocar los esfuerzos de conservación. Específicamente, Bowen & Karl (2007) plantean que es primordial el estudio de las especies en sus áreas de alimentación y desarrollo, pues es allí donde encontramos una gran fracción de la población que utiliza las mismas por un periodo de tiempo prolongado.

La utilización de marcadores moleculares del ADN mitocondrial permite determinar el origen geográfico (a que playas de anidación pertenece un individuo) y los niveles de diversidad genética (Avice 1987; Okuyama & Bolker 2005). Estudios genéticos realizados con hembras de tortugas marinas en las playas de anidación, lograron determinar que los individuos que desovan en estos sitios tienen composiciones genéticas particulares (Carr 1975; Bowen & Avice 1995). Esto ocurre porque las hembras presentan un comportamiento filopátrico, volviendo a la misma playa de anidación donde nacieron. Por lo tanto, los individuos que acuden a una playa de anidación portan características genéticamente relacionadas a sus ancestros, compartiendo los haplotipos mitocondriales. En este caso, los haplotipos son las variantes genéticas de una región del genoma mitocondrial.

Si comparamos las secuencias de ADN obtenidas en un área de alimentación, al que acuden individuos de diversos orígenes, con la composición genética de las áreas de desove, es posible inferir cual es el origen de los individuos presentes en nuestro grupo de estudio (Okuyama & Bolker 2005). Asimismo se pueden elucidar las rutas migratorias de las distintas

poblaciones.

1.3.2. Análisis genéticos previos para *Caretta caretta* en Uruguay

Análisis genéticos previamente realizados con muestras obtenidas a partir de tortugas capturadas incidentalmente en palangre pelágico y redes de arrastre costero determinaron la presencia de cinco haplotipos en aguas uruguayas (Caraccio *et al.* 2008). El haplotipo más representativo de la muestra fue el CC-A4 correspondiente a playas de anidación de Brasil. Además, estos autores hallaron dos haplotipos típicos de playas de anidación de México, USA, Grecia y Turquía, y dos haplotipos del Pacífico Sudoccidental, aunque estas últimas podrían pertenecer a playas de anidación en el Océano Índico que aún no han sido caracterizadas (Caraccio *et al.* 2008). Estos estudios muestran que los individuos analizados, presentes en nuestras aguas, constituyen un stock mixto donde confluyen individuos provenientes de distintas poblaciones.

1.4. Factores que influyen en la composición de un stock mixto

La composición genética o estructuración poblacional de un área de alimentación y desarrollo está determinada por dos factores principales: el primero es la cercanía del área a las playas de anidación de la especie (Bolten 2003; Bowen et al. 2004; Bowen et al. 2005) y el segundo está determinado por los patrones de corrientes oceánicas existentes en el área (Bass *et al.* 2004; Okuyama & Bolker 2005; Carreras et al. 2006; Blumenthal *et al.* 2009).

En general, cuando los juveniles y subadultos comienzan a reclutarse en áreas costeras, lo hacen en aguas relativamente cercanas a las playas de anidación donde nacieron. Sin embargo, durante la fase oceánica pueden ocurrir migraciones muy extensas, influenciadas en su mayor parte por las corrientes oceánicas (Blumenthal *et al.* 2009). En este sentido, se ha constatado que existe una mayor estructuración poblacional a medida que avanza la edad del individuo, observándose muy poca estructuración en hábitats de juveniles (aguas profundas), relativa estructuración en hábitats de subadultos (áreas de alimentación y desarrollo), y una mayor estructuración en hábitats de adultos (áreas de reproducción) (Bowen *et al.* 2005, McClellan & Read 2007; Figura 6). En definitiva, lo que ocurre es que en aguas profundas los juveniles de diversas poblaciones se encuentran mayormente mezclados debido a que se encuentran en una fase altamente migratoria, donde eventualmente pueden alejarse miles de kilómetros de la playa donde nacieron. En cambio, en hábitats neríticos, encontramos individuos subadultos y adultos que se reclutan de acuerdo a la playa de anidación donde nacieron; observándose una estructuración poblacional más marcada, donde la mayoría de los individuos proviene de playas de anidación cercanas.

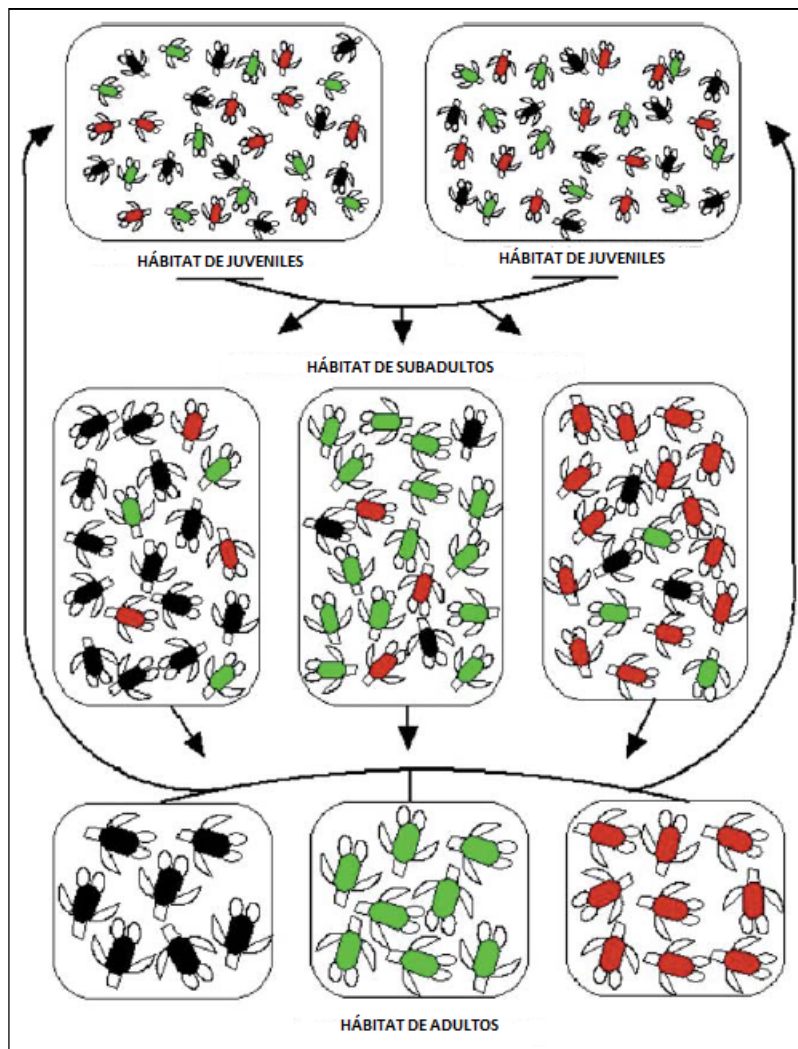


Figura 6. Modelo que ilustra la estructuración poblacional en los tres estadios del ciclo de vida de las tortugas marinas. Las tortugas se originan en tres colonias de anidación (áreas de reproducción y playas de anidación) indicadas por los colores negro, rojo y verde (Tomado de Bowen *et al.* 2005).

Lo expresado anteriormente no constituye una regla, sino más bien una tendencia que se ha observado en las poblaciones de tortugas marinas; ocurriendo también movimientos de subadultos y adultos a ambientes pelágicos, y observándose individuos (especialmente machos) que no se reclutan en aguas cercanas a las playas de anidación (Bowen & Karl 2007).

Las corrientes oceánicas que fluyen hacia y desde un área de alimentación y desarrollo constituyen el segundo factor que puede determinar la composición haplotípica de dicha área. En este sentido, las corrientes marinas constituyen corredores migratorios para las especies, las cuales se dispersan siguiendo los patrones de circulación de las mismas (Carreras *et al.* 2006; Blumenthal *et al.* 2009).

1.5. Justificación de la investigación

Evaluar la diversidad haplotípica de los individuos de *Caretta caretta* varados en la costa resulta en información innovadora siendo el primer estudio de estas características que toma en cuenta individuos varados de la especie en Uruguay. A su vez, este estudio incorporará una región más extensa del *D loop* (en comparación con el análisis llevado a cabo por Caraccio *et al.* 2008), la cual presenta varios sitios polimórficos que definen más haplotipos en las poblaciones de la especie; aumentando de esta manera la variabilidad haplotípica. Caracterizar los haplotipos de individuos varados permitirá evaluar la composición del stock mixto que habita las aguas uruguayas y la región ASO (Atlántico Sud Occidental).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La diversidad genética de los individuos varados de tortuga cabezona (*Caretta caretta*) en la costa uruguaya representa la existente en las aguas de la región ASO (Atlántico Sud-Occidental).

2.2. Objetivo general

- Caracterizar genéticamente las tortugas cabezonas (*Caretta caretta*) varadas en la costa uruguaya utilizando la región control del ADNmt.

2.3. Objetivos específicos

- Examinar la variabilidad genética de la especie en la costa uruguaya.
- Realizar un análisis comparativo de diversidad entre las tortugas capturadas incidentalmente en aguas uruguayas con diferentes artes de pesca y los individuos varados en la costa.
- Determinar los haplotipos e inferir el posible origen de los individuos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

El área de estudio abarcó la línea de costa desde Montevideo (34 58' S, 56 56' O) hasta Barra del Chuy (33 44' S, 53 22' O) (Figura 7).



Figura 7. Mapa de la costa uruguaya donde se detallan las áreas protegidas costeras de Uruguay. En azul se representan las áreas que pertenecen al SNAP, en amarillo las que están en proceso de ingreso y en verde las propuestas para formar parte (Sistema de información ambiental, DINAMA; Vélez-Rubio 2011).

3.2. Muestras utilizadas en el presente estudio

Las muestras fueron colectadas en el marco de la Red de Rescate y Varamientos de Tortugas Marinas (RRVTM), a través de la cual la ONG recibe avisos de varamientos de toda la costa gracias a pobladores locales, turistas, pescadores, prefectura, asociaciones civiles, guardavidas y guardaparques. Cuando es posible, integrantes de la ONG se trasladan hasta el lugar de varamiento y toman datos morfométricos, registro fotográfico y extraen tejido

para la realización de análisis genéticos.

También fueron incorporadas muestras colectadas a partir de 2006 en las playas en las costas del noreste del departamento de Rocha, con una periodicidad de al menos una vez por semana durante el período Diciembre-Abril (Vélez Rubio 2011).

Cuando se encuentra un individuo varado se determina la causa (si es posible), se registra fecha, ubicación geográfica, especie, anchura y longitud curvo del caparazón, así como también se extraen muestras de tejidos para posteriores estudios genéticos.

Se utilizaron muestras de tejidos colectadas a partir de individuos varados en la costa uruguaya a lo largo de 8 años de muestreo (2001-2009). La fecha y localidad en el que fueron colectadas las muestras analizadas se detallan a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Se detalla información de las muestras utilizadas como la fecha de colecta y su ubicación en la costa uruguaya.

Muestra	Fecha de colecta	Localidad	Departamento
CCV 11	10/12/2001	Punta del Este	Maldonado
CCV 17	27/02/2002	Punta Carretas	Montevideo
CCV 19	24/03/2002	Carrasco	Montevideo
CCV 38	17/01/2003	Cerro Verde	Rocha
CCV 43	17/03/2003	Piriápolis	Maldonado
CCV 45	02/04/2003	Solymer	Canelones
CCV 54	21/04/2003	La Pedrera	Rocha
CCV 57	16/04/2003	La Paloma	Rocha
CCV 91	02/02/2004	Punta del Diablo	Rocha
CCV 103	22/04/2004	La Coronilla	Rocha
CCV 197	03/09/2005	La Esmeralda	Rocha
CCV 224	09/02/2006	Barra del Chuy	Rocha
CCV 269	11/01/2007	La Coronilla	Rocha
CCV 278	27/01/2007	Santa Teresa	Rocha
CCV 285	30/01/2007	Válizas	Rocha
CCV 292	20/02/2007	La Coronilla	Rocha
CCV 314	06/01/2008	Cerro Verde	Rocha
CCV 317	03/02/2008	Carrasco	Montevideo
CCV 318	11/02/2008	Bello Horizonte	Canelones
CCV 323	12/03/2008	La Esmeralda	Rocha
CCV 339	17/12/2008	Punta del Diablo	Rocha
CCV 344	18/12/2008	La Coronilla	Rocha
CCV 347	09/01/2009	Santa Teresa	Rocha
CCV 349	12/01/2009	La Paloma	Rocha
CCV 368	23/02/2009	La Coronilla	Rocha

De los 25 individuos analizados, el 52 % fueron identificados como individuos juveniles o sub-adultos, tomando como referencia el tamaño mínimo de las hembras anidadoras de las colonias más cercanas en Brasil (media LCC < 83 cm, López-Mendilaharsu *et al.* 2007), mientras que el 24 % fueron catalogados como adultos (media LCC ≥ 83 cm). Finalmente, a 6 individuos de la muestra no fue posible tomarles las medidas, por tanto su estadio permanece indeterminado (Anexo I). Las muestras se almacenaron y procesaron en el Laboratorio de Genética de la Conservación-IIBCE-Unidad Asociada a Facultad de Ciencias-UdelaR, a cargo de la Dra. Susana González.

3.3. Extracción de ADN y Amplificación de la secuencia de interés

En el laboratorio se realizó la extracción de ADN de 25 muestras de tejidos según protocolo de Medrano *et al.* (1990) con modificaciones (Anexo II). Posteriormente se cuantificó la cantidad de ADN extraído empleando Nanodrop 2000 Thermo Scientific.

Se amplificó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), la región control del ADNmt (*D-loop*); para esto se utilizaron los primers LCM15382 (5'-GCTTAACCCTAAAGCATTGG-3') y H950 (5'-GTCTCGGATTTAGGGGTTTG-3') desarrollados específicamente para tortugas marinas por Abreu-Grobois *et al.* (2006). Estos primers amplifican una región de aproximadamente 800 pares de bases (Figura 8).

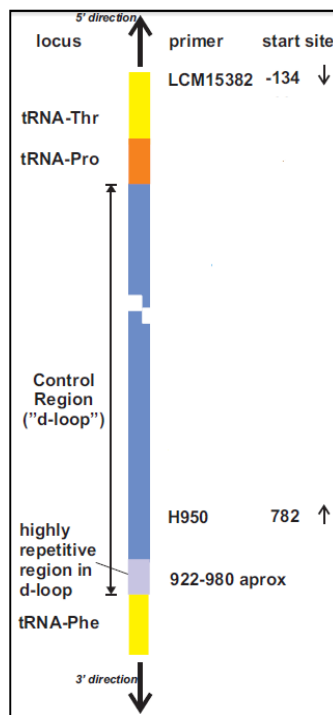


Figura 8. Mapa de la región control del ADN mitocondrial, donde se observa el sitio donde se adhieren los primers utilizados (Tomado de Abreu-Grobois *et al.* 2006).

La mezcla de PCR contenía:

BioMix	12.5µl
LCM15382	1µl
H950	1µl
ADN	1µl
H2O	9.5µl

La concentración inicial de ADN utilizada fue de 80 ng/µl aproximadamente.

El PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	5 min a 94 C	} 35 ciclos
Desnaturalización	45 seg a 94 C	
Hibridación	45 seg a 50 C	
Extensión	1 min a 72 C	
Extensión final	7 min a 72 C	

En cada reacción se incluyeron controles negativos y positivos. Los productos de la amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 0.8% a través de un transiluminador con cámara digital adaptada.

3.3.1. Análisis de las secuencias del ADN mitocondrial

Los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar (utilizando ambos primers) a Macrogen, Korea del Sur. Las secuencias obtenidas de 748 pb fueron analizadas con el programa DNASTAR (DNASTAR Inc. 1995) y editadas con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011), alineándose en conjunto con 77 secuencias (que definen 77 haplotipos diferentes) extraídas de la base de datos del ACCSTR.

Los sitios polimórficos, la diversidad nucleotídica (π_n), el relevamiento de haplotipos y la diversidad haplotípica (\hat{H}) se calcularon utilizando el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas 2009). La diversidad haplotípica se define como la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes (Nei 1987), y se estima según,

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

y la varianza se calcula como,

$$V(\hat{H}) = \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[\sum_{i=1}^k p_i^3 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right\}$$

donde n es el número secuencias, k es el número de haplotipos y p_i es la frecuencia del i ésimo haplotipo.

La diversidad nucleotídica es la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos tomados al azar sean diferentes (Tajima 1983; Nei 1987). Es el equivalente a la diversidad génica, pero a nivel nucleotídico, y se calcula según,

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L}$$

y la varianza se calcula como,

$$V(\hat{\pi}_n) = \frac{n+1}{3(n-1)L} \hat{\pi}_n + \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)} \hat{\pi}_n^2$$

donde d_{ij} es una estimación del número de mutaciones que ocurrieron desde la divergencia de los haplotipos i y j , k es el número de haplotipos, p_i es la frecuencia del haplotipo i y L es el largo de la secuencia.

3.3.2. Análisis filogenético

Para evaluar la relación existente entre los haplotipos encontrados se construyó un árbol de haplotipos utilizando el método de distancia "*Neighbour joining*" o "Unión de Vecinos" (Saitou & Nei 1987). Este método minimiza la subestimación de las distancias nucleotídicas observadas en relación a las esperadas, basándose en diferentes modelos evolutivos. En este caso, se utilizó el modelo Kimura 2 parámetros (Kimura 1980) el cual asume tasas diferenciales de ocurrencia de transiciones (sustitución de una purina por purina o de una pirimidina por otra pirimidina) y transversiones (sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa). Las tasas de ocurrencia de transiciones y transversiones son calculadas a partir de las secuencias analizadas.

La estabilidad del árbol de haplotipos fue testada a través de 1000 pseudoréplicas del test de *bootstrap* (Felsenstein 1985), el cual es un método estadístico de muestreo con reposición al azar.

Como grupo externo se utilizó una secuencia de la región control del ADN mitocondrial de la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*); la misma se obtuvo del GenBank (código: DQ177341.1) y fue depositada allí por Lara Ruiz *et al.* (2006).

3.3.3. Correspondencia geográfica de los haplotipos encontrados en playas uruguayas

Para evaluar la correspondencia geográfica de los haplotipos encontrados en los individuos varados se compararon las secuencias obtenidas con secuencias depositadas en la base de datos del Archie Carr Center for Sea Turtle Research (ACCSTR). Esta base de datos de acceso libre, compila secuencias de ADN mitocondrial que definen haplotipos pertenecientes, en su mayoría, a playas de anidación del Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico (<http://accstr.ufl.edu/accstr-resources/cclongmtdna.pdf>). Las 25 secuencias obtenidas en nuestro estudio fueron comparadas con las 77 secuencias depositadas en la base de datos del ACCSTR, las cuales definen 77 haplotipos únicos que se corresponden con las diferentes playas de anidación descritas para la especie hasta el momento (Figura 9).

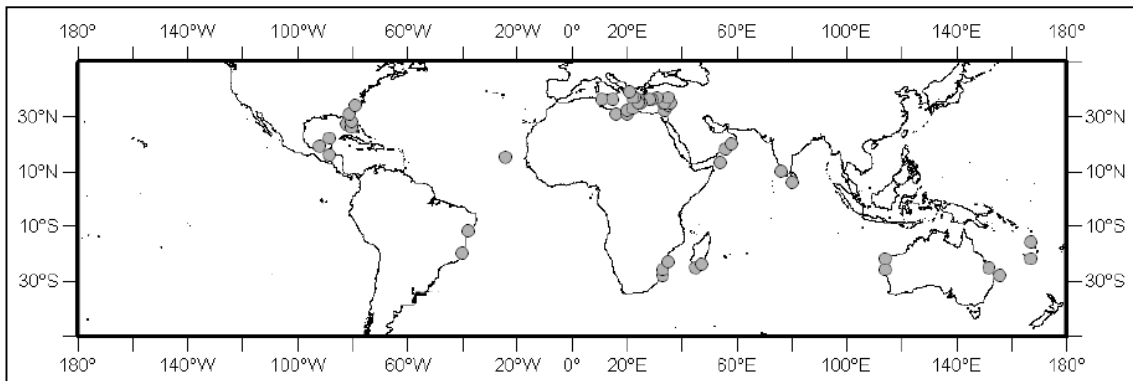


Figura 9. Distribución de las principales colonias de anidación de la tortuga cabezona en el Mar Mediterráneo y los Océanos Atlántico, Índico, y Pacífico Sur (círculos grises) (Tomado de Caraccio *et al.* 2008).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de las secuencias

Se obtuvieron 25 secuencias de la región control del ADN mitocondrial pertenecientes a individuos varados en la costa uruguaya.

El segmento utilizado contiene un total de 42 sitios polimórficos, 26 sitios variables y 16 sitios parsimoniosamente informativos. En las secuencias, los sitios polimórficos se concentran en 3 regiones:

- Región 1: Se encuentra entre las posiciones 58 y 370, conteniendo 23 sitios polimórficos.
- Región 2: Se ubica entre las posiciones 423 y 438, donde se observan 4 sitios polimórficos.
- Región 3: Abarca a partir de la posición 499 en adelante y presenta 15 sitios polimórficos.

La diversidad nucleotídica (π) calculada fue de 0.00647 +/- 0.00344.

4.2. Variabilidad haplotípica

A través del análisis de las 25 secuencias se identificaron 6 haplotipos diferentes. Entre los haplotipos encontrados, 3 son nuevos, no estando registrados aún en la base genómica del ACCSTR. Estos últimos los denominamos como "CC-AX", "CC-AY" y "CC-AZ" (Tabla 2).

Tabla 2. Se detallan los haplotipos encontrados a partir del análisis de las secuencias, su frecuencia en la muestra y su respectivo origen geográfico.

Haplotipo	No Individuos	Origen geográfico
CC-A2.1	1	Mar Mediterráneo
CC-A4.1	4	Brasil (Exclusivo)
CC-A4.2	15	Brasil (Exclusivo)
CC-AX	2	Indeterminado
CC-AY	2	Indeterminado
CC-AZ	1	Indeterminado

La diversidad haplotípica (\hat{H}) calculada para la muestra es de 0.648 +/- 0.100.

El Cuadro 1 muestra el número de cambios nucleotídicos entre las secuencias de la muestra para estimar la divergencia evolutiva entre las mismas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1. CCV 11																										
2. CCV 19	0																									
3. CCV 43	0	0																								
4. CCV 45	0	0	0																							
5. CCV 54	0	0	0	0																						
6. CCV 57	0	0	0	0	0																					
7. CCV 91	0	0	0	0	0	0																				
8. CCV 103	0	0	0	0	0	0	0																			
9. CCV 224	0	0	0	0	0	0	0	0																		
10. CCV 285	0	0	0	0	0	0	0	0	0																	
11. CCV 292	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																
12. CCV 318	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															
13. CCV 339	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
14. CCV 349	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
15. CCV 368	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
16. CCV 38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
17. CCV 314	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
18. CCV 269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2								
19. CCV 278	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	0							
20. CCV 317	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	0	0						
21. CCV 323	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	0	0	0					
22. CCV 17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2				
23. CCV 347	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	0			
24. CCV 197	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	27	27	27	27	27	27	27	25	25	
25. CCV 344	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	30	30	30	30	30	30	30	28	28	26

- = CC-A4.2
- = CC-AX
- = CC-A4.1
- = CC-AY
- = CC-AZ
- = CC-A2.1

Cuadro 1. Estimación de la divergencia evolutiva entre secuencias. Se muestra el numero de diferencias nucleotídicas entre las secuencias. Las mismas se encuentran agrupadas según el número de diferencias entre sí; en colores se detalla a que haplotipo pertenecen los agrupamientos. Análisis evolutivo realizado con MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011).

El haplotipo más representativo de la muestra, CC-A4.2, se diferenció por un sitio polimórfico con respecto al haplotipo CC-A4.1. En cambio, el haplotipo más divergente de la muestra, el CC-A2.1, presentó 29 sitios diferentes con respecto al CC-A4.2.

Los haplotipos no registrados previamente variaron en relación a sus diferencias con el haplotipo CC-A4.2. El "CC-AX" y el "CC-AY" se diferencian por un sitio polimórfico (distinto en cada caso) con respecto al CC-A4.2, mientras que el "CC-AZ" difiere en 26 sitios polimórficos con respecto a este último.

La figura 10 muestra un análisis filogenético árbol de haplotipos, utilizando el método de Unión de Vecinos "*Neighbour Joining*" al cual se le aplicó el estadístico de filogenias "*Bootstrap*", apoyado con 1000 repeticiones en total (Figura 10).

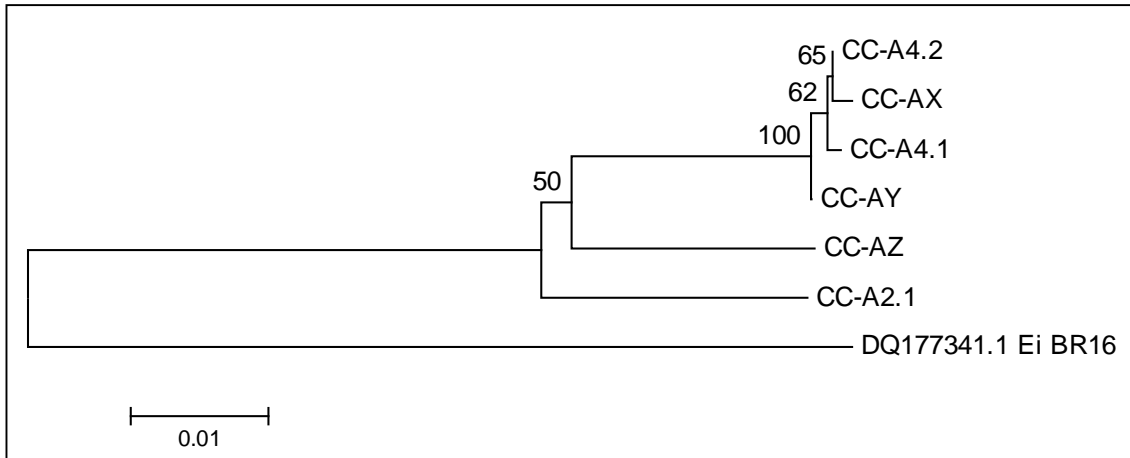


Figura 10. Relación evolutiva de los haplotipos inferida a través del método de Unión de Vecinos. El árbol consenso de *bootstrap*, obtenido a partir de 1000 replicas, fue usado para representar la relación evolutiva entre los haplotipos encontrados. El porcentaje de árboles (replicados en la prueba de *bootstrap*) en el que se muestran los haplotipos asociados, se muestra al lado de las ramas. Aquellas asociaciones de haplotipos que no superan el 50 % de repeticiones en la prueba de *bootstrap* no fueron consideradas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama expresadas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas, empleando el parámetro Kimura 2 del método Unión de Vecinos; y se encuentran expresadas como el número de sustituciones de bases por sitio. Todas las posiciones ambiguas fueron removidas para cada par de secuencias. Como grupo externo se utilizó una secuencia de ADN mitocondrial de tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*) depositada en GenBank por Lara-Ruiz *et al.* 2006 (código: DQ177341.1 Ei BR16). Análisis evolutivo realizado con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011).

En el árbol de la figura 10, el nuevo haplotipo CC-AX se encuentra estrechamente relacionado con los haplotipos "hermanos" CC-A4.1 y CC-A4.2. En este sentido, el nuevo haplotipo CC-AY también se encuentra cercanamente emparentado a los anteriores,

conformando un grupo de haplotipos (junto al CC-AX).

El nuevo haplotipo CC-AZ, aparece representado en la figura 10 como un haplotipo divergente ubicado en una rama externa.

La frecuencia y relación entre los haplotipos se esquematiza en la red de haplotipos de la figura 11.

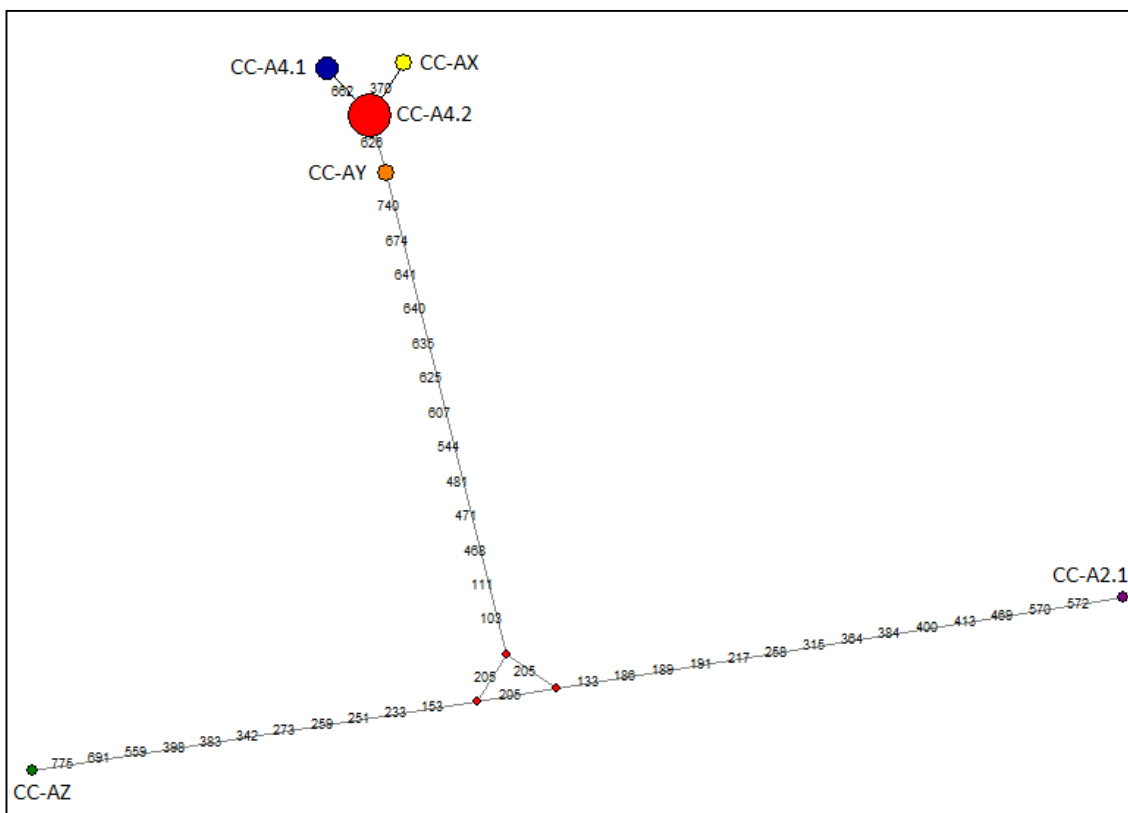


Figura 11. Red de haplotipos. Cada haplotipo se representa con un color diferente y el área de los círculos es proporcional a su frecuencia. Los números muestran la posición donde se encuentran los cambios en los pares de bases (sitios polimórficos) que diferencian a los haplotipos. El diagrama fue construido con el programa Network 4.2.

En la red de haplotipos se observa gráficamente el agrupamiento antes mencionado (conformado por el haplotipo CC-A4.1, CC-A4.2, CC-AX y CC-AY), donde estos se ubican cercanamente entre sí, separados mínimamente por una o dos diferencias nucleotídicas.

Dentro del agrupamiento puede discriminarse una topología de estrella, en donde el haplotipo CC-A4.2 es el más frecuente y central; esto posiblemente indica que es ancestral con respecto a los haplotipos CC-A4.1 y CC-AX.

La presencia de nodos de conexión en el centro del diagrama estaría indicando un sesgo muestral, el cual indica que no se encuentran representados en la muestra aquellos haplotipos que conectan entre sí a los haplotipos encontrados.

4.3. Origen geográfico de los individuos muestreados

Se estima que el 76% de los individuos pertenecen a las playas de anidación ubicadas exclusivamente en Brasil, ya que los haplotipos mayormente representados son el CC-A4.2 y CC-A4.1, ambos endémicos de dicho país.

Un único individuo proviene de playas de anidación ubicadas en el Mar Mediterráneo, mientras que el 20 % restante pertenecen a haplotipos nuevos aún no registrados en ninguna playa de anidación conocida.

4.3.1. Inferencias acerca del origen geográfico de los nuevos haplotipos

A pesar de que no es posible determinar claramente cuál es el origen de los haplotipos no identificados, es posible inferirlo comparando las secuencias nuevas con las secuencias de 340 pares de bases anteriormente utilizadas (ACCSTR, <http://accstr.ufl.edu/accstr-resources/ccshortmtdna.pdf>).

Al construir un árbol de haplotipos incluyendo secuencias de CC-AX, CC-AY y CC-AZ (reducidas a 340 pb) junto a las secuencias de la antigua caracterización haplotípica, se observa el siguiente patrón de agrupamiento (Figura 13).

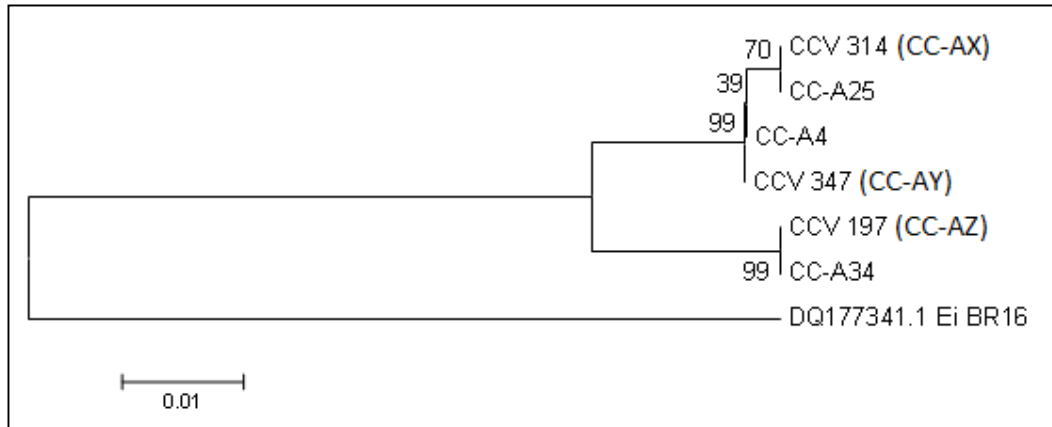


Figura 13. Relación evolutiva de los haplotipos inferida a través del método de Unión de Vecinos. El árbol consenso de *bootstrap*, obtenido a partir de 1000 replicas, fue usado para representar la relación evolutiva entre los haplotipos encontrados. El porcentaje de árboles (replicados en la prueba de *bootstrap*) en el que se muestran los haplotipos asociados, se muestra al lado de las ramas. Aquellas asociaciones de haplotipos que no superan el 50 % de replicaciones en la prueba de *bootstrap* no fueron consideradas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama expresadas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas, empleando el parámetro Kimura 2 del método Unión de Vecinos; y se encuentran expresadas como el número de sustituciones de bases por sitio. Todas las posiciones ambiguas fueron removidas para cada par de secuencias. Como grupo externo se utilizó una secuencia de ADN mitocondrial de tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*) depositada en GenBank por Lara-Ruiz *et al.* 2006 (código: DQ177341.1 Ei BR16). Análisis evolutivo realizado con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011).

En la Figura 13 se observa que los individuos pertenecientes a los nuevos haplotipos, cuando son evaluados en conjunto con las secuencias de 340 pb utilizadas antiguamente, se corresponden con haplotipos antiguamente caracterizados.

Los nuevos haplotipos CC-AX y CC-AY se corresponden con los antiguos CC-A25 y CC-A4 respectivamente; ambos endémicos de playas de anidación brasileras (Reis *et al.* 2009).

Esto corrobora lo observado en las figura 8 y 9, donde ambos haplotipos nuevos se encuentran estrechamente relacionados con los haplotipos endémicos CC-A4.1 y CC-A4.2; conformando un grupo de haplotipos brasileros.

Por otro lado, el único individuo que constituye el haplotipo CC-AZ, pasa a identificarse como el antiguo CC-A34, el cual proviene de playas de anidación ubicadas en el Pacífico Sudoccidental (Caraccio *et al.* 2008; Reis *et al.* 2009).

5. DISCUSIÓN

5.1. Variabilidad haplotípica y nucleotídica

En el contexto de la caracterización haplotípica realizada en esta investigación, debe destacarse el uso de un segmento del ADN mitocondrial (*Dloop*) (Abreu-Grobois *et al.* 2006; Figura 9), que incluye unos 400 pb adicionales con respecto a las secuencias de 340 pb comúnmente utilizadas en estudios precedentes. Esto resulta especialmente valioso, ya que se incluye una tercera región donde se concentran una gran cantidad de cambios (15 sitios polimórficos en total).

En este sentido, los haplotipos pasan a ser definidos por un mayor número de sitios polimórficos, subdividiéndose los antiguos haplotipos y aumentando la probabilidad de encontrar haplotipos nuevos. Aumentar el nivel de discriminación haplotípica en áreas de alimentación y desarrollo, donde convergen individuos de diversos orígenes geográficos, permite identificar vacíos de información con respecto a relaciones filogenéticas de la especie y playas de anidación aún no caracterizadas.

Si comparamos los valores de diversidad genética obtenidos en este estudio con los recabados en la investigación antecedente (Caraccio *et al.* 2008; $\hat{H}=0.432 \pm 0.087$ y $\pi_n=0.014 \pm 0.007$), observamos diferencias que pueden ser atribuidas al cambio en el tamaño de la secuencia utilizada en los análisis.

El valor de \hat{H} obtenido en esta investigación resulta mayor al obtenido por Caraccio *et al.* (2008), mientras que la diversidad nucleotídica es menor.

Con respecto al valor de \hat{H} , al aumentar el tamaño de la secuencia en la caracterización haplotípica, es esperable encontrar más haplotipos, y en consecuencia, valores de diversidad

haplotípica mayores. En este sentido, los haplotipos CC-A4.1 y CC-A4.2 antiguamente se caracterizaban como un único haplotipo, el CC-A4. A su vez, se obtuvieron 6 haplotipos en una muestra de 25 individuos, mientras que los autores antes mencionados hallaron 5 haplotipos en 43 individuos.

La baja diversidad nucleotídica puede explicarse por la gran proporción de regiones conservadas en las secuencias analizadas y a la alta frecuencia de los haplotipos CC-A4.2 y CC-A4.1 respectivamente, los cuales difieren en apenas un sitio polimórfico en relación a 748 pares de bases.

El patrón de “estrella” observado en la red de haplotipos (Figura 11) indica una posible ancestralidad entre los mismos donde pueden inferirse eventos de expansión poblacional de la especie (Bowen & Avise 1995). CC-A4.2 parecería ser la variante ancestral desde la cual divergieron los haplotipos CC-A4.1 y CC-AX, o visto de otro modo, estos podrían ser el resultado de una expansión poblacional a partir de una población en la cual el haplotipo CC-A4.2 estaba presente. En este sentido, Reis *et al.* (2009) encuentra un patrón de ancestralidad similar entre haplotipos endémicos de Brasil (CC-A4, CC-A24 y CC-A25), sugiriendo la existencia de un origen común para los mismos, donde CC-A4 sería el haplotipo ancestral.

Los resultados obtenidos corroboran lo observado por Reis *et al.* (2009) pero a un nivel de discriminación haplotípica mayor. En esta investigación se encontraron patrones de ancestralidad entre haplotipos que antes eran definidos como uno solo, y a su vez encontramos un haplotipo nuevo que derivaría de una subdivisión del antiguo haplotipo CC-A4.

5.2. Origen geográfico de los individuos

La composición haplotípica observada en este estudio se asemeja a la observada por Caraccio *et al.* (2008); en ese caso, la proporción de individuos provenientes de playas de anidación exclusivamente brasileras fue del 74 %, mientras que la ocurrencia del haplotipo CC-A2.1 fue de un 14 %. Si tomamos en cuenta las inferencias acerca del origen geográfico de los nuevos haplotipos, resulta que el 92 % de la muestra son individuos originarios de Brasil, mientras que un 4% proviene del Mar Mediterráneo y el 4% restante es originario de playas ubicadas en el Océano Pacífico SudOccidental.

La composición genética observada en individuos capturados en aguas uruguayas e internacionales aledañas, se corresponde con la obtenida para individuos varados en la costa uruguaya. Los resultados obtenidos comprueban que existe concordancia en la composición haplotípica del stock mixto que habita aguas uruguayas.

Se corroboró la existencia de un área de alimentación y desarrollo para la especie, la cual constituye un hábitat de juveniles y subadultos que se caracteriza por la predominancia de individuos provenientes de playas de anidación cercanas a las aguas uruguayas. Los resultados obtenidos apoyaron lo expresado por Bowen *et al.* (2005) (Figura 6), observándose una marcada estructuración haplotípica, con predominancia de individuos juveniles y subadultos originarios de Brasil.

5.2.1. La corriente cálida del Brasil como factor estructurador del stock mixto

La costa uruguaya se encuentra influenciada principalmente por dos corrientes oceánicas; la corriente cálida del Brasil y la corriente fría de las Malvinas (Figura 12). La primera se mueve en dirección Norte-Sur a lo largo de la costa de Brasil, Uruguay y Argentina, mientras que la segunda lo hace en dirección opuesta a lo largo de la costa de Argentina y Uruguay. Ambas corrientes colisionan en aguas uruguayas, generando un frente de salinidad y temperatura que se desplaza hacia el sur en verano y hacia el norte en invierno, el cual genera una zona de alta productividad orgánica (Guerrero & Piola 1997).

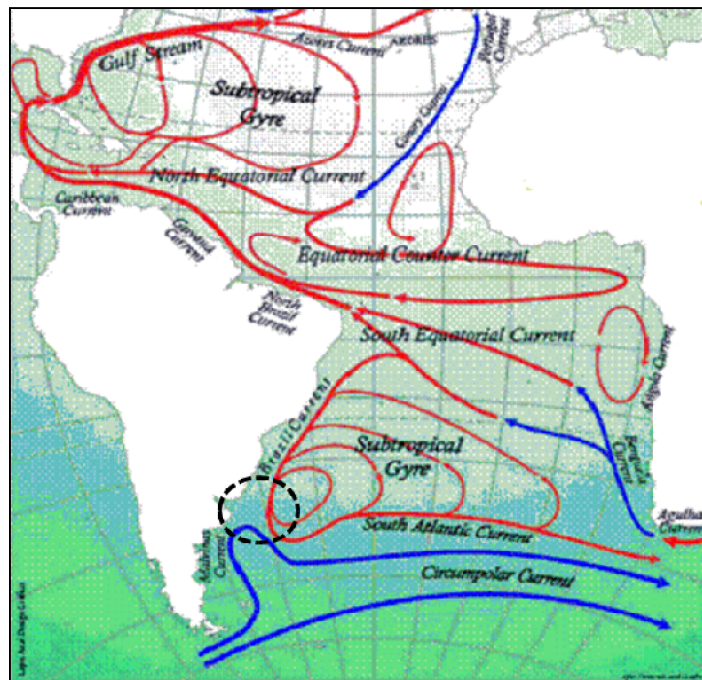


Figura 12. Principales corrientes marinas del Océano Atlántico. En rojo se detallan las corrientes de agua cálida y en azul las de agua fría. Las aguas de la región (señaladas con una línea punteada) se encuentran caracterizadas por la interacción entre la corriente cálida del Brasil y la corriente fría de las Malvinas, las cuales colisionan conformando un frente marítimo que da lugar a una alta productividad orgánica.

Si observamos el patrón de corrientes predominante en la región, resulta lógico que exista una predominancia de individuos de playas de anidación brasileras. Las crías al nacer y entrar en la fase oceánica, toman contacto con la corriente cálida del Brasil, lo que lleva a la mayoría de los individuos a reclutarse luego en aguas uruguayas. Esta corriente constituye en sí un corredor migratorio de gran importancia para las poblaciones brasileras de la especie.

5.2.2. La diversidad genética se corresponde con la biogeografía de la especie

En base a los resultados, podemos afirmar que el patrón observado en las figuras 10 y 11 se corresponde efectivamente con los datos biogeográficos de la especie. El grupo de haplotipos brasileros, se diferencia ampliamente del CC-A2.1 proveniente de playas de anidación lejanas (Mar Mediterráneo) y del CC-AZ posiblemente originario de playas de anidación ubicadas en el Océano Pacífico.

Debido al comportamiento filopátrico de las hembras, es esperable que poblaciones anidadoras alejadas, incluso ubicadas en distintas cuencas oceánicas, muestren una diferenciación genética pronunciada.

5.3. Las aguas uruguayas como área de alimentación relevante para colonias anidadoras lejanas

Los individuos caracterizados como CC-A2.1 (catalogado como juvenil) y CC-AZ (indeterminado), probablemente hayan llegado a aguas uruguayas siguiendo los giros oceánicos (Figura 12).

La presencia de individuos juveniles de playas lejanas puede deberse a que estos realizan migraciones tróficas hacia áreas de alta productividad (Bjorndal *et al.* 2000) y las aguas abiertas del Océano Atlántico Sudoccidental, y más específicamente las aguas uruguayas, son áreas altamente productivas debido al frente termo-salino generado por la colisión de las corrientes marinas (Guerrero & Piola 1997).

6. IMPLICANCIAS PARA LA CONSERVACIÓN

6.1. Impacto de las pesquerías industriales

A partir de los resultados obtenidos, puede afirmarse que las pesquerías industriales que operan en aguas costeras uruguayas e internacionales aledañas, estarían afectando en mayor proporción a las poblaciones anidadoras de Brasil, ya que observamos una alta predominancia de haplotipos brasileros. Sin embargo, también se observa la presencia de individuos que pertenecen a playas de anidación distantes, por tanto estas pesquerías afectan a poblaciones de la especie a nivel regional y mundial.

Es necesario enfocar esfuerzos en la creación e implementación de tecnologías pesqueras que mitiguen la captura incidental de tortugas marinas en las pesquerías industriales. En este sentido, en Uruguay se ha experimentado con la implementación de anzuelos circulares en las pesquerías de palangre pelágico (Domingo *et al.* 2009) los cuales reducen la captura incidental de tortugas marinas pero se observó que atrapan una mayor proporción de tiburones en relación a los anzuelos "J". La investigación en este tipo de tecnologías mitigadoras debe ser ampliamente promovida en nuestro país para asegurar la sustentabilidad de la especie a nivel regional y global.

6.2. Stocks genéticos como Unidades de Manejo

Podemos afirmar que en nuestras aguas co-ocurren varios stocks genéticos, siendo los más representativos aquellos provenientes de playas de anidación brasileras. A nivel genético, encontramos al menos dos haplotipos exclusivos de Brasil (CC-A4.1 y CC-A4.2) con la posibilidad de que CC-AX y CC-AY también provengan de dicho país. Estudios enfocados en

las playas de anidación brasileras pueden esclarecer a futuro si cada haplotipo caracteriza a una playa de anidación discreta o si todos los haplotipos endémicos componen una única gran población brasileras. Por el momento, podemos afirmar que la mayoría de los individuos que utilizan aguas uruguayas provienen de playas brasileras; por tanto la o las poblaciones anidadoras de Brasil deben ser consideradas como una Unidad de Manejo para la especie. Cabe destacar la importancia de las aguas uruguayas como un área especialmente relevante para la sustentabilidad de las poblaciones brasileras de tortuga cabezona.

6.3. Fortalecimiento de la Unidad Regional de Manejo propuesta para la región ASO

A nivel regional, los resultados obtenidos complementan la información biogeográfica necesaria para el establecimiento y fortalecimiento de la RMU propuesta por Wallace *et al.* (2010), comprobando la concordancia del stock mixto que habita aguas uruguayas. En este sentido, nuestros resultados destacan la importancia de la corriente cálida del Brasil como uno de los corredores migratorios más importantes para las poblaciones que anidan en ese país.

6.4. Fortalecimiento y evaluación de áreas marítimo-costeras protegidas

A nivel nacional, en el contexto del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), evaluar la diversidad haplotípica hallada en individuos varados en la costa uruguayas es información relevante y necesaria para el establecimiento y fortalecimiento de las áreas protegidas de la costa uruguayas. Actualmente encontramos implementadas tres áreas marítimo-costeras protegidas: Cerro Verde e Islas de la Coronilla, Cabo Polonio y Laguna de Rocha, todas ellas

ubicadas en el departamento de Rocha (www.snap.gub.uy).

La mayor parte de los varamientos de tortugas cabezonas se registran en las costas del departamento de Rocha, dentro de las áreas costero-marinas protegidas o en áreas aledañas a las mismas (Vélez Rubio 2011). Determinar la causa de estos varamientos, así como la diversidad genética de los individuos, permite evaluar el impacto de actividades humanas sobre la especie. En este sentido, la diversidad genética de la especie generalmente es un buen indicador del estado de salud de las poblaciones de la misma (Avisé 1998).

Dada su importancia ecológica, la sustentabilidad a largo plazo de las poblaciones de tortuga cabazona que ocurren en nuestras aguas, constituye un indicador directo del estado de salud de nuestros ecosistemas marítimo-costeros.

Por otro lado, la tortuga cabazona es una especie “bandera” para la conservación lo que la convierte en una herramienta muy útil a la hora de trabajar con las comunidades costeras para construir conciencia acerca de la importancia de las áreas marítimo-costeras protegidas en nuestro país.

Es recomendable evaluar la implementación de “corredores migratorios protegidos” que den cuenta de la alta movilidad de los individuos y su mayoritaria ocurrencia en aguas pelágicas o neríticas alejadas de la costa. En este sentido, la territorialidad asociada al concepto de áreas protegidas, imposibilita que estas sean completamente efectivas a la hora de proteger la especie, ya que una gran proporción de individuos no utiliza las aguas cercanas a la costa.

Tomando en cuenta lo anterior, determinar la diversidad genética y el origen geográfico de los individuos que ocurren en aguas uruguayas, es de valiosa importancia para la planificación y establecimiento de planes de manejo dentro y fuera de las áreas protegidas, el fortalecimiento o redefinición de las mismas y/o el establecimiento de futuras áreas protegidas

7. CONCLUSIONES

- Existe una concordancia en el stock mixto que habita las aguas uruguayas y la región ASO (Atlántico Sud Occidental), observándose una composición haplotípica similar entre individuos capturados en alta mar y aquellos que se encuentran varados en la costa uruguaya..
- Las principales playas de anidación contribuyentes al stock mixto son brasileras con un aporte del 76 %. Sin embargo, las aguas uruguayas también reciben aportes de playas de anidación lejanas ubicadas en el Mar Mediterráneo y Pacífico Sud Occidental
- El reclutamiento de individuos juveniles y subadultos en nuestras costas posiblemente esté estructurado por los sistemas de corrientes marinas, principalmente por la corriente cálida del Brasil, la cual constituye un corredor migratorio para la especie.
- La diversidad del stock mixto que habita nuestras aguas así como la predominancia de juveniles durante todo el año y las altas tasas de captura incidental, convierten a las costas uruguayas en un área primordial donde enfocar esfuerzos de conservación.

8. PERSPECTIVAS

- Es importante aumentar el tamaño muestral para así obtener resultados que representen con mayor resolución estadística la estructuración genética de la especie.
- Aumentar los esfuerzos de muestreo y análisis genéticos en las playas de anidación brasileras. En este sentido, el aumento en la secuencia que caracteriza los haplotipos genera un aumento de la variabilidad haplotípica y se vuelve necesario evaluar si los nuevos haplotipos se corresponden con nuevas playas de anidación o pertenecen todos a las mismas playas de anidación.
- Caracterizar genéticamente la muestra con marcadores nucleares como microsatélites, para poder evaluar el aporte y comportamiento de los machos, responsables del flujo génico.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu Grobois, A., Horrocks, J., Formia, A., LeRoux, R., Velez-Zuazo, X., Dutton, P., Soares, L., et al. (2006). New mtDNA dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution capacity of mixed stock analysis. *Poster presented at the 26th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, Crete, Greece.*
- Alfaro-Shigueto, J., Mangel, J., Seminoff, J., & Dutton, P. (2008). Demography of loggerhead turtles *Caretta caretta* in the southeastern Pacific Ocean: fisheries-based observations and implications for management. *Endangered Species Research, 5*, 129–135.
- Andreani, G., Santoro, M., Cottignoli, S., Fabbri, M., Carpenè, E., & Isani, G. (2008). Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *The Science of the total environment, 390*(1), 287–294.
- Avise, J., Arnold, J., Ball, M., Bermingham, E., Lamb, T., Niegel, J., Reeb, C., & Saunders, N. (1987). Intraespecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics, 18*, 489–522.
- Avise, J. (1998). Conservation Genetics in the Marine Realm. *Journal of Heredity, 89*(5), 377–382.
- Bass, A., Epperly, S., & Braun-McNeill, J. (2004). Multi-year analysis of stock composition of a loggerhead turtle (*Caretta caretta*) foraging habitat using maximum likelihood and Bayesian methods. *Conservation Genetics, 5*, 783–796.

- Bjorndal, K., Bolten, A., & Martins, H. (2000). Somatic growth model of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta*: duration of pelagic stage. *Marine Ecology Progress Series*, 202, 265–272.
- Bjorndal, K., & Bolten, A. (2003). From Ghosts to Key Species : Restoring Sea Turtle Populations to Fulfill their Ecological Roles. *Marine Turtle Newsletter*, 100(100), 16–21.
- Bjorndal, K., & Jackson, J. (2003). Roles of sea turtles in marine ecosystems: reconstructing the past. In: *The Biology of Sea Turtles, volume II*. (Vol. II, Pp 259-273) .Lutz, P., Musick, J., & Wyneken, J. (Eds.). CRC Press.
- Blumenthal, J., Abreu-Grobois, F., Austin, T., Broderick, C., Bruford, M., Coyne, M., Ebanks-Petrie, G., et al. (2009). Turtle groups or turtle soup: dispersal patterns of hawksbill turtles in the Caribbean. *Molecular Ecology*, 18(23), 4841–4853.
- Bolten, A., Bjorndal, K., Martins, H., Dellinger, T., Biscoito, M., Encalada, S., & Bowen, B. (1998). Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecological Society of America*, 8(1), 1–7.
- Bolten, A. (2003a). Active Swimmers - passive drifters: the oceanic juvenile stage of loggerheads in the Atlantic system. *Loggerhead Sea Turtles* (pp. 63–78).
- Bolten, A. (2003b). Life history patterns of sea turtles: consequences of an oceanic juvenile stage. In: *The Biology of Sea Turtles, volume II*. (Vol. II, pp. 243–257). Lutz, P., Musick, J., & Wyneken, J. (Eds.). CRC Press.

- Bowen, B., & Avise J. (1995). Conservation genetics of marine turtles. In: *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. (Pp 190-237). Avise, J., & Hamrick, L. (Eds.). Chapman & Hall, New York.
- Bowen, B., Bass, A., Chow, S.-M., Bostrom, M., Bjorndal, K., Bolten, A., Okuyama, T., et al. (2004). Natal homing in juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology*, 13(12), 3797–3808.
- Bowen, B., Bass, A., Soares, L., & Toonen, R. (2005). Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology*, 14(8), 2389–402.
- Bowen, B., & Karl, S. (2007). Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology*, 16(23), 4886–4907.
- Boyle, M., Fitzsimmons, N., Limpus, C., Kelez, S., Velez-Zuazo, X., & Waycott, M. (2009). Evidence for transoceanic migrations by loggerhead sea turtles in the southern Pacific Ocean. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 276(1664), 1993–9.
- Campbell, L. (2003) Contemporary culture, use, and conservation of sea turtles. In: *Biology of Sea Turtles, Volume II*. Lutz, P.L., Musick, J.A., Wyneken, J. (eds.) CRC Press, Boca Raton, pp. 307-338.
- Campbell, L., Silver, J., Gray, N., Ranger, S., Broderick, A., Fisher, T., Godfrey, M., et al. (2009). Co-management of sea turtle fisheries: Biogeography versus geopolitics. *Marine Policy*, 33(1), 137–145.

- Caraccio, M. N. (2008). *Análisis de la composición genética de Chelonia mydas (tortuga verde) en el área de alimentación y desarrollo de Uruguay*. Universidad de la República.
- Caraccio, M. N., Domingo, A., Márquez, A., Naro-Maciel, E., Miller, P., & Pereira, A. (2008). Las aguas del atlántico sudoccidental y su importancia en el ciclo de vida de la tortuga cabezona (*Caretta caretta*): Evidencias a través del análisis del ADNmt. *Collective Volume of Scientific Papers ICCAT*, 62(6), 1831–1837.
- Carr, A. (1975). The Ascension Island Green Turtle Colony. *Copeia*, 3, 547–555.
- Carr, A. (1987). New perspectives on the pelagic stage of sea turtle development. *Conservation Biology*, 1, 103–120.
- Carreras, C., Pont, S., Maffucci, F., Pascual, M., Barceló, A., Bentivegna, F., Cardona, L., et al. (2006). Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns. *Marine Biology*, 149(5), 1269–1279.
- Chacon, D., Dick, B., Harrison, E., Sarti, L., & Solano, M. (2008). *Manual sobre técnicas de manejo y conservación de las tortugas marinas en playas de anidación de Centroamérica* (p. 56).
- Dodd, K. (1988). *Synopsis of the biological data on the Loggerhead Sea Turtle Caretta caretta (Linnaeus 1758)*. U.S Fish Wildlife Service, Biological Report (Vol. 88, p. 110).

- Domingo, A., Bugoni, L., Prosdocimi, L., Miller, B., Giffoni, B., & Laporta, M. (2005). *Diagnóstico de Situación: Las Tortugas Marinas y su Interacción con las Pesquerías en el Océano Atlántico Sur Occidental (ASO)* (p. 21).
- Domingo, A., Bugoni, L., Prosdocimi, L., Miller, P., Laporta, M., Monteiro, D., Estrades, A., et al. (2006). *El impacto generado por las pesquerías en las tortugas marinas en el Océano Atlántico Sud Occidental* (p. 72).
- Domingo, A., Barceló, C., Swimmer, Y., & Miller, P. (2009). Anzuelos circulares vs. anzuelos "J" en la flota palangrera uruguaya. *Collective Volumes of Scientific Papers. ICCAT, 64(7)*, 2427–2442.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution, 39(4)*, 783–791.
- Frazier, J. (2005). Marine Turtles : The Role of Flagship Species in Interactions Between People and the Sea. *Maritime Studies, 3(2)*, 5–38.
- Giffoni, B., Domingo, A., Sales, G., Fiedler, F. N., & Miller, P. (2008). Interacción de tortugas marinas (*Caretta caretta* y *Dermochelys coriacea*) con la pesca de palangre pelágico en el Atlántico Sudoccidental: Una perspectiva regional para la conservación. *Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT, 62(6)*, 1861–1870.
- Godley, B., Barbosa, C., Bruford, M., Broderick, A., Catry, P., Coyne, M., Formia, A., et al. (2010). Unravelling migratory connectivity in marine turtles using multiple methods. *Journal of Applied Ecology, 47*, 769–778.

- Guerrero, R., & Piola, A. (1997). Masas de agua en la plataforma continental. *El mar argentino y sus recursos pesqueros*, 1, 107–118.
- Hamann, M., Godfrey, M., Seminoff, J., Arthur, K., Barata, P., Bjorndal, K., Bolten, A., et al. (2010). Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endangered Species Research*, 11(3), 245–269.
- Hawkes, L., Broderick, A., Godfrey, M., & Godley, B. (2009). Climate change and marine turtles. *Endangered Species Research*, 7, 137–154.
- Heithaus, M., Frid, A., Wirsing, A., & Worm, B. (2008). Predicting ecological consequences of marine top predator declines. *Trends in Ecology and Evolution*, 23(4), 202–210.
- Hendrickson, J. (1980). The Ecological Strategies of Sea Turtles. *American Zoology*, 20, 597–608.
- Jackson, J., Kirby, M., Berger, W., Bjorndal, K., Botsford, L., Bourque, B., Bradbury, R., et al. (2001). Historical Overfishing and the Recent Collapse of Coastal Ecosystems. *Science*, 293, 629–637.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.

- Kotas, J., & Gallo, B. (2004). Incidental capture of loggerhead (*Caretta caretta*) and leatherback (*Dermochelys coriacea*) sea turtles by the pelagic longline fishery off southern Brazil. *Fishery Bulletin*, 102(2), 393–399.
- Lara Ruiz, P., Lopez, G., Santos, F., & Soares, L. (2006). Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conservation Genetics*, 7(5), 773–781.
- Lee, P., Luschi, P., & Hays, G. (2007). Detecting female precise natal philopatry in green turtles using assignment methods. *Molecular Ecology*, 16, 61–74.
- Lewison, R., Freeman, S., & Crowder, L. (2004). Quantifying the effects of fisheries on threatened species: the impact of pelagic longlines on loggerhead and leatherback sea turtles. *Ecology Letters*, 7(3), 221–231.
- Lewison, R., & Crowder, L. (2007). Putting longline bycatch of sea turtles into perspective. *Conservation Biology*, 21(1), 79–86.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics Applications Note*, 25(11), 1451–1452.
- López-Mendilaharsu, M., Bauzá, A., Laporta, M., Caraccio, MN., Lezama, C., Calvo, V., Hernández, M., Estrades, A., Aisenberg, A. & Fallabrino, A. (2003). *Review and Conservation of Sea Turtles in Uruguay: Foraging habitats, distribution, causes of mortality, education and regional integration*. British Petroleum Conservation Programme. (p 109)

- López-Mendilaharsu, M., Sales, G., Giffoni, B., Miller, P., Niemeyer Fiedler, F., & Domingo, A. (2007). Distribución y composición de tallas de las tortugas marinas (*Caretta caretta* y *Dermochelys coriacea*) que interactúan con el palangre pelágico en el Atlántico sur. *Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT*, 60(6), 2094–2109.
- Marcovaldi, M., & Chaloupka, M. (2007). Conservation status of the loggerhead sea turtle in Brazil: an encouraging outlook. *Endangered Species Research*, 3, 133–143.
- McClellan, C., & Read, A. (2007). Complexity and variation in loggerhead sea turtle life history. *Biology Letters*, 3(6), 592–594.
- Medrano, J., Aasen, E., & Sharrow, L. (1990). DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8(1), 43.
- Miller, J. 1997. Reproduction in sea turtles. In: *The Biology of Sea Turtles*. (Pp 51-81). Lutz, P., & Musick, J. (Eds.). CRC Press.
- Monzón-Argüello, C., Rico, C., Carreras, C., Calabuig, P., Marco, A., & López-Jurado, L. F. (2009). Variation in spatial distribution of juvenile loggerhead turtles in the eastern Atlantic and western Mediterranean Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 373(2), 79–86.
- Moritz, C. (1994). Defining “ Evolutionarily Significant Units ”. *Trends in Ecology and Evolution*, 9(10), 373–375.
- Musick, J. & Limpus, C. (1997). Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: *The Biology of Sea Turtles*. (Pp 137-163). Lutz, P. & Musick, J. (Eds.). CRC Press.

- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA. 512 pp.
- Okuyama, T., & Bolker, B. (2005). Combining Genetic and Ecological Data To Estimate Sea Turtle Origins. *Ecological Applications*, *15*(1), 315–325.
- Pons, M., Domingo, A., Sales, G., Niemeyer Fiedler, F., Miller, P., Giffoni, B., & Ortiz, M. (2010). Standardization of CPUE of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) caught by pelagic longliners in the Southwestern Atlantic Ocean. *Aquatic Living Resources*, *23*(1), 65–75.
- Reis, E., Soares, L., Vargas, S., Santos, F., Young, R., Bjorndal, K., Bolten, B., et al. (2009). Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. *Conservation Genetics*, *11*(4), 1467–1477.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406–425.
- Sales, G., Giffoni, B., Miller, P., Laporta, M., & Maurutto, G. (2006). Captura incidental de tortugas marinas con palangre de Brasil y Uruguay. *Collective Volumes of Scientific Papers ICCAT*, *59*(3), 992–1002.
- Scott, R., Marsh, R., & Hays, G. (2012). Life in the really slow lane : loggerhead sea turtles mature late relative to other reptiles. *Functional Ecology*, *26*, 227–235.
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* *105*: 437-460.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–9.
- Tomás, J., Gozalbes, P., Raga, J., & Godley, B. (2008). Bycatch of loggerhead sea turtles: insights from 14 years of stranding data. *Endangered Species Research*, 5, 161–169.
- Troëng, S., & Drews, C. (2004). *Money Talks: economic aspects of marine turtle use and conservation* (p. 64).
- Vélez Rubio, G. (2011). *Estudio de los varamientos de tortugas marinas en Uruguay, un área crítica de alimentación y desarrollo en el Atlántico Sur Occidental*. Universitat de Valencia.
- Wallace, B., Heppell, S., Lewison, R., Kelez, S., & Crowder, L. (2008). Impacts of fisheries bycatch on loggerhead turtles worldwide inferred from reproductive value analyses. *Journal of Applied Ecology*, 45, 1076–1085.
- Wallace, B., Dimatteo, A., Hurley, B., Finkbeiner, E., Alan, B., Chaloupka, M., Hutchinson, B., et al. (2010). Regional Management Units for Marine Turtles : A Novel Framework for Prioritizing Conservation and Research across Multiple Scales. *PLoS ONE*, 5(12). doi:10.1371/journal.pone.0015465
- Wilson, E., Miller, K., Allison, D., & Magliocca, M. (2010). *Why healthy oceans need sea turtles: The importance of sea turtles to marine ecosystems* (p. 20).

ANEXO I

Para determinar el estadio de los individuos muestreados, se tomó como referencia el tamaño mínimo de las hembras en playas de anidación brasileras (Media LCC = 83 cm) (López-Mendilaharsu et al. 2007). Aquellos individuos que se encuentran por encima de ese valor fueron considerados como adultos y el resto como juveniles o subadultos.

Muestra	Fecha de colecta	Localidad	Departamento	LCC (cm)	Estadio
CCV 11	10/12/2001	Punta del Este	Maldonado	77	Juvenil-Subadulto
CCV 17	27/02/2002	Punta Carretas	Montevideo	68	Juvenil-Subadulto
CCV 19	24/03/2002	Carrasco	Montevideo	74,6	Juvenil-Subadulto
CCV 38	17/01/2003	Cerro Verde	Rocha	s/medida	Indet.
CCV 43	17/03/2003	Piriápolis	Maldonado	s/medida	Indet.
CCV 45	02/04/2003	Solymar	Canelones	100	Adulto
CCV 54	21/04/2003	La Pedrera	Rocha	97,5	Adulto
CCV 57	16/04/2003	La Paloma	Rocha	95,6	Adulto
CCV 91	02/02/2004	Punta del Diablo	Rocha	61,5	Juvenil-Subadulto
CCV 103	22/04/2004	La Coronilla	Rocha	s/medida	Indet.
CCV 197	03/09/2005	La Esmeralda	Rocha	s/medida	Indet.
CCV 224	09/02/2006	Barra del Chuy	Rocha	63,9	Juvenil-Subadulto
CCV 269	11/01/2007	La Coronilla	Rocha	s/medida	Indet.
CCV 278	27/01/2007	Santa Teresa	Rocha	58,4	Juvenil-Subadulto
CCV 285	30/01/2007	Válizas	Rocha	71	Juvenil-Subadulto
CCV 292	20/02/2007	La Coronilla	Rocha	70,7	Juvenil-Subadulto
CCV 314	06/01/2008	Cerro Verde	Rocha	59,3	Juvenil-Subadulto
CCV 317	03/02/2008	Carrasco	Montevideo	108,5	Adulto
CCV 318	11/02/2008	Bello Horizonte	Canelones	109	Adulto
CCV 323	12/03/2008	La Esmeralda	Rocha	68,4	Juvenil-Subadulto
CCV 339	17/12/2008	Punta del Diablo	Rocha	s/medida	Indet.
CCV 344	18/12/2008	La Coronilla	Rocha	62,4	Juvenil-Subadulto
CCV 347	09/01/2009	Santa Teresa	Rocha	96,4	Adulto
CCV 349	12/01/2009	La Paloma	Rocha	62,3	Juvenil-Subadulto
CCV 368	23/02/2009	La Coronilla	Rocha	52,2	Juvenil-Subadulto

ANEXO II

Protocolo de extracción de ADN utilizado en esta investigación.

EXTRACCION DE ADN (modificado de Medrano *et al.* 1990)

DIA 1

1. Cortar tejido con material estéril
2. Colocar en eppendorf
3. Centrifugo 1min. si la muestra fue conservada en alcohol para eliminarlo.
4. Se lava con buffer STE 1ml.
5. Centrifugo 1 min.
6. Descarto el STE
7. Agregar buffer de lisis (550 ul) + proteinasa K (10 mg/ml) (20 ul)
8. Dejar en baño a 55 °C con agitación dos horas, o a 37°C por toda la noche

Buffer de lisis

50mM Tris HCl, pH 8,0; 50mM EDTA, pH 8,0; 1% SDS; 100mM NaCl; 1% beta mercaptoetanol

Buffer STE

0.1M NaCl, 100mM Tris pH 8, 1mM EDTA pH 8

DIA 2

1. Adicionar 5,5 ul. RNAsa A y dejar incubando 1 hora mas a 55 °C
2. Centrifugar 14.000 rpm por 10 min.
3. Transferir sobrenadante a otro eppendorff y medir (ul.) con la pipeta
4. Agregar NaCl, lo tenemos a 5M, y lo tengo que llevar a 2M

$$V_i = \frac{V_f (\text{Sobrenadante}) \times 2 (\text{Concentración final})}{5 (\text{Concentración inicial})} = x$$

Hacer tabla

N° individuo	V.ini	V.ini X 0.66	V.ini + V.NaCl	(V.ini + V.NaCl) / 2	V.c/tubo*2
		V.NaCl		c/tubo	V.Etanol
	p.3	p.4		p.7	p.8

5. Vortexear 5 seg. cada muestra
6. Centrifugar 14000 rpm durante 30 min.
7. Distribuir el sobrenadante en dos tubos ependorff (aprox. 400ul. cada uno)
8. Adicionar el doble en volumen de Etanol absoluto frío (aprox. 800ul.) en este momento se debería observar el ADN
9. Se deja precipitando en la heladera toda la noche

DÍA 3

1. Centrifugar 30 min. a máxima rpm
2. Desechar sobrenadante
3. Adicional 1ml de Alcohol 70%
4. Centrifugar 5min. a 6000 rpm-descartar sobrenadante
5. Adicional 1ml de Alcohol 70%
6. Centrifugar 5min. a 6000 rpm- descartar sobrenadante
7. Incubar 30 min. a 37°C o hasta secar
8. Agregar 50 ul 1xTE (Tris EDTA o agua destilada)