

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Filogeografía de las Poblaciones de Tortuga Verde (*Chelonia
mydas*) del Ecuador**

Jhonnattan A. Valdés Uribe

Jaime A. Chaves, Ph. D, Director de Tesis

Tesis de Grado presentada como requisito
para la obtención del título de Licenciado en Biología

Quito, mayo de 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Filogeografía de las Poblaciones de Tortuga Verde (*Chelonia
mydas*) del Ecuador.**

Jhonnattan A. Valdés Uribe

Jaime A. Chaves, Ph.D.
Director de Tesis

Venancio Arahana, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Margarita Brandt, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.
Decana del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

Quito, mayo de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: Jhonnattan Alfonso Valdes Uribe
C. I.: 1718707548

Fecha: Quito, mayo de 2015

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación representa otro grano de arena para aumentar el conocimiento de la fauna marina presente en aguas del Ecuador, de manera específica este proyecto significa un incremento en la información sobre stocks poblacionales de tortugas verde (*Chelonia mydas*) que se encuentran en el país. De igual manera, este trabajo posee como enfoque el impulsar la investigación y conservación de todas las especies de tortugas marinas que surcan y anidan en aguas y playas Ecuatorianas. Por lo que este proyecto esta dedicado a la conservación de tortugas marinas en el Ecuador.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco ante todo a mi madre por impulsarme en la realización de mis estudios y a Vane por su apoyo y cariño constante. Especialmente, agradezco a todas las personas que tuvieron alguna colaboración durante el desarrollo de este proyecto; principalmente agradezco a mi director de tesis, Jaime A. Chaves por brindarme su guía y la oportunidad de realizar este proyecto de tesis, investigación que representa un gran logro personal debido a mi afinidad y preferencia hacia las tortugas marinas; a mis revisores: Venancio Arahana y Margarita Brandt, por sus consejos. Agradezco al Galápagos Science Center por permitirme utilizar sus instalaciones en la extracción de material genético, a Juan Pablo Muñoz por impulsar este proyecto al otorgar muestras e información para los análisis filogeográficos, también agradezco a Micaela Peña, Omar Torres y Gabriela Castillo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, quienes brindaron información de muestras de tortugas marinas verde de Machalilla y compartieron material para los análisis de laboratorio. De igual manera agradezco especialmente a Judith Dekinger por incentivar este proyecto, Antonio León y María de Lourdes Torres por permitirme trabajar en sus laboratorios durante el desarrollo y análisis de la investigación, así como a los asistentes del laboratorio de Biotecnología Agrícola y Alimentos y el laboratorio de Biotecnología Vegetal; en especial a Noelia Barriga y Estefanía Rojas por apoyarme y guiarme en varios procesos durante el desarrollo de la tesis. Finalmente agradezco a la USFQ por financiar este proyecto de tesis por medio de su programa de Becas Chancellor Grant.

RESUMEN

Secuencias de ADN mitocondrial fueron analizadas para determinar la filogeografía de las poblaciones de tortuga verde (*Chelonia mydas*) del Ecuador, en conjunto con la estructura genética y conectividad interpoblacional de tortuga verde (*Chelonia mydas*) de la costa continental del Ecuador y la Isla San Cristóbal, Galápagos. El análisis de secuencias junto con haplotipos reportados para la región identificó 9 haplotipos entre 85 individuos pertenecientes a tres agregaciones de forrajeo (Machalilla, Isla de La Plata y San Cristóbal) y dos colonias reproductivas (Machalilla e Isla de la Plata), indicando que no existe diferenciación genética ente grupos presentes en el Ecuador y existe una fuerte conectividad entre Galápagos y el Ecuador continental. Galápagos posee una composición de individuos de múltiples orígenes, y demuestra ser una zona de alta diversidad haplotípica y el Ecuador continental mantiene la resiliencia de esta diversidad, relaciones filogenéticas demuestran que la composición genética del Ecuador se encuentra fraccionada en diferentes clados del Pacífico Tropical Oriental; los cuales poseen diferente tiempo de origen. Por lo que los procesos de colonización en esta región del Pacífico se dieron de manera múltiple y ocurrieron a través de tres rutas (Pacífico Occidental, Pacífico Central/Nororiental y Pacífico Oriental).

Las poblaciones de *C. mydas* presentes en el Ecuador representan para la diversidad del Pacífico Oriental centros de diversidad de gran importancia, por lo que se debe generar información sobre la conectividad entre la región insular y el Ecuador continental, para realizar un manejo adecuado de esta especie que esta amenazada a causa de actividades antropogénicas.

ABSTRACT

Mitochondrial DNA sequences were analysed to define the phylogeography of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) populations in Ecuador, as well as its genetic structure and interpopulation connectivity between mainland Ecuador coast and San Cristóba Island from the Galápagos. The analysis of sequences witin combination with previously reported haplotypes in the region, allowed to identify nine haplotypes among 85 individuals from three foraging aggregations (Machalilla, Isla de La Plata and San Cristóbal) and two nesting colonies (Machalilla and Isla de la Plata). Our results, showed no genetic differentiation among groups present in Ecuador and a strong connectivity between Galapagos and mainland Ecuador. Galápagos has a composition of individuals from multiple origins and shows to be a place with high haplotipic diversity. Phylogenetic relationships suggested that Ecuadorian genetic composition is fractionated in different clades from Eastern Tropical Pacific havinf its origins at different time periods. So, we suggest that the processes of colonization in the Pacific happened in multiple alternative ways and occurred through three routes (Western Pacific, Central Pacific/North Eastern Pacific and Eastern Tropical Pacific).

C. mydas populations from Ecuador represents an important pool of diversity in the Eastern Tropical Pacific. Therefore, more research must be done to generate information about connectivity between Galápagos and mainland Ecuador, this allows to conduct a proper conservationist management of this species that is threatened due to anthropogenic activities.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
TABLAS	9
FIGURAS	10
ANEXOS	12
INTRODUCCIÓN	13
Justificación	19
METODOLOGÍA	20
Área de estudio	20
Colección de muestras	20
Caracterización de haplotipos de ADN mitocondrial	21
Análisis molecular	23
RESULTADOS	26
Diversidad genética de las colonias reproductivas y de las agregaciones de forrajeo	26
Estructura genética poblacional	27
Análisis filogenético e historia demográfica	28
DISCUSIÓN	30
Estructura genética poblacional	30
Relación filogenética	32
Origen y rutas	33
Implicaciones en la conservación	36
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS	40
TABLAS	44
FIGURAS	47
ANEXOS	57

TABLAS

Tabla 1: Concentración de reactivos para la reacción PCR.....	44
Tabla 2: Programación de termociclador para la amplificación de 832 pares de bases de la secuencia de ADN mitocondrial con los primers LTEi9 y H950-H950g	44
Tabla 3: Determinación del número de individuos para cada haplotipo reportado en estudio según la colonia de anidación y agregación de forrajeo presentes en el Ecuador.	44
Tabla 4: Resumen de la diversidad de ADN mitocondrial de muestras de colonias de anidación y agregaciones de forrajeo de <i>Chelonia mydas</i> en Ecuador.....	45

Tabla 5: Estimaciones de las frecuencias haplotípicas de dos colonias de anidación y tres agregaciones de forrajeo en aguas Ecuatorianas.....46

Tabla 6: Resultados AMOVA para cada configuración grupal después de 1000 permutaciones, cada configuración grupal fue comparada individualmente y después pareada para comprobar la presencia de subdivisiones poblacionales; con excepción de una comparación general de todo el Ecuador y subgrupos: [FGal][Machalilla], [Anidantes][Forrajeo] y el análisis mas completo [AC][AI][FC+FI][FGal], en cada análisis se llevo a cabo el porcentaje de variación explicada entre grupos (Φ_{CT}), dentro de poblaciones (Φ_{ST}) y entre poblaciones dentro de sus grupos (Φ_{SC}).46

FIGURAS

Figura 1: Árbol bayesiano de las relaciones genéticas entre especies de tortugas marinas para el gen COI en la región de ADN mitocondrial, calibrado a partir de datos fósiles (50.24 ± 6.55 Ma) para la divergencia entre los grupos Chelonidae y Dermiochelis y un reloj molecular de 0.2 subs/sitio/Ma (Near et al. 2005).47

Figura 2: Ciclo de vida de tortugas marinas (Jensen. 2010).48

Figura 3: Densidad de *Chelonia mydas* basado en telemetría satelital, revelando la falta de informacion entre Galápagos y el Ecuador continental (Kot et al. 2015).49

Figura 4: Mapa de la zona de estudio Isla San Cristóbal en las Islas Galápagos y el Parque Nacional Machalilla incluyendo la Isla de la Plata en la provincia de Manabí en el Ecuador continental.50

Figura 5: Región control “d-loop” de ADN mitocondrial amplificada (Jensen. 2010).....51

Figura 6: “Minimum Spanning Network” según el numero de individuos y color del sitio donde fueron encontrados los haplotipos, el network representa la red más

parsimoniosa de relaciones entre haplotipos de acuerdo la distancia de sus diferencias genéticas medida en pares de bases (haplotipos Hap9 y CmP97.1 poseen diferencias de 2 pb y 32 pb respectivamente con su haplotipo mas emparentado, los haplotipos restantes poseen diferencias de 1 pb ente sí).52

Figura 7: Árbol filogenético Bayesiano de valores >70% de probabilidad posterior, entre haplotípos de ADNmt de *Chelonia mydas* únicos para regiones del Pacífico y aquellos encontrados en colonias reproductivas y agregaciones de forrajeo del Ecuador; representa la división de clados entre el Pacífico Central/Nororiental y el Pacífico Oriental, mientras que  representa cada subclados formados después de 1000 replicaciones bootstrap mediante el parámetro de probabilidades posteriores GTR + G+I.53

Figura 8: Árbol filogenético Bayesiano de todos los valores de probabilidad posterior (%HPD) y su desviación estándar, entre haplotípos de ADN mt de *Chelonia mydas* únicos para varias regiones del Pacífico después de 1000 replicaciones bootstrap mediante el parámetro de probabilidades posteriores GTR + G+I.54

Figura 9: Filogénia de haplotípos de *Chelonia mydas* reportados para varias regiones del Pacífico y aquellos encontrados en colonias reproductivas y agregaciones de forrajeo del Ecuador, revelando los tiempos de divergencia calculados mediante BEAST;  es la división de clados entre el Pacífico Central/Nororiental y el Pacífico Oriental,  son todos los sub-clados.55

Figura 10: Tiempo de divergencia y filogenia de los haplotípos únicos de *Chelonia mydas* reportados y sus intervalos de 95% HPD con sus desviaciones estándar como barras azules horizontales.....56

ANEXOS

Anexo 1: Secuencias de GenBank de la región control de ADNmt y designación de haplotipos provenientes del Pacífico central, occidental y oriental (Dutton et al. 2014).....	57
Anexo 2: Clasificación de haplotipos según la colonia reproductiva y agregación de forrajeo del Ecuador.	58

INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas se separaron en un evento independiente de las tortugas terrestres hace ca.220 millones de años (Ma) (Figura 1), estos grupos surgieron a partir de un grupo hermano de los parareptiles (Parham y Pyenson. 2010; Wang et al. 2013). La tortuga marina verde (*Chelonia mydas*) aparece como especie ancestral hace ca. 34 Ma (Figura 1), y se ha adaptado a cambios en los niveles oceánicos y cambios climáticos durante estos periodos (Hamabata et al. 2014). Pese a esto, *C. mydas* no ha sufrido cambios drásticos en su morfología poseyendo una conservación morfológica alta y como característica genética una tasa de divergencia baja (Parham y Pyenson. 2010; Wang et al. 2013). Esta especie se distribuye en aguas tropicales y subtropicales a nivel global, son animales altamente migratorios con un origen evolutivo antiguo e historia de vida compleja que conlleva hábitats tanto terrestres como marinos (Vieyra. 2006, Dutton et al. 2014).

La historia de vida de *C. mydas* se caracteriza por presentar ciclos de vida que ocurren en hábitats neríticos y pelágicos, neríticos en el desarrollo en mar abierto de los neonatos y las rutas de desplazamiento de los adultos; pelágicos cuando juveniles y adultos se concentran en ecosistemas benthicos de forrajeo y reproducción sobre la plataforma continental (Jensen. 2010) (Figura 2). Al eclosionar los neonatos (<30 cm de longitud de caparazón) son dispersados por corrientes oceánicas y pasan los primeros años de su vida en una fase pelágica conocida como "años perdidos", antes de su transición hacia un desarrollo costero y nerítico en las zonas de forrajeo antes de alcanzar un tamaño mayor (ca. 35-40 cm) (Bowen et al. 1992., Dutton et al. 2008., Jensen. 2010., Dutton et al. 2014). Los juveniles se desarrollan y movilizan entre zonas de forrajeo, mientras que los adultos son post-pelágicos y realizan varias migraciones globales entre las zonas de alimentación y los sitios de apareamiento (Vieyra. 2006). El

uso de hábitat de las tortugas verdes aún no está completamente claro; sin embargo, estudios de telemetría demuestran que su historia de vida es flexible, es decir, no presentan un tamaño corporal determinado para utilizar hábitats neríticos, debido a que los hábitats pelágicos son compartidos por adultos, sub-adultos y juveniles (Nishizawa and Hayashi. 2015). Además, el comportamiento de filopatría hacia las zonas de reproducción, en especial en las hembras, se encuentra ampliamente estudiado (Roden et al. 2013., Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2014) y se cree que la filopatría se forma debido al período de impronta, cuando los neonatos emergen del nido y se desplazan al mar (Carr. 1980., Vierya. 2006., Jensen. 2010., Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2014).

Las características del ciclo de vida forjan las poblaciones de tortugas verdes y los individuos que las conforman, las poblaciones de *C. mydas* se pueden definir como colonias reproductivas ligadas a sitios geográficos específicos (Dutton et al. 2008). Bajo este parámetro, los estudios poblacionales de esta especie se realizan en diferentes escalas geográficas. En muchas regiones la estructura poblacional y la historia evolutiva de tortugas verdes no está completamente clara, en el Pacífico Oriental aún no se le ha dado suficiente importancia a los patrones de colonización y los factores que han determinado la composición genética actual de las poblaciones en la región (Dutton et al. 2014., Hamabata et al. 2014). La mayoría del conocimiento sobre genética de poblaciones en tortugas marinas verdes es información obtenida en períodos cortos de tiempo enfocados en áreas de anidación (Jensen. 2010). Estas investigaciones en conjunto con el marcaje, la telemetría y el uso de marcadores moleculares (ADN mitocondrial) han comprobando los aspectos de filopatría y la subdivisión de poblaciones de acuerdo a su línea maternal (Karl et al. 1992., Roden et al. 2013). De acuerdo a Jensen (2010) la contribución más importante de los estudios

de genética poblacional es dar a conocer la biología de las tortugas marinas confirmando el sitio de origen de adultos reproductivos, y el determinar el origen de tortugas marinas en sitios de forrajeo y rutas migratorias. Los datos que han arrojado estudios de composición genética en sitios de forrajeo, sustentan las hipótesis sobre el ciclo de vida expuesto para *C. mydas* (Lahanas et al. 1998). Es decir, las fuerzas que afectan la dispersión de esta especie son tanto intrínsecas (comportamiento) como extrínsecas (batimetría, temperatura de la superficie marina y corrientes superficiales) (Roden et al. 2013., Seminoff et al. 2008). De igual manera, la genética de poblaciones en *C. mydas* ha permitido determinar el origen de la composición haplotípica, y definir tanto los desplazamientos como las rutas de migración de individuos hacia otras regiones; revelando así los niveles de contribución genética y conectividad poblacional entre colonias (Dutton et al. 2014), la compartición de rutas migratorias y zonas de alimentación entre individuos genera la presencia de haplotipos comunes entre colonias que principalmente se encuentran próximas entre sí (Hamabata et al. 2014). Por otro lado, colonias separadas por distancias de más de 500 km son genéticamente diferentes entre sí ya que a distancias mayores la probabilidad de compartición de rutas de migración y zonas de alimentación disminuye. Otro aspecto importante es la baja diferenciación genética encontrada entre colonias dentro de una misma región oceánica lo cual puede ser explicado por un flujo genético asimétrico (desde el centro de dispersión hacia distribuciones periféricas) (Hamabata et al. 2014), sin embargo, la baja diferenciación entre algunas poblaciones puede estar explicada por colonizaciones históricas (Hamabata et al. 2014).

En *C. mydas* existe compartición de un origen ancestral próximo más no la presencia de flujo genético, sustentando el comportamiento filopátrico tanto de hembras como de machos hacia sus colonias reproductivas (Bowen et al. 1992., Roden et al.

2013). Esto se observa en individuos que se encuentran en regiones distantes de sus sitios de desplazamiento y colonias reproductivas, lo que sustenta la hipótesis de la presencia de caminos potenciales para colonizaciones históricas (Dutton et al. 2008). Por ejemplo, la composición haplotípica mitocondrial muestra la presencia de individuos con origen de Galápagos en el Pacífico Occidental y viceversa, ya que en el Archipiélago de Galápagos en el Ecuador, se han encontrado individuos con origen trans-oceánico (Seminoff et al. 2008., Dutton et al 2014., Naro-Maciel et al. 2014).

En el Ecuador, estudios previos de genética de poblaciones del Pacífico reflejan que existe una alta conectividad y un posible origen en común entre colonias de Galápagos, América Central (Michoacan, Revillagigedos y Costa Rica) y Colombia (Amorocho et al. 2012., Dutton et al. 2014); esto se sustenta por la presencia de haplotipos endémicos para la región y haplotipos divergentes con un posible origen en común. Se ha visto que a pesar de que individuos de cada colonia dentro de la región muestran alta filopatría, la composición genética es fraccionada y revela indicios de colonizaciones múltiples (Dutton et al. 2014). Análisis genéticos sugieren que la conectividad más clara se encuentra entre colonias de Costa Rica-Galápagos incluyendo a los individuos presentes en zonas de descanso y alimentación en el Pacífico Colombiano, no ocurre así en relación a las colonias de México (Michoacan y Revillagigedos); por lo que existe evidencia de colonizaciones históricas que muestran limitación geográfica de individuos originarios en el Pacífico Oriental Tropical (Amorocho et al. 2012., Dutton et al. 2014).

Estos estudios genéticos más allá de dar a conocer el origen y las potenciales rutas de migración, permiten identificar impactos y amenazas a poblaciones específicas de *Chelonia mydas* al ser definidas como unidades evolutivas de conservación, por lo que se puede identificar a poblaciones que se caracterizan por poseer trayectorias

evolutivas únicas a las cuales se les deba aplicar medidas únicas de conservación (Moritz, 1994). Globalmente, *C. mydas* se encuentra en la categoría de especie amenazada (IUCN, 2014), a pesar de su amplia distribución y de que las tortugas verdes generalmente anidan y forrajean en áreas protegidas. Sin embargo, las rutas migratorias no se encuentran protegidas de la explotación de recursos marinos (Seminoff et al. 2008). Entre los principales factores que amenazan a las poblaciones de *Chelonia mydas* están la pesca incidental, depredación de huevos, degradación de las playas, crecimiento de infraestructura en la línea costera, presencia de población humana y animales domésticos en áreas de anidación, iluminación artificial de playas, contaminación química y desperdicios sólidos; así como eventos naturales y ambientales de cambio climático (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2014).

La captura incidental de *Chelonia mydas* es la actividad que más amenaza a la especie, se estima que la captura incidental de tortugas marinas actual está en alrededor de 42000 tortugas por año, de las cuales el 80% de las capturas son de *Chelonia mydas* y se estima una tasa de captura de 0.079 individuos por cada 100 anzuelos (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2014., SWoT, 2014); regiones costeras de Ecuador y Perú presentan niveles altos de captura directa e indirecta. Esto tiene un gran efecto en las poblaciones de Galápagos, que vieron una disminución en la concurrencia de hembras anidantes entre los años 2000 al 2006 (Seminoff et al. 2008). En la Reserva Marina de Galápagos la incidencia de tortugas marinas con señales de choque de bote ha incrementado; se comprobó que la incidencia de choques varía entre 16-20% siendo mayor el porcentaje en la época de anidación (Denkinger et al. 2013). Conocimiento sobre dispersión oceánica y conectividad entre las agregaciones de forrajeo insulares y las colonias reproductivas del continente, pueden mostrar las amenazas a las que son más susceptibles los individuos dentro de la composición genética del Ecuador

(Seminoff et al. 2008). Esta información permite enfocar la conservación en las rutas migratorias y poblaciones específicas en declive (Seminoff et al. 2008), lo cual es importante ya que el estado de las poblaciones de *Chelonia mydas* refleja la salud y resiliencia de ecosistemas de pastos marinos y arrecifes de coral (Chaloupka et al. 2008).

En el Ecuador, *C. mydas* es la única especie que anida en el Galápagos y se la encuentra de forma esporádica en algunos sitios a lo largo de la línea costera. Las mayores conglomeraciones se dan en la provincia de Manabí (Machalilla e Isla de la Plata) que son hábitats importantes para la reproducción, forrajeo y descanso (Peña-Mosquera et al. sf) al presentar condiciones óptimas como una alta productividad (Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2007). En Galápagos la reproducción y anidación son seguidas por migraciones limítrofes hacia América Central y América del Sur en dirección a zonas de forrajeo en Nicaragua y Costa Rica en el noroeste, hacia Panamá pasando por islas con zonas de alimentación y descanso importantes como Malpelo y Gorgona en Colombia (Seminoff et al. 2008., Amorocho et al. 2012). Se conoce además, que existen individuos residentes del Archipiélago y otros individuos que se dispersan hacia el Pacífico Occidental al suroeste del Archipiélago probablemente dirigidos por la Corriente Ecuatorial del Sur y los vientos del Este (Seminoff et al. 2008., Amorocho et al. 2012., Roden et al. 2013).

Pese a toda esta información existente sobre *C. mydas*, y en especial en el Ecuador, existen vacíos grandes en lo que se refiere a la diversidad de las colonias reproductivas y de las agregaciones de forrajeo; a la estructura poblacional y a la historia demográfica de estas poblaciones. De igual manera, poco se conoce sobre la conectividad genética que existe entre las poblaciones de Galápagos y del Continente. Adicionalmente, no existen análisis poblacionales que incluyan a estas poblaciones

costeras del Ecuador lo cual limita nuestro conocimiento de, no solo la composición genética de estos individuos, pero de las potenciales amenazas para la conservación de estos grupos en el Ecuador.

Justificación

Existe gran deficiencia de información sobre las poblaciones de tortuga verde en el Ecuador continental e insular, los esfuerzos de manejo y conservación de esta especie pueden ser mejorados al identificar la composición genética, conexiones poblacionales y patrones de desplazamiento existentes. Las poblaciones anidantes y de alimentación de tortuga verde se encuentran en peligro a causa de la actividad humana y la protección de la especie es inútil si no se tiene conocimiento de los riesgos que enfrentan individuos de diversas colonias en las rutas migratorias y las zonas de alimentación (Meylan et al. 1990). El presente estudio busca determinar 1) la genética de poblaciones de tortugas verdes (*Chelonia mydas*) de la costa continental del Ecuador y de las Islas Galápagos, 2) la conectividad genética entre estas dos regiones del Ecuador, 3) las afinidades genéticas de las poblaciones del Ecuador con otras colonias del Pacífico, e 4) inferir las posibles rutas de colonización históricas que dieron origen a las composición genética de las poblaciones del Ecuador. Los resultados serán relevantes para el estatus y la actual conservación de las poblaciones de tortugas marinas del Ecuador y del Pacífico Oriental Tropical.

METODOLOGÍA

Área de estudio

El sitio de estudio fue la Isla San Cristóbal en el Archipiélago de Galápagos y el Parque Nacional Machalilla incluyendo la Isla de la Plata (Figuras 4). La Reserva Marina de Galápagos esta formada por 19 islas grandes y cientos de islotes, está localizada a una distancia ca.1000 Km de la costa continental del Ecuador (Figura 5) y ofrece un refugio de 138.000 Km² para especies marinas (Seminoff et al. 2008).

El Parque Nacional Machalilla (01°31'S 80°42'O) se encuentra ubicado en el Ecuador Continental al Sur Oeste de la provincia de Manabí (Figura 4), posee una extensión de 55.095 hectáreas terrestres y dos millas marítimas a lo largo de la costa; se caracteriza por poseer sistemas rocosos y arrecifes coralinos (Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2007., Peña-Mosquera et al., 2009). La Isla de la Plata (1°16'55"S; 81°3'84"O) (Figura 8) es una isla continental de 14 km² de extensión con una distancia ca. 40 Km de tierra firme, es históricamente conocida por la alta presencia de individuos de *Chelonia mydas* en sus aguas, especialmente en la Bahía Drake que posee aguas someras, fondos arenosos y arrecifes rocosos.

Colección de muestras

Se contó con muestras de tejido de individuos capturados presentes en congregaciones de forrajeo de la Isla San Cristóbal, Galápagos (n = 41) provenientes de cinco localidades en la parte Suroeste de la Isla. Adicionalmente se utilizaron muestras de individuos pertenecientes a dos colonias de anidación y forrajeo en el Ecuador continental (Machalilla e Isla de la Plata, n= 44) contabilizando un total de 85 muestras analizadas.

Caracterización de haplotipos de ADN mitocondrial

Las muestras de tejido de las zonas de forrajeo de San Cristóbal, Galápagos (n = 41) y fueron preservadas en alcohol al 99%. De cada individuo se registraron los tags de los individuos, la locación y el sexo. El ADN mitocondrial (ADNmt) fue extraído mediante el kit “Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit (50)” (Qiagen, USA) siguiendo el protocolo del fabricante (Dutton et al. 2008., Amorocho et al. 2012., Dutton et al. 2014). La calidad y cantidad de ADNmt fue medida con NANODROP 1000 (ThermoScientific) (Crawford et al. 2015), verificada mediante gel de agarosa al 1% y visualizada con el uso de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) y fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD).

La amplificación se realizó mediante PCR utilizando los primers homólogos LTEi9 (5“GAATAATCAAAAGAGAAGG3”) y H950 (5“GTCTCGGATTTAGGGGTTT3”) (Abreu-Grobois et al. 2006). Estos primers amplifican una secuencia de ca.832 pares de bases (pb) del extremo 5´ de la región control de ADN mitocondrial (Figura 5) (Jensen. 2010., Dutton et al. 2013) y la implementación de secuencias largas permiten dar una nueva resolución a haplotipos previamente reportados (Jensen. 2010). Los extremos de las secuencias amplificadas fueron cortados para estandarizar las alineaciones con las secuencias de Machalilla y La Plata de ca.679 pb.

La amplificación PCR fue establecida para una reacción entre 25-50 µl, la cantidad de template de ADN y programación de termociclador variaron según las cantidades y calidades de ADNmt presente en cada muestra; la reacción de PCR contuvo 1X buffer de reacción, 0.25 mM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 10 µM de cada primer “forward” y “reverse”, 1.25 U de Taq polimerasa y alrededor de 40 ng de template (Tabla 1) (Jensen. 2010). La amplificación se realizó con un termociclador T

Personal Thermocycler (Biometra) programado para un paso inicial de desnaturalización a 94-96°C por 3 min, seguido de 35-45 ciclos por 30s a 94-96°C (desnaturalización), 30s a 55°C (annealing), 1:30 min a 72°C (extensión), 10 min a 72°C (elongación) y un paso final de conservación de tiempo indefinido a 4°C (Tabla 2).

Los productos de PCR fueron comprobados por la presencia de las bandas de amplificación esperadas, visualizadas en un gel de agarosa al 1% utilizando 3 µl de producto PCR teñido con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). Los geles fueron revelados en el fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD) y las muestras que amplificaron correctamente fueron purificadas siguiendo el protocolo ExoSap al 20% (ExoStar) que consiste de 1 ciclo de: 30 min-37°C, 15 min 80°C y 4°C finales, para ser finalmente enviadas a secuenciar.

La secuenciación tanto “forward” como “reverse” se llevó a cabo mediante Macrogen, Inc (USA) y las secuencias resultantes fueron compiladas como archivos FASTA (Crawford et al. 2015), a través de los softwares Geneious v. 8.0.5 y Mega v. 6.06 en conjunto con las secuencias del Ecuador continental. Todas las secuencias fueron alineadas mediante la opción Clustal W (Jensen. 2010) y comparadas con haplotipos de secuencias largas de *Chelonia mydas* pertenecientes a distintas regiones del Pacífico (Anexo 1) (Dethmers et al. 2010., Dutton et al. 2014).

Comparaciones con los softwares *DNA Sequence Polymorphism* v. 5 y ARLEQUIN v. 3.5.1.2 permitieron clasificar los haplotipos presentes en Galápagos y en las poblaciones de anidación y forrajeo del Ecuador continental con aquellos haplotipos reportados previamente para el Pacífico, identificando el número de individuos que presentan el haplotipo y el sitio en que fue encontrado (Tabla 3); los

haplotipos que no han sido reprotados fueron denominados temporalmente como Hap#.

Análisis molecular

La diversidad genética fue medida utilizando estimaciones de diversidad de haplotipos (Hb) y nucleótidos (π) mediante el software ARLEQUIN v. 3.5.1.2, Hb se estimó en base a la teoría neutral de Nei y π mediante el modelo de Tamura y Nei (Jensen. 2010., Dutton et al. 2014). El índice de Hb toma en cuenta el número de haplotipos dentro de una población con su frecuencia y π considera el número de mutaciones entre haplotipos (Jensen. 2010). Estimaciones para ambas medidas de diversidad van de 0 a 1, un nivel alto Hb indica una alta diversidad y un nivel alto π indica que los haplotipos de una población son divergentes o pertenecen a sitios de origen diferentes (Jensen. 2010). Una prueba χ^2 entre las frecuencias haplotípicas permitió determinar los cambios en las frecuencias entre grupos poblacionales.

Una prueba AMOVA después de 10000 permutaciones al azar con el software ARLEQUIN v. 3.5.1.2 determinó la diferenciación genética en base a la variabilidad genética encontrada (Dethmers et al. 2006., Jensen. 2010., Dethmers et al. 2010., Dutton et al. 2014), utilizando valores comparativos pairwise de estadísticos F convencionales $[\Phi_{ST}(\text{entre poblaciones})]$, $\Phi_{SC}(\text{dentro de grupos})$ y $\Phi_{Ct}(\text{grupos entre poblaciones})$. Para esto se generaron grupos artificiales basados en la distribución geográfica, y en el ciclo de vida de *C. mydas*: [Anidación Machalilla (AC), Anidación Isla de la Plata (AI), Forrajeo Continente (FC+FI) y Forrajeo Galápagos (FGal)] con los que se realizan combinaciones que comprueben la diferencia genética. Los estadísticos F van de 0-1 y la interpretación de estos valores es: de 0.0-0.05 nivel bajo de diferenciación genética, 0.05-0.15 diferenciación genética

moderada, 0.15-0.25 diferenciación genética considerable y a partir de 0.25 una diferenciación genética grande (Wright. 1978).

Se generó un network parsimónico de haplotipos mediante los software TCS v. 1.2.2 y ARLEQUIN v. 3.5.1.2 (Dutton et al. 2014) para determinar patrones de variación de acuerdo a la distancia entre haplotipos, por último se construyó una relación filogenética con inferencia Bayesiana entre haplotipos reportados por Dutton et al (2014) para el Pacífico; con aquellos encontrados en este estudio mediante el programa MrBayes v. 3.2 con el análisis Markov Chain Monte Carlo (mcmc) (Chaves et al. 2007).

El análisis se evaluó usando el modelo de evolución [GTR + I + G (freq. A= 0.3320; freq. C =0.2140; freq. G =0.1408; freq. T =0.3132)] y parámetro de forma de distribución (gamma= 0.1640) obtenido por Jmodeltest (Dutton et al. 2014). El análisis filogenético se corrió usando 2 millones de generaciones generando 1000 árboles de los cuales se descartaron los primeros 500 árboles (Chaves et al. 2007).

Además se corrió un análisis paralelo para determinar el tiempo de divergencia de los clados encontrados. Para esto se utilizaron las mismas secuencias que el análisis anterior utilizando BEAST v. 1.7.5. Este análisis se corrió por 5 millones de generaciones, usando un reloj molecular estricto de 0.01751 subs/sitio/Ma y un árbol aleatorio inicial (tree prior speciation: yule process) (Dutton et al. 2014). Todos los análisis filogenéticos utilizaron a *Natator depressus* (GenBank acc. No. U40662) como grupo externo. Los valores de probabilidad generados por BEAST fueron evaluados por el software TRACER v. 1.5 (Dutton et al. 2014), hasta obtener valores ESS > 200. Los árboles resultantes fueron condensados en TREEANNOTATOR (Patricio et al. 2012) y editados en FIGTREE v. 1.4.0 (Patricio et al. 2012). Solo se

presentaron resultados correspondientes a clados con una probabilidad superiores o igual a 95% (Chaves et al. 2007).

RESULTADOS

En las siguientes secciones de resultados y discusión las agregaciones de anidación y forrajeo se tratan por separado, sin embargo las congregaciones forrajeo de Machalilla y la Isla de Plata se consideran como una sola unidad en comparación a la agregación de forrajeo de San Cristóbal, Galápagos debido a que Machalilla y la Isla de la Plata solo se encuentran separadas por una distancia de 40 Km.

Diversidad genética de las colonias reproductivas y de las agregaciones de forrajeo

Las secuencias analizadas de la región control de ADNmt pertenecientes a colonias de anidación en el Ecuador continental Machalilla (AC) e Isla de la Plata (AI) poseen dos y tres sitios polimórficos respectivamente (Tabla 4). Existen tres haplotipos para AC y cuatro para AI; AI presenta un haplotipo único que no se encuentra compartido (Anexo 1). Hb fue alto en ambas colonias, mientras que π fue baja y similar entre Machalilla e Isla de la Plata (Tabla 4); las frecuencias haplotípicas de AC y AI se encuentran resumidas en la Tabla 5 y las dos colonias reproductivas demostraron una diferencia baja de frecuencias haplotípicas que no fue significativa ($\chi^2 = 0.910$, $p = 0.8230$).

Las secuencias de las tres agregaciones de forrajeo de Machalilla (FC), Isla de la Plata (FI) y Galápagos (FGal) poseen dos, tres y 39 sitios polimórficos, respectivamente (Tabla 4); FC presenta tres haplotipos, FI cuatro haplotipos y FGal ocho haplotipos; las tres agregaciones de forrajeo muestran un Hb alto pero un π bajo (Tabla 4), siendo la agregación FGal la más diversa. Entre las agregaciones de forrajeo de FC y FI solo dos haplotipos se encuentran compartidos (Anexo 1), mientras que entre FGal y FC existen tres haplotipos compartidos al igual que entre FGal y FI (Anexo 1); FI presentó un haplotipo único y por su parte FGal posee cuatro haplotipos únicos, de los cuales los haplotipos Hap8 y Hap9 se determinaron como haplotipos

nuevos. Las frecuencias haplotípicas se observan en la (Tabla 5) y existe diferencia de estas entre FGal y FC + FI ($\chi^2 = 13.465$, $p = 0.09$); sin embargo, ésta no fue significativa.

En cuanto a la conectividad genética, la mayor compartición de haplotipos se da entre FGal y AI (Anexo 1); sin embargo, existe una diferencia entre las frecuencias de sus haplotipos ($\chi^2 = 7.089$, $p = 0.4196$) que no es significativa. Por otro lado FGal y AC comparten tres haplotipos (Anexo 1) y la diferencia entre la frecuencia de sus haplotipos es baja y no es significativa ($\chi^2 = 2.881$, $p = 0.8958$). La compartición de haplotipos entre la agregación de forrajeo FC y AC es solo de dos haplotipos, mientras que entre FC y AI son tres haplotipos; por último entre FI y AC existen tres haplotipos en común y entre FI y AI también se determinaron tres haplotipos comunes (Anexo 1). La diferencia de las frecuencias entre [FC+FI] y AC es baja y no es significativa ($\chi^2 = 2.966$, $p = 0.5635$). La diferencia de las frecuencias haplotípicas entre [FC+FI] y AI muestra una mayor diferencia en la frecuencia de haplotipos pero tampoco se muestra una diferencia significativa ($\chi^2 = 6.999$, $p = 0.1359$).

Estructura genética poblacional

La combinación [Ecuador] para determinar la diferencia genética de todos los grupos de este estudio muestra una diferenciación moderada ($\Phi_{Ct} = 0.0583$); sin embargo, el porcentaje que explica la variación encontrada en la población del Ecuador es considerablemente bajo 5.83% (Tabla 6). Las comparaciones de grupos realizadas en la combinación [FGal] [Mach] revelan que no existe diferenciación genética significativa entre Galápagos y Machalilla (Tabla 6). Pese a que el nivel de diferenciación encontrado entre grupos (Φ_{Ct}) en esta comparación es el más alto comparado con el resto de las diferentes configuraciones, el porcentaje que explica la

variación encontrada entre la región insular y el Ecuador continental es baja 16.78% (Tabla 6).

El grado de diferenciación genética entre las colonias de anidación continentales con las agregaciones de forrajeo [A][F] reveló una baja diferenciación genética para todas las comparaciones todas no significativas (Tabla 6) y el porcentaje que explica la variación existente es extremadamente bajo (0.47%; Tabla 6). Por último, la combinación de todos los grupos artificiales por separado [AC][AI][FC+FI][FGal] no fue significativa en ninguna comparación grupal y el porcentaje de variación explicada para estas divisiones poblacionales es de apenas 12.51% (Tabla 6).

La red de haplotipos o *Minimum Spanning Network* sustenta la falta de diferencia genética encontrada entre los grupos que componen las poblaciones del Ecuador (Figura 6). La red revela la conectividad entre Galápagos y el Ecuador continental al poseer los mismos haplotipos en ambas regiones, además de conexiones entre todos ellos de apenas una o dos pares de bases (Figura 6). Por otro lado, la red también recuperó una alta divergencia de un haplotipo presente en Galápagos característico del Pacífico Occidental (CmP97.1) el cual presenta una diferencia considerable de 32 pb (Figura 6).

Análisis filogenético e historia demográfica

El árbol de relación filogenética Bayesiana calibrado temporalmente en BEAST, muestra una división de dos clados con probabilidades posteriores (PP) de 1.0 (Figuras 7 y 8). Estos corresponden a los clados que contienen haplotipos del Pacífico Central/Oriental (Sub-clados I-V) y del Pacífico Occidental los cuales se separaron hace ca. 0.7949 Ma (95% HPD) (Figuras 11 y 12). El clado de los haplotipos del Pacífico Central/Oriental se divide en dos clados con una probabilidad posterior Bayesiana de 0.9 (Figuras 7 y 8) revelando la separación de los haplotipos del Pacífico

Central-Nororiental (Sub-clados I y II: Hawaii y Baja California) y los del Pacífico Oriental Tropical (Sub-clados III, IV y V: Michoacan, Revillagigedo, Costa Rica, Colombia y Ecuador) hace ca. 0.4891 Ma (95% HPD) (Figuras 9 y 10). El clado perteneciente al Pacífico Oriental Tropical (Sub-clados III, IV y V) es el clado más antiguo al formarse hace ca. 0.4451 Ma en comparación al clado del Pacífico Central-Nororiental (Sub-clado I) que se formó hace ca. 0.3946 Ma (95% HPD) (Figuras 9 y 10). Estas aproximaciones de tiempo de origen están sujetas a errores por lo que hay que tomar estos resultados con precaución al momento de apoyarse en ellos. Con estos antecedentes, estas fechas propuestas sugieren que existieron tres posibles rutas a través de las cuales *Chelonia mydas* se dispersó en el Pacífico (Pacífico Occidental, Pacífico Central-Nororiental y Pacífico Oriental).

El clado del Pacífico Oriental Tropical por otro lado, se divide en tres subclados (III, IV y V) los cuales presentan haplotipos originarios del Ecuador previamente reportados, haplotipos nuevos reportados por primera vez, haplotipos presentes en múltiples colonias de la región, haplotipos originarios del Pacífico Occidental, y haplotipos reportados anteriormente para Galápagos pero que no fueron encontrados en este estudio (Figura 9). Esta división indica que las poblaciones del Ecuador poseen una composición genética fraccionada presente en tres clados independientes. De estos subclados, dos poseen una probabilidad posterior Bayesiana significativa (III y V) (Figuras 7 y 8) y el origen de cada clado es variable (Figuras 9 y 10) lo que refleja que colonizaciones múltiples dieron forma a la composición genética del Ecuador mediante procesos que se dieron en diferentes épocas.

DISCUSIÓN

Estructura genética poblacional

En el Ecuador no existen diferencias significativas en la distribución genética de los grupos estudiados. Los resultados sugieren una alta conectividad entre las colonias y agregaciones del Ecuador continental con la agregación de forrajeo de la Isla San Cristóbal indica. Investigaciones anteriores indicaron que las poblaciones reproductivas de Galápagos muestran cierto grado de diferenciación genética ($F_{st}= 0.418$), ($F_{st}= 0.258$) y ($F_{st}= 0.217$) con respecto a las colonias de Hawaii, Revillagigedo (México) y Michoacan (México) (Seminoff. 2003., Roden et al, 2013., Dutton et al. 2013). Sin embargo, la estructura poblacional entre Galápagos y el Ecuador Continental presentada en este estudio es similar; como se esperaría encontrar entre poblaciones cercanas y/o con una separación histórica reciente, lo cual está sustentado por el rango teórico de los estadísticos F y las pruebas comparativas AMOVA (Tabla 6) obtenidas.

Los índices de diversidad también indican que en las Galapágos concurren individuos pertenecientes a diferentes regiones del Pacífico (Tabla 5). El mayor número de los haplotipos dentro del Ecuador son endémicos reflejando la alta diversidad Hb encontrada especialmente para Galápagos coincidiendo con estudios anteriores (Dutton et al. 2014). A pesar de que se incrementaron los sitios de muestreo en el Ecuador continental, no se encontró diferencia en Hb en comparación a estudios pasados enfocados solo en Galápagos; probablemente debido a que la cantidad de haplotipos encontrados en Galápagos es superior a otras locaciones (Roden et al. 2013., Dutton et al. 2014), revelando las conexiones existentes con el Ecuador continental. Los bajos niveles de π tanto para Galápagos y el Ecuador continental sugieren que son poblaciones recientes, generadas a partir de múltiples eventos de colonización que aún mantienen una estrecha conectividad entre sí (Roden et al. 2013).

A pesar de que las agregaciones de forrajeo no están compuestas estrictamente por individuos cuyo origen se encuentra adyacente al sitio de la agregación (Jensen, 2010), las agregaciones de forrajeo y anidación en el Ecuador son genéticamente similares ya que comparten muchos haplotipos (Anexo 2). La diferenciación inexistente no varía aunque existan cambios en el tamaño de muestra o en la resolución del marcador, ya que los haplotipos compartidos en su mayoría son originarios de Galápagos y presentan frecuencias homogéneas en casi todos los sitios muestreados (Tabla 5). Probablemente se necesite muestrear más colonias debido a la posible composición haplotípica de éstas y es posible que debido a este factor se encontraron haplotipos huérfanos (Jensen. 2010., Dutton et al. 2014).

La falta de diferencia genética puede ser causa del activo desplazamiento de individuos de Galápagos hacia el Continente, aunque la telemetría muestra una baja movilización entre la región insular y el Ecuador continental (Figura 3); posiblemente debido a que no existen temperaturas óptimas en la superficie oceánica para desplazamientos (Seminoff. 2003., Seminoff et al. 2008). Al parecer, las rutas migratorias hacia América del Sur representan un costo de energía, lo que reduce las posibilidades de conectividad (Seminoff et al. 2008). Es probable que uno de los motivos históricos de la conectividad Ecuador-Galápagos sea el “upwelling” incrementando la disponibilidad de nutrientes, característica prevaleciente en la costa continental la influencia de corriente fría de Perú (Seminoff et al. 2008). De igual manera, *C.mydas* de Galápagos muestra tolerancia hacia cambios de temperatura del agua como adaptación durante períodos de inter-anidación (Seminorff et al. 2008., Amorocho et al. 2012), lo que facilitaría la conectividad y encontrada entre Galápagos y el Ecuador continental.

La red de haplotipos (Figura 6) revela que los haplotipos del Pacífico Occidental se encuentran distantes a los haplotipos del Pacífico Oriental. El haplotipo CmP97.1 perteneciente al atolón de Palmyra en la Polonesia Frances, Pacífico Occidental se encontró presente en agregaciones de forrajeo de Galápagos y difiere en 32 pb con el haplotipo más cercano del Pacífico Oriental (Figura 6). Por otro lado, el haplotipo huérfano Hap9 presentan una red con diferencias de sustitución de 2 pb, mientras que los haplotipos restantes presentan una sustituciones de 1 pb entre ellos (Figura 6), lo cual sustenta la composición genética fraccionada de la región (Dutton et al. 2014).

Relación filogenética

Los árboles bayesianos de haplotipos reportados previamente en el Pacífico con aquellos encontrados en este estudio sugieren que el Pacífico Central/Oriental está compuesto por dos clados monofiléticos (Pacífico Central-Nororiental-PCN; sub-Clados I y II, y Pacífico Oriental Tropical; Sub-clados II, IV y V) (Figuras 7-9). Individuos de Galápagos y del Ecuador continental se encuentran en múltiples regiones del Pacífico Oriental Tropical y esto refleja que las relaciones filogenéticas en esta región son complejas como resultado de posibles colonizaciones múltiples (Dutton et al. 2014., Hamabata et al. 2014). Este patrón muy evidente con los haplotipos de Galápagos que difieren en su relación filogenética y tiempo de origen (Figura 9). Se encontró un clado exclusivo para las Islas Galápagos (Sub-clado V) conteniendo haplotipos huérfanos los cuales no han sido reportados previamente. Estos resultados nos sugieren que los haplotipos huérfanos Hap8 y Hap9 podrían pertenecer a colonias de anidación dentro del Archipiélago de Galápagos que aún no ha sido reportada. Sin embargo es importante acotar que estos haplotipos presentes en agregaciones de forrajeo no necesariamente poseen sus colonias de origen adyacentes (Jensen. 2010).

Tanto la composición genética encontrada en el Ecuador como la relación filogenética de los haplotipos reportados en este estudio, sustentan la estrecha relación entre colonias de Galápagos y Costa Rica; mientras que revela un grado de diferenciación genética entre colonias del Pacífico Oriental Tropical con aquellas colonias del Pacífico Nororiental (México) y el Pacífico Oriental (Hawaii) que muestran otros estudios (Dutton et al. 2014). De acuerdo a Dutton et al. (2014), esto se debe a la barrera del Pacífico Oriental entre la zona del Pacífico Oriental tropical y Pacífico Central/Nororiental; generado por la expansión de profundidad oceánica que separa estas zonas la cual se ha demostrado limita la dispersión y explica los patrones filogeográficos. Por lo que, la principal característica observada en este y otros estudios es una mezcla de individuos de Ecuador, Costa Rica y México en los sitios de alimentación; los cuales poseen colonias segregadas por filopatria (Dutton et al. 2014). Las poblaciones de Ecuador al presentar individuos con haplotipos distribuidos en varios clados monofileticos, presentan varias posibles hipótesis para su origen y conectividad con otras poblaciones a lo largo del Pacífico Oriental Tropical.

Origen y rutas

Existen tres posibles rutas que dieron origen a la estructura genética que presentan diferentes regiones del Pacífico en la actualidad, estas posibles rutas están sustentadas en base a diferentes teorías expuestas en investigaciones previas. De acuerdo a Hamabata et al (2014) el origen de los haplotipos en latitudes altas proviene de regiones próximas a la línea ecuatorial mediante eventos de colonización y aislamiento. Este patrón se ve reflejado en los haplotipos del Pacífico Tropical Oriental, los cuales poseen un origen más antiguo (ca. 0.4451 Ma) en comparación a los haplotipos del Pacífico Central/Nororiental (ca. 0.3943 Ma) (Figuras 9 y 10).

Por otro lado, los hallazgos de Dutton et al. (2014) sugieren que las colonias reproductivas de *Chelonia mydas* presentes en el Pacífico Oriental fueron colonizadas a partir de hembras con origen en el Pacífico Occidental. Es así que sugiere que la vía de colonización se dió siguiendo la ruta del Pacífico Central/Nororiental, donde las Islas Revillagigedo son un anclaje para la radiación de tortugas verdes que provenían de el Archipiélago de Hawaii hacia el Pacífico Oriental Tropical (Dutton et al. 2014). De esto, se sugiere a Hawaii y Revillagigedo como fuentes de diversidad. El patrón de colonización sugerido en este estudio concuerda con la presencia de múltiples colonizaciones en diferentes direcciones; más no en una sola dirección como expone la teoría de Hamabata et al. (2014).

El presente estudio sugiere que los haplotipos con diversos orígenes en el Pacífico Oriental poseen tiempos de origen variables y, contrario a Dutton et al (2014), se observa un patrón de colonización desde el Pacífico Occidental hacia el Pacífico Oriental mediante Galápagos como punto de dispersión. Esta posible ruta está sustentada por el tiempo de origen, la alta diversidad haplotípica encontrada en Galápagos, y a la presencia de haplotipos con origen en el Ecuador en diversos clados del Pacífico Oriental Tropical. Se comprobó al haplotipo CmP4.1 como dominante en el Pacífico Oriental, no por la cantidad de individuos con el haplotipos, si no por ser el haplotipo que esta más emparentado con otros haplotipos (Figura 6) (Dutton et al. 2014) y se estableció a Galápagos como un centro de acumulación de haplotipos compartidos y como una fuente de haplotipos para otras colonias en todo el Pacífico

Usando estas estimaciones moleculares en combinacion con eventos geográficos, nos permite determinar las potenciales rutas de las colonizaciones históricas de *Chelonia mydas* en el Pacífico (Luzieux et al. 2006). Por ejemplo, las características históricas de las corrientes marinas antes especificadas, la edad de San

Cristóbal ca. 2.3-6.3 (Ma) y la edad de estabilización del suelo marino continental del Ecuador ca.10 (Ma) de la cresta de Carnige con la placa de Nazca (Luzieux et al. 2006), nos muestra que estas características biogeográficas del Pacífico se dieron antes de la formación de relaciones filogenéticas de *C. mydas* (Figura 9 y 10); por lo que la mayor explicación para los patrones de rutas de colonización son los desplazamientos suscitados en los periodos glaciares e inter-glaciares en épocas paleo-oceánicas de acuerdo a la teoría de Hamabata et al. (2014). Es posible que las rutas de colonización en el Pacífico Oriental tuvieran diversas direcciones, debido al alto fraccionamiento de haplotipos; sin embargo, también es probable que existan colonizaciones recientes y que las colonizaciones se generen constantemente, lo que sustenta la composición haplotípica y las frecuencias encontradas a nivel regional en este estudio y en estudios anteriores (Jensen. 2010., Dutton et al. 2014). Probablemente, los haplotipos precursores (Cmp3) (Dutton et al. 2014); dieron origen a los clados del Pacífico Occidental y Oriental hace ca. 0.79 Ma (Figura 9 y 10). Pese que es complicado inferir cuál fue el punto de origen, se piensa que los cambios climáticos pudieron influenciar en la dispersión de individuos de *C.mydas* hacia zonas ecuatoriales identificadas como sitios de refugio (Hamabata et al. 2014). Adicionalmente, se cree que los individuos ayudados por las corrientes marinas y los factores físico-químicos (i.e., batimetría y temperatura superficial del agua), permitieron a las colonias establecerse en nuevas áreas (Seminoff et al. 2008., Hamabata et al. 2014, Dutton et al. 2014).

Por otro lado, estudios realizados en Australasia demostraron que dos colonias reproductivas separadas por ca. 240 Km latitudinales de Norte a Sur son genéticamente diferentes, mientras que una colonia presente a ca. 190 Km hacia el Oeste fue similar (Jensen. 2010). Esto puede indicar que el intercambio genético de poblaciones no

ubicadas en las cercanías de placas continentales es un proceso dinámico, influenciado no solo por la distancia sino también por la ubicación geográfica. Adicionalmente, esto sugiere que uno de los factores selectivos de los individuos de *C. mydas* hacia sus sitios de origen y forrajeo podría estar relacionado con la posición latitudinal más no longitudinal de los sitios de reproducción.

Implicaciones en la conservación

Este estudio muestra que poblaciones del Pacífico Oriental Tropical son una unidad de conservación relativamente grande la cual se subdivide en tres unidades (Moritz, 1994., Dutton et al. 2014). Los grupos de Galápagos y el Ecuador continental revelaron estar emparentadas entre ellos, y con individuos de Costa Rica, Panamá y México; por lo que los haplotipos del Ecuador son importantes contribuidores para la diversidad genética del Pacífico Oriental Tropical. En Ecuador las poblaciones de *Chelonia mydas* como grupo no se encuentran aisladas ya que los individuos del Ecuador se consideran como parte de la unidad de manejo del Pacífico Oriental Tropical donde existe la compartición de algunos haplotipos en común; sin embargo, las colonias de Galápagos se consideran una unidad de manejo importante debido a su alta diversidad (Dutton et al. 2014) y estas en relación al Ecuador continental son una sola población.

Es así, que resulta indispensable proteger a estas poblaciones a nivel local para contribuir con la diversidad del Pacífico; principalmente si agregaciones de forrajeo de Galápagos reciben a individuos de diferentes colonias incluyendo aquellas del Pacífico Occidental. Este estudio muestra que se debe conservar las agregaciones de forrajeo tanto de Galápagos como del Ecuador continental, ya que éstas posiblemente se forman de individuos de colonias reproductivas que pueden estar pasando por declives poblacionales; de igual manera, se necesita hacer un esfuerzo de conservación en las colonias reproductivas y agregaciones de forrajeo del Ecuador continental, no solo

porque son fuentes poblacionales que contribuyen con la estructura genética de Galápagos si no también por mantienen la resiliencia de las poblaciones originarias del Ecuador, debido a compartición alta de haplotipos presentes en el Archipiélago

Es importante realizar este tipo de estudios, tomando en cuenta todas las colonias reproductivas presentes en el país. Como Jensen (2010) menciona, el tamaño de la muestra es irrelevante en la determinación de la composición y estructura genética al comparar con el poder de resolución al contar con todas las colonias reproductivas. Esto se da ya que haplotipos huérfanos que poseen origen local pueden ser mal interpretados como nuevos, así como la diversidad en general de la unidad de manejo puede reflejar solo una parte de la información.

CONCLUSIONES

La tortuga marina verde, *Chelonia mydas*, se encuentra en la categoría de especie amenazada de acuerdo a la lista de la IUCN (2009), en el Ecuador las tortugas verdes enfrentan varias amenazas a causa de actividades antropogénicas (Ministerio de Ambiente de Ecuador. 2007., Ministerio de Ambiente de Ecuador. 2014). El propósito de este estudio fue definir la composición genética y la conectividad entre tortugas verdes del Ecuador continental y las Islas Galápagos, con la finalidad de determinar las relaciones filogenéticas de estas poblaciones con el Pacífico e inferir sobre las posibles vías de colonización histórica en la región. Mediante este estudio se buscó aumentar la información sobre las poblaciones de tortugas del Ecuador para que se realice un mejor manejo de la especie.

En total, se encontraron nueve haplotipos en el Ecuador continental y la agregación de forrajeo de Galápagos (dos haplotipos nuevos para Galápagos y cuatro haplotipos nuevos para el Ecuador continental. Tomando en cuenta la diversidad genética, las Islas Galápagos poseen una diversidad alta de haplotipos. Sin embargo, su diversidad nucleótida interna demuestra que la población de Galápagos es bastante similar, revelando la conectividad existente entre Galápagos y el Ecuador continental; así como la conectividad con otras regiones del Pacífico. Este estudio demostró que las migraciones desde Galápagos hacia el continente y viceversa que se pensaba no tenían una gran magnitud (Seminoff et al. 2008., Dutton et al. 2014), representa una ruta migratoria importante entre colonias reproductivas y agregaciones de forrajeo dentro del Ecuador y dentro del Pacífico Oriental Tropical.

Las poblaciones de *C. mydas* del Ecuador no están aisladas y se confirmó la influencia de múltiples colonias en el país en especial en las islas Galápagos. La

mayoría de haplotipos presentes en el Ecuador y la conformación de los subclados revelan que la población del Ecuador tiene una alta conectividad con diferentes colonias del Pacífico Oriental. Las relaciones filogenéticas sugieren que ocurrió colonización de individuos mediante tres diferentes rutas (Pacífico Occidental, Pacífico Central-Nororiental y el Pacífico Oriental) donde Galápagos probablemente representó un centro de dispersión importante debido a su diversidad alta, y la presencia de haplotipos de Galápagos en diferentes subclados geográficos del Pacífico con diferente época de origen revela múltiples colonizaciones a través del tiempo dentro del Pacífico Oriental (Dutton et al. 2014).

De este modo, las poblaciones de *Chelonia mydas* del Ecuador deben considerarse como unidades de manejo independientes y su conservación es importante para mantener la retroalimentación genética entre Galápagos y Ecuador continental, y aún más importante, mantener uno de los centros de diversidad de la especie dentro del Pacífico Oriental.

REFERENCIAS

- Abreu-Grobois, F. A., Horrocks, J. A., Formia, A., Dutton, P. H., LeRoux, R. A., Velez-Zuarzo, X., Soares, L and A. B, Meylan. (2006). New mtDNA D-loop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution of mixed stock analysis. In: *Proceedings of the 26th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*.
- Amoroch, D. F., Abreu-Grobois, F. A., Dutton, P. H., & Reina, R. D. (2012). Multiple distant origins for green sea turtles aggregating off Gorgona Island in the Colombian eastern Pacific. *PLoS One*. 7(2).
- Bowen, B. W., Meylan, A. B., Ross, J. P., Limpus, C. J., Balazs, G. H and J. C, Avise. (1992). Global Population Structure and Natural History of the Green Turtle (*Chelonia mydas*) in Terms of Matriarchal Phylogeny. *Evolution*. 46 (4): pp. 865-881.
- Carr, A. (1980). Some problems of sea turtle ecology. *American Zoologist*. 20(3), 489-498.
- Chaloupka, M., Work, T. M., Balazs, G. H., Murakawa, S. K. K and R, Morris. (2008). Cause-specific temporal and spatial trends in green sea turtle strandings in the Hawaiian Archipelago (1982–2003). *Mar Biol*. 154:pp. 887–898.
- Chaves, J. A., Pollinger, J. P., Smith, T. B and LeBuhn, G. (2007). The role of geography and ecology in shaping the phylogeography of the speckled hummingbird (*Adelomyia melanogenys*) in Ecuador. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
- Crawford, N. G., Parham, J. F., Sellas, A. B., Faircloth, B. C., Glenn, T. C., Papenfuss, T. J., Henderson, J. B., Hansen, M. H and W. B, Simison. 2015. A phylogenomic analysis of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 83: 250-257.
- Denkinger, J., Parra, M., Muñoz, J. P., Carrasco, C., Murillo, J. C., Espinosa, E., Rubianes, F and V, Koch. (2013). Are Boat Strikes a threat to sea turtles in the Galapagos Marine Reserve. *Ocean and Coastal Management*. Vol. 80: pp. 29-35.
- Dethmers, K.E. M, Broderick, D and C, Moritz. (2006). The genetic structure of Australasian green turtles (*Chelonia mydas*): exploring the geographical scale of genetic exchange. *Molecular Ecology*. 15: 3931–3946.
- Dethmers, K. E. M., M. P. Jensen and N. N, FitzSimmons. (2010). Migration of green turtles (*Chelonia mydas*) from Australasian feeding grounds inferred from genetic analyses. *Mar. Freshw. Res*. 61:1376–1387.
- Dutton, P. H., Balazs, G. H., LeRoux, R. A., Murakawa, S. K. K., Zarate, P & L. S, Martínez. (2008). Composition of Hawaiian green turtle foraging aggregations: mtDNA evidence for a distinct regional population. *Endangered Species Research*. 5: 37-44

- Dutton, P. H., Roden, S. E., Stewart, K. R., LaCasella, E., Tiwari, M., Formia, A., Thomé, J. C., Livingstone, S. R., Eckert, S., Chacon-Chaverri, D., Rivalan, P and P, Allman. (2013). Population stock structure of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in the Atlantic revealed using mtDNA and microsatellite markers. *Conservation Genetics*. 14(1).
- Dutton, P. H., Jensen, M. P., Frey, A., LaCasella, E., Balazs, G. H., Zarate, P., Chassin-Noria, O., Sarti-Martinez, L. A and E, Velez. (2014). Population structure and phylogeography reveal pathways of colonization by a migratory marine reptile (*Chelonia mydas*) in the central and eastern Pacific. *Ecology and Evolution*. 4(22): 4317–4331.
- Encalada, S. E., Lahanas, P. N., Bjorndal, K. A., Bolten, A. B., Miyamoto, M. M and B. W, Bowen. (1996). Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology*. 5 (4): pp. 473-483.
- Forsberg, K., Casabonne, F. and J, Castillo. (2012). First evidence of green turtle nesting in Peru. *Mar Turtle Newsletter*. 133: 9-11. [Online]. Disponible en: <http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn133/mtn133p9.shtml?nocount>. [Accedido en Marzo 2015].
- Gaos, A. R., Lewison, R. L., Wallace, B. P., Yañez, I. L., Liles, M. J., Nichols, W. J., Baquero, A., Hasbún, C. R., Vasquez, M., Urteaga, J and J. A, Seminoff. (2012). Spatial ecology of critically endangered hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata*: implications for management and conservation. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 450: pp. 181-194.
- Hamabata, T., Kamezaki, N and T, Hikida. 2014. Genetic structure of green turtle (*Chelonia mydas*) peripheral population nesting in the northwestern Pacific rookeries: evidence for northern refugia and postglacial colonization. *Marine Biology*. 161: 497-507.
- IUCN. (2014). The IUCN Red List of Threatened Species. *Version 2014.3*. [Online]. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org>. [Accedido en Marzo 2015].
- Jensen, M. P. (2010). Assessing the composition of green turtle (*Chelonia mydas*) foraging grounds in Australasia using mixed stock analyses. Doctoral dissertation. University of Canberra, Australia.
- Karl, S. A., Bowen, B. W and J. C, Avise. (1992). Global Population Genetic Structure and Male-Mediated Gene Flow in the Green Turtle (*Chelonia mydas*): RFLP Analyses of Anonymous Nuclear Loci. *Genetics*. 131: 163-173.
- Kot, C.Y., Fujioka, E., DiMatteo, A. D., Wallace, B. P., Hutchinson, B. J., Cleary, J., Halpin, P. N and R. B, Mast. (2015). The State of the World's Sea Turtles Online Database: Data provided by the SWOT Team and hosted on OBIS-SEAMAP. Oceanic Society, Conservation International, IUCN Marine Turtle Specialist Group (MTSG), and Marine Geospatial Ecology Lab, Duke University. [Online]. Disponible en: <http://seamap.env.duke.edu/swot>. [Accedido en Marzo 2015].

- Lahanas, P. N., Bjorndal, K. A., Bolten, A. B., Encalada, S. E., Miyamoto, M. M., Valverde, R. A & R. W, Bowen. (1998). Genetic Composition of a Green Turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Marine Biology*. 130: 345-352.
- Luzieux, L. D. A., Heller, F., Spikings, R., Vallejo, C. F and W, Winkler. (2006). Origin and Cretaceous tectonic history of the coastal Ecuadorian forearc between 1°N and 3°S: Paleomagnetic, radiometric and fossil evidence. *Earth and Planetary Science Letters*. 249: pp. 400–414.
- Moritz, C. (1994). Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 9(10): 373-375.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2007). Actualización del Diagnóstico del Parque Nacional Machalilla: elementos prioritarios de la diversidad biológica y cultural. Proyecto GEF: Ecuador Sistema Nacional de Areas Protegidas (SNAP-GEF). Quito, Ecuador.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2014). Plan Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas. Guayaquil, Ecuador.
- Naro-Maciél, E., Gaughran, S. J., Putman, N. F., Amato, G., Arengo, F., Dutton, P. H., McFadden, K. W., Vintinner, E. C and E. J, Sterling. (2014). Predicting connectivity of green turtles at Palmyra Atoll, central Pacific: a focus on mtDNA and dispersal modelling. *Journal of the Royal Society*. Interface. 11: pp: 1-13.
- Near, T. J., Meylan, P. A and H. B, Shaffer. (2005). Assessing Concordance of Fossil Calibration Points in Molecular Clock Studies: An Example Using Turtles. *The American Naturalist*. 165(2): p. 137-146.
- Nishizawa, H and R, Hayashi. (2015). Body size distribution demonstrates flexible habitat shift of green turtle (*Chelonia mydas*). *Global Ecology and Conservation*. 3: pp. 115–120.
- Parham, J. F y N. D, Pyenson. 2010. New Sea Turtle From The Miocene Of Peru And The Iterative Evolution Of Feeding Ecomorphologies Since The Cretaceous. *Journal of Paleontology*. 84(2): pp. 241-247.
- Patricio, A. R., Herbst, L. H., Duarte, A., Vélez-Zuazo, X., Santos Loureiro, N., Pereira, N., Tavares, L and G. A, Toranzos. (2012). Global phylogeography and evolution of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus. *Journal of General Virology*. Vol. 93 (5): pp. 1035-1045.
- Peña-Mosquera, M. P., Baquero-Gallegos, A. B., Muñoz-Pérez, J. M., Puebla-Jiménez, F., Alvarez, V and X, Chalen-Noroña. (2009). El Parque Nacional Machalilla: zona crítica de anidación para la Tortuga Carey (*Eretmochelys imbricate*) y verde (*Chelonia mydas*) en el Ecuador y el Pacífico Oriental. Temporadas 2007-2009. [Online]. Disponible en: http://www.equilibrioazul.org/documentos/Publicaciones/Pe%F1a%20et%20al_2009_Anidacion_PNM_Equilibrioazul.pdf. [Accedido en Marzo 2015].

- Peña-Mosquera, M. P., Muñoz-Pérez, J. M., Baquero-Gallegos, A. B., Valle-Castillo., C. A., Macías-Soledispa, J and X, Chalen-Noroña. (sf). Caracterización de la población de tortugas verdes (*Chelonia mydas*) del área marina de la Isla de la Plata, Parque Nacional Machalilla, Ecuador. [Online]. Disponible en: http://www.equilibrioazul.org/documentos/Publicaciones/Pe%F1a%20et%20al_2009_Captura_tortugas_PNM_Equilibrioazul.doc. [Accedido en Marzo 2015].
- Roden, S. E., Morin, P. A., Frey, A., Balazs, H., Zarate, P., Cheng, I and P. H, Dutton. (2013). Green turtle population structure in the Pacific: new insights from single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Endangered Species Research*. Vol. 20: 227-234.
- Seminoff, J. A., compiler. (2003). Proceedings of the Twenty-Second Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. *NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC*. 503. pp. 308.
- Seminoff, J. A., Zárate, P., Coyne, M., Foley, D. G., Parker, D., Lyon, B. N and P. H, Dutton. (2008). Post-nesting migrations of the Galápagos green turtles *Chelonia mydas* in relation to oceanographic conditions: integrating satellite telemetry with remotely sensed ocean data. *Endangered Species Research*. Vol. 4: pp. 57-72.
- SWoT. (2014). Status of the World's Sea Turtles. Vol 9. Ed. Mast, R. [Online]. Disponible en: <http://www.seaturtlestatus.org>. [Accedido en Marzo 2015].
- Vieyra, M. 2006. A Molecular Approach to Understanding the Importance of Olfaction in the Life History of Sea Turtles: Turtle Olfactory Receptor Gene Phylogeny, Allelic Diversity and Evidence for Selection. *ProQuest*. pp. 299.
- Wang, Z., Pascual-Anaya, J., Zadissa, A., Li, W., Nimura, Y., Huang, Z., Li, C., White, S., Xiong, Z., Fang, D., Wang, B., Ming, Y., Chen, Y., Zheng, Y., Kuraku, S., Pignatelli, M., Herrero, J., Beal, K., Nozawa, M., Li, Q., Wang, J., Zhang, H., Yu, L., Shigenobu, S., Wang, J., Liu, J., Flicek, P., Searle, S., Wang, J., Kuratani, S., Yin, Y., Aken, B., Zhang, G y N, Irie. (2013). The draft genomes of softshell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtlespecific body plan. *Nature Genetics*. 45(6): pp. 701-706.
- Zarate, P., Fernie, A and P, Dutton. (2002). First results of the green turtles, *Chelonia mydas*, nesting population assessment in the Galápagos Islands, in Proceedings of the 22nd Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. *NOAA Tech Memo*, (in press).

TABLAS

Tabla 1: Concentración de reactivos para la reacción PCR

Reactivo	Concentración
Buffer	1X
dNTPs	0.25 mM c/u
MgCl ₂	1.5 mM
Primers F & R	10 µL c/u
Taq	1.25 U
Template	40 ng

Tabla 2: Programación de termociclador para la amplificación de 832 pares de bases de la secuencia de ADN mitocondrial con los primers LTEi9 y H950-H950g.

94-96°C	3 min		Desnaturalización Inicial
94-96°C	30 s	35-45 ciclos	Desnaturalización
55°C	30 s	35-45 ciclos	Annealing
72°C	1:30 min	35-45 ciclos	Extensión
72°C	10 min		Elongación
4°C			

Tabla 3: Determinación del número de individuos para cada haplotipo reportado en estudio según la colonia de anidación y agregación de forrajeo presentes en el Ecuador.

Haplotipos	AC (Machalilla-anidación)	AI (La Plata-anidación)	FC (Machalilla-forrajeo)	FI (La Plata-forrajeo)	FGalapagos
Hap1/CmP93.1	2	4	3	8	15
Hap2/CmP4.4	0	2	1	0	2
Hap3/CmP4.1	1	2	5	4	6
Hap4/CmP4.7	2	5	0	3	7
Hap5/CmP24.1	0	0	0	2	0
Hap6/CmP97.1	0	0	0	0	7
Hap7/CmP17.1	0	0	0	0	2
Hap8/orphan	0	0	0	0	1
Hap9/orphan	0	0	0	0	1
Total	5	13	9	17	41

Tabla 4: Resumen de la diversidad de ADN mitocondrial de muestras de colonias de anidación y agregaciones de forrajeo de *Chelonia mydas* en Ecuador.

Población		Tamaño de la Muestra	Haplotipos	Sitios Polimórficos	Diversidad Haplotípica (Hb)	Diversidad Nucleotídica (π)
Machalilla	Anidantes	5	3	2	0.8 ± 0.16	0.002 ± 0.0004
	Forrajeo	9	3	2	0.64 ± 0.13	0.00108 ± 0.0003
Isla de la Plata	Anidantes	13	4	3	0.77 ± 0.07	0.0018 ± 0.0002
	Forrajeo	17	4	3	0.72 ± 0.08	0.00157 ± 0.0013
Galápagos Is, San Cristobal	Forrajeo	41	8	39	0.8 ± 0.03	0.015 ± 0.00027

Valores con su desviación estándar \pm

Tabla 5: Estimaciones de las frecuencias haplotípicas de dos colonias de anidación y tres agregaciones de forrajeo en aguas Ecuatorianas.

Haplotipos	AC (Machalilla- anidación)	AI (La Plata- anidación)	FC (Machalilla- forrajeo)	FI (La Plata- forrajeo)	FGalapagos
Hap1/CmP93.1	0.4	0.308	0.333	0.471	0.366
Hap2/CmP4.4	0	0.154	0.11	0	0.049
Hap3/CmP4.1	0.2	0.154	0.556	0.235	0.146
Hap4/CmP4.7	0.4	0.385	0	0.176	0.171
Hap5/CmP24.1	0	0	0	0.118	0
Hap6/CmP97.1	0	0	0	0	0.171
Hap7/CmP17.1	0	0	0	0	0.049
Hap8/orphan	0	0	0	0	0.024
Hap9/orphan	0	0	0	0	0.024

Tabla 6: Resultados AMOVA para cada configuración grupal después de 1000 permutaciones, cada configuración grupal fue comparada individualmente y después pareada para comprobar la presencia de subdivisiones poblacionales; con excepción de una comparación general de todo el Ecuador y subgrupos: [FGal][Machalilla], [Anidantes][Forrajeo] y el análisis mas completo [AC][AI][FC+FI][FGal], en cada análisis se llevo a cabo el porcentaje de variación explicada entre grupos (Φ_{Ct}), dentro de poblaciones (Φ_{ST}) y entre poblaciones dentro de sus grupos (Φ_{SC}).

Escalas Regionales	gl	% Varianza Explicada	Φ_{SC}	Φ_{ST}	Φ_{Ct}	Nivel de Significancia
[Ecuador]	4 80	5.83	—	0.0903	0.0583	$p < 0.001$
[FGal] [Mach]	1 3 80	16.78	- 0.0792	0.102	0.168	NS
[A][F]	1 3 80	0.47	0.056	0.061	0.005	NS
[AC][AI][FC+FI][FGal]	3 1 80	12.51	- 0.068	0.065	0.125	NS

FIGURAS

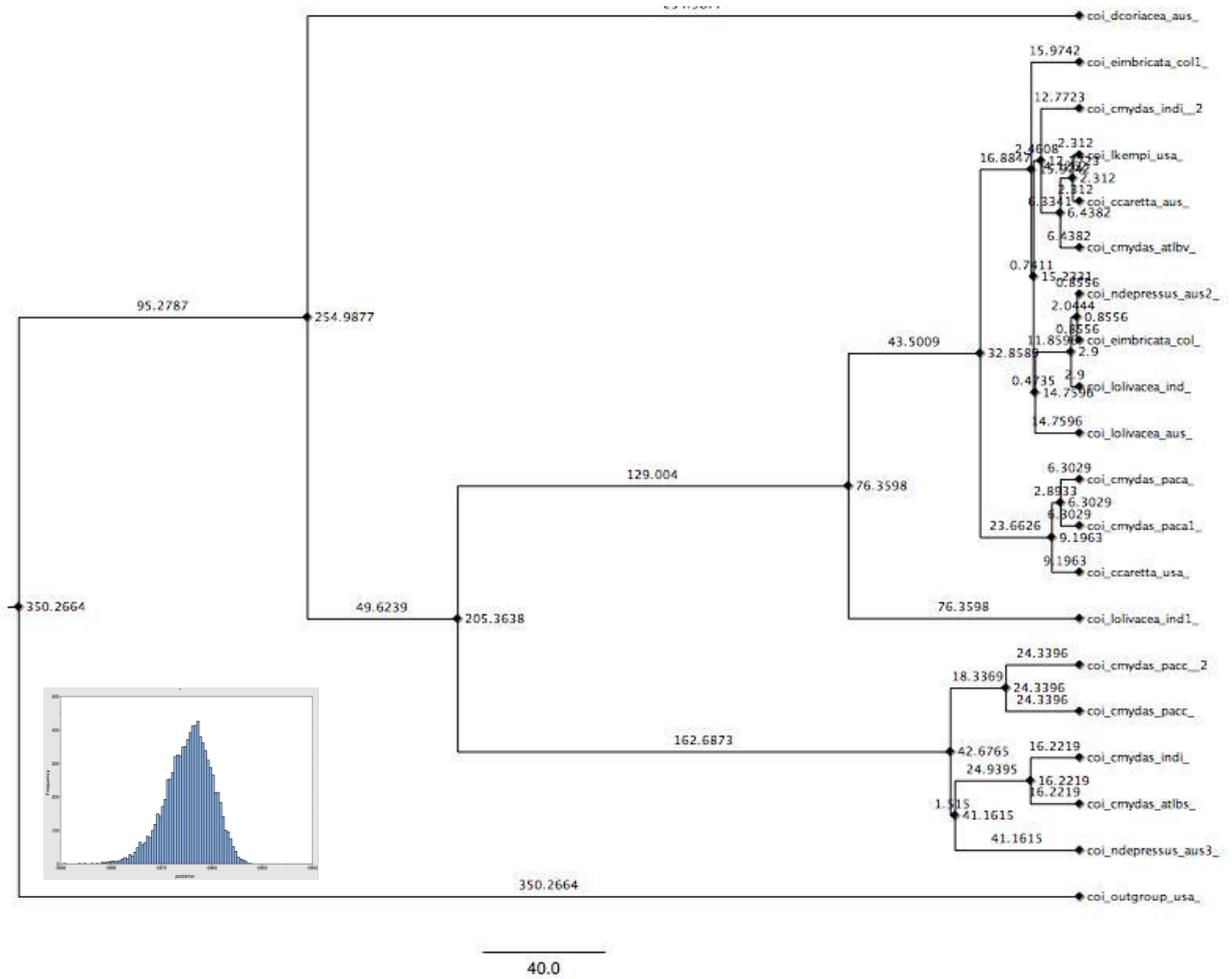


Figura 1: Árbol bayesiano de las relaciones genéticas entre especies de tortugas marinas para el gen COI en la región de ADN mitocondrial, calibrado a partir de datos fósiles (50.24 ± 6.55 Ma) para la divergencia entre los grupos Chelonidae y Dermiochelis y un reloj molecular de 0.2 subs/sitio/Ma (Near et al. 2005).

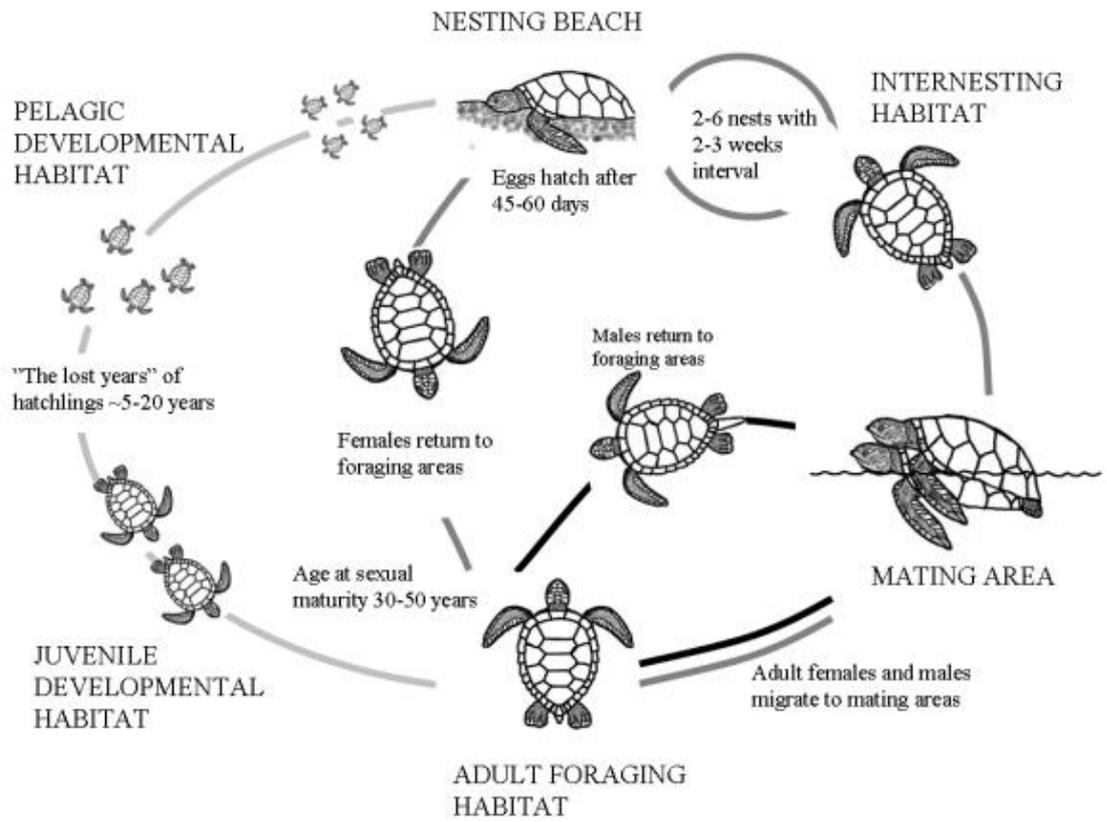


Figura 2: Ciclo de vida de tortugas marinas (Jensen. 2010).

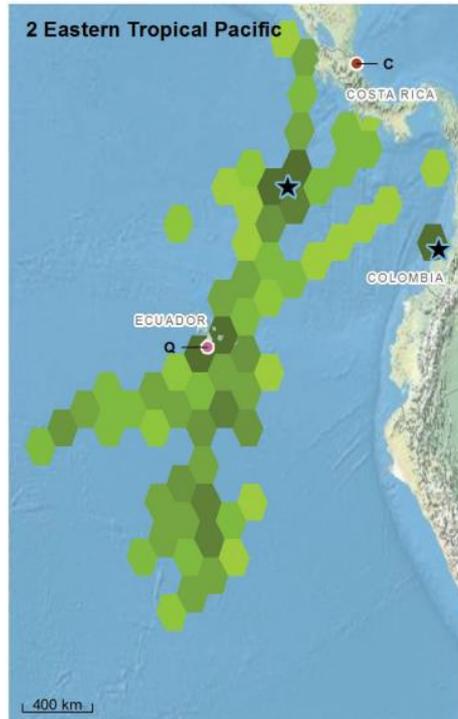


Figura 3: Densidad de *Chelonia mydas* basado en telemetría satelital, revelando la falta de información entre Galápagos y el Ecuador continental (Kot et al. 2015).

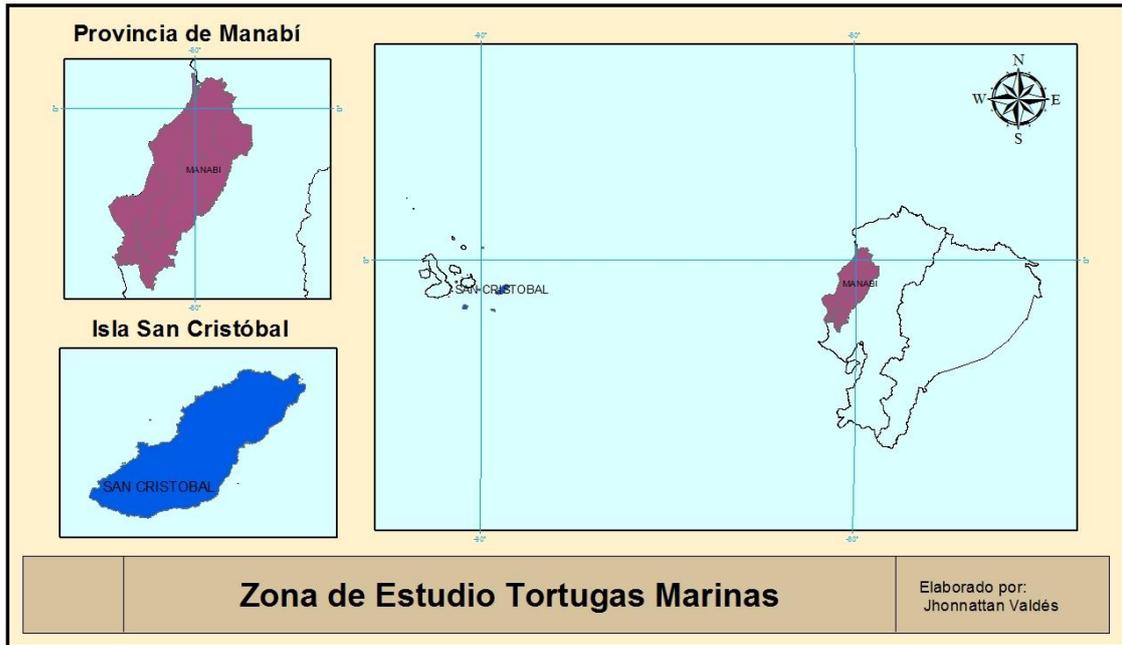


Figura 4: Mapa de la zona de estudio Isla San Cristóbal en las Islas Galápagos y el Parque Nacional Machalilla incluyendo la Isla de la Plata en la provincia de Manabí en el Ecuador continental.

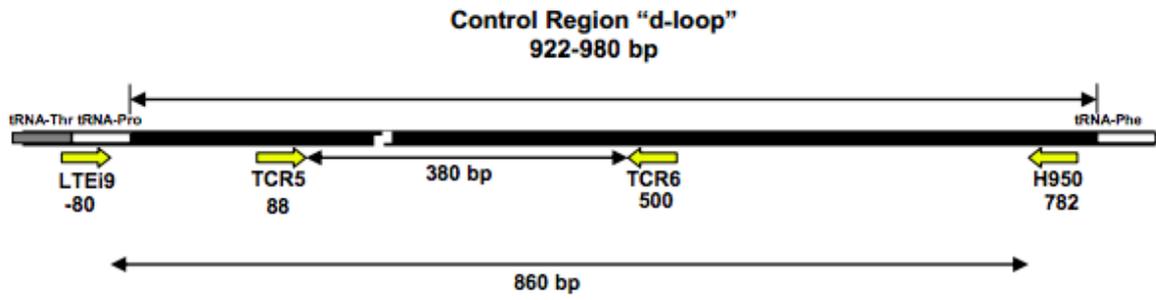


Figura 5: Región control "d-loop" de ADN mitocondrial amplificada (Jensen, 2010).

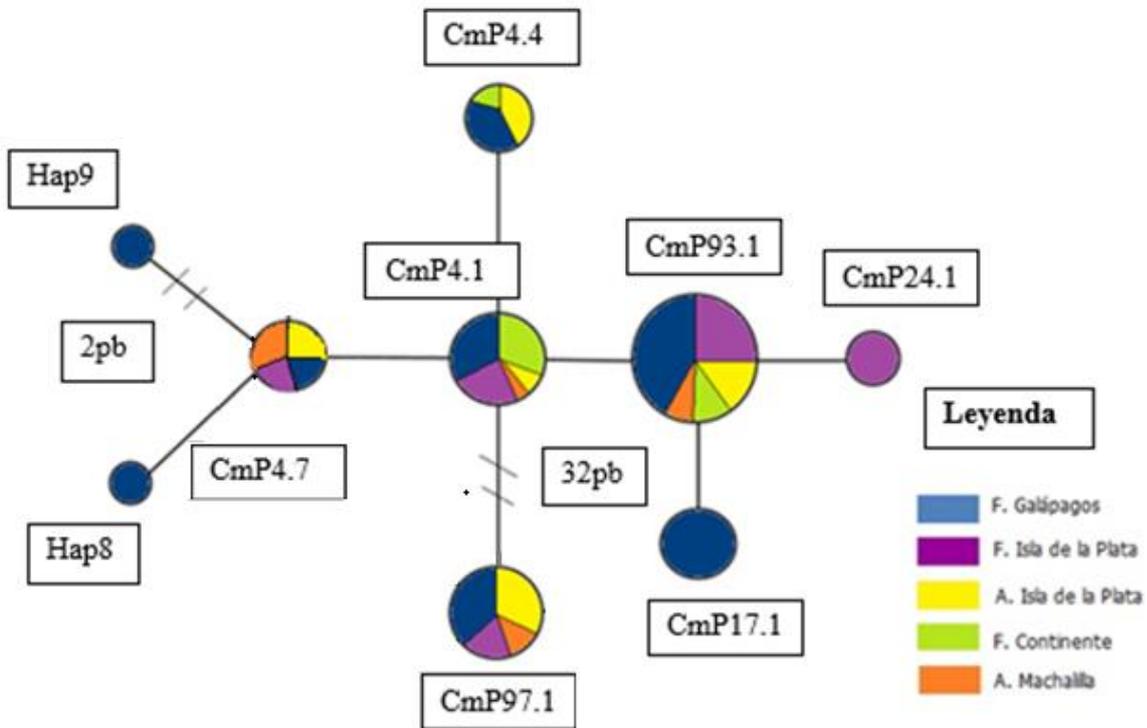


Figura 6: “Minimum Spanning Network” según el número de individuos y color del sitio donde fueron encontrados los haplotipos, el network representa la red más parsimoniosa de relaciones entre haplotipos de acuerdo la distancia de sus diferencias genéticas medida en pares de bases (haplotipos Hap9 y CmP97.1 poseen diferencias de 2 pb y 32 pb respectivamente con su haplotipo más emparentado, los haplotipos restantes poseen diferencias de 1 pb entre sí).

Figura 7: Árbol filogenético Bayesiano de valores >70% de probabilidad posterior, entre haplotipos de ADNmt de *Chelonia mydas* únicos para regiones del Pacífico y aquellos encontrados en colonias reproductivas y agregaciones de forrajeo del Ecuador; ★ representa la división de clados entre el Pacífico Central/Nororiental y el Pacífico Oriental, mientras que ✦ representa cada subclados formados después de 1000 replicaciones bootstrap mediante el parámetro de probabilidades posteriores GTR + G+I.

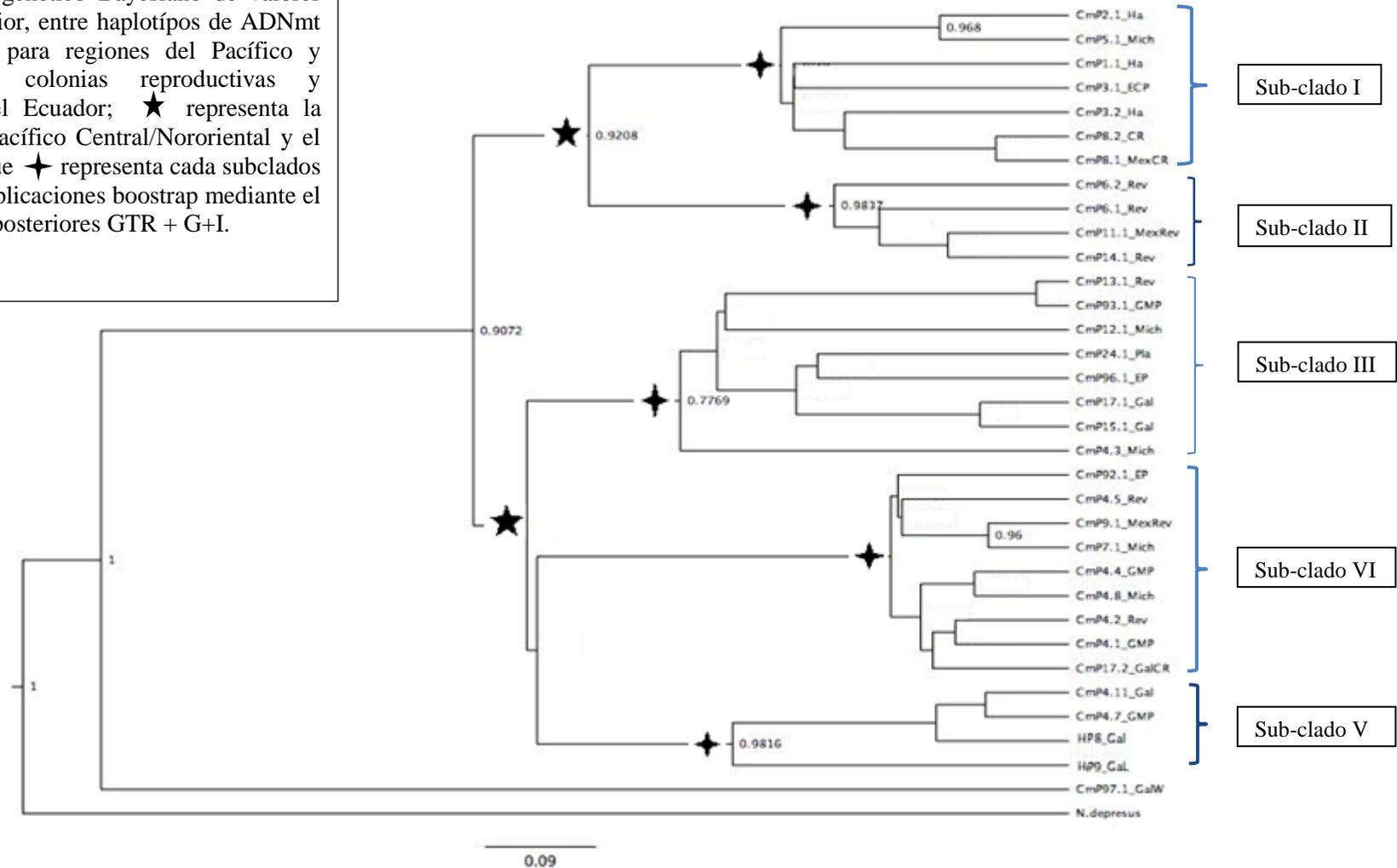


Figura 8: Árbol filogenético Bayesiano de todos los valores de probabilidad posterior (%HPD) y su desviación estándar, entre haplotipos de ADN mt de *Chelonia mydas* únicos para varias regiones del Pacífico después de 1000 repeticiones bootstrap mediante el parámetro de probabilidades posteriores GTR + G+I.

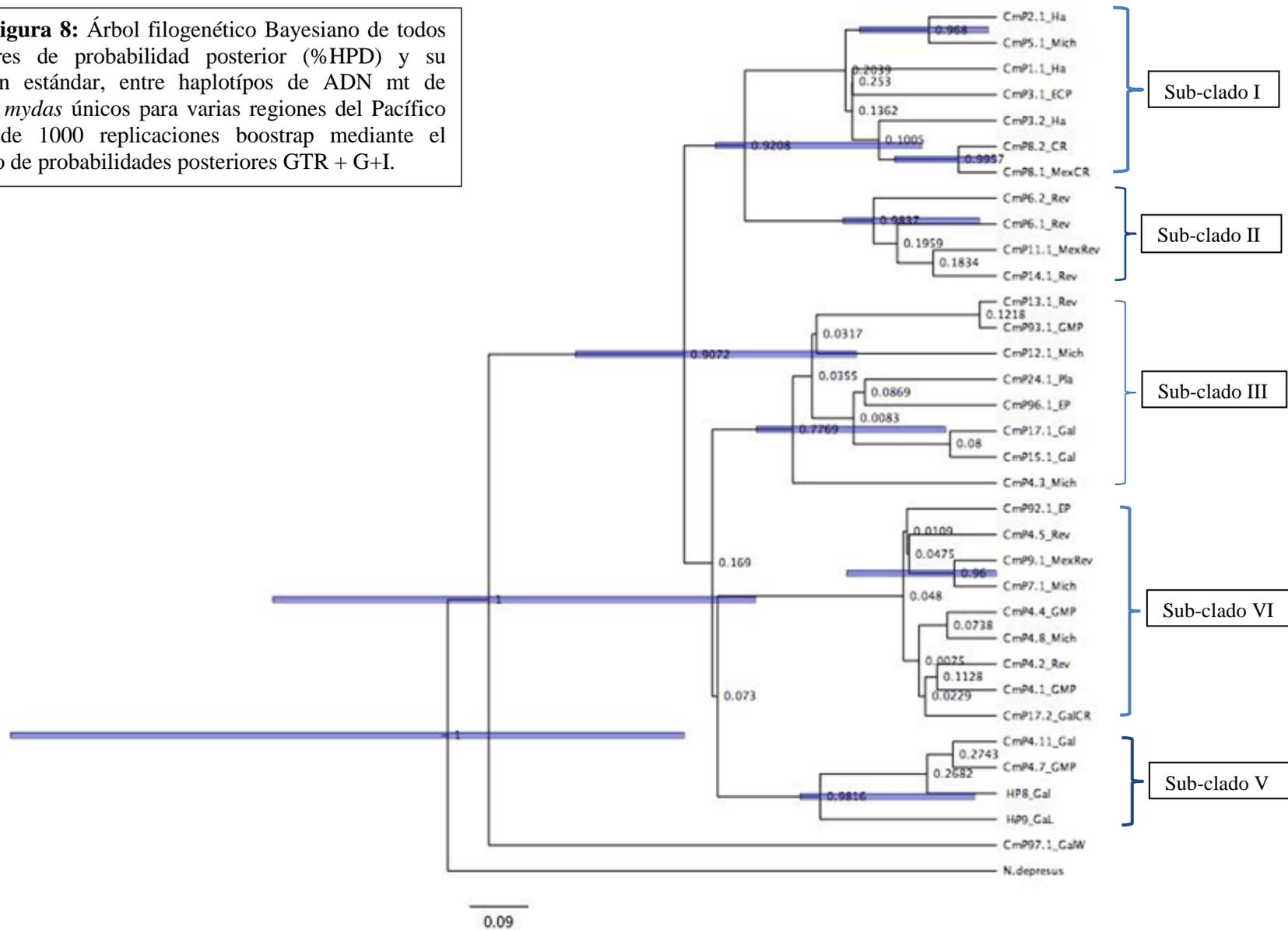


Figura 9: Filogénia de haplotípos de *Chelonia mydas* reportados para varias regiones del Pacífico y aquellos encontrados en colonias reproductivas y agregaciones de forrajeo del Ecuador, revelando los tiempos de divergencia calculados mediante BEAST; ★ es la división de clados entre el Pacífico Central/Nororiental y el Pacífico Oriental, ✦ son todos los sub-clados.

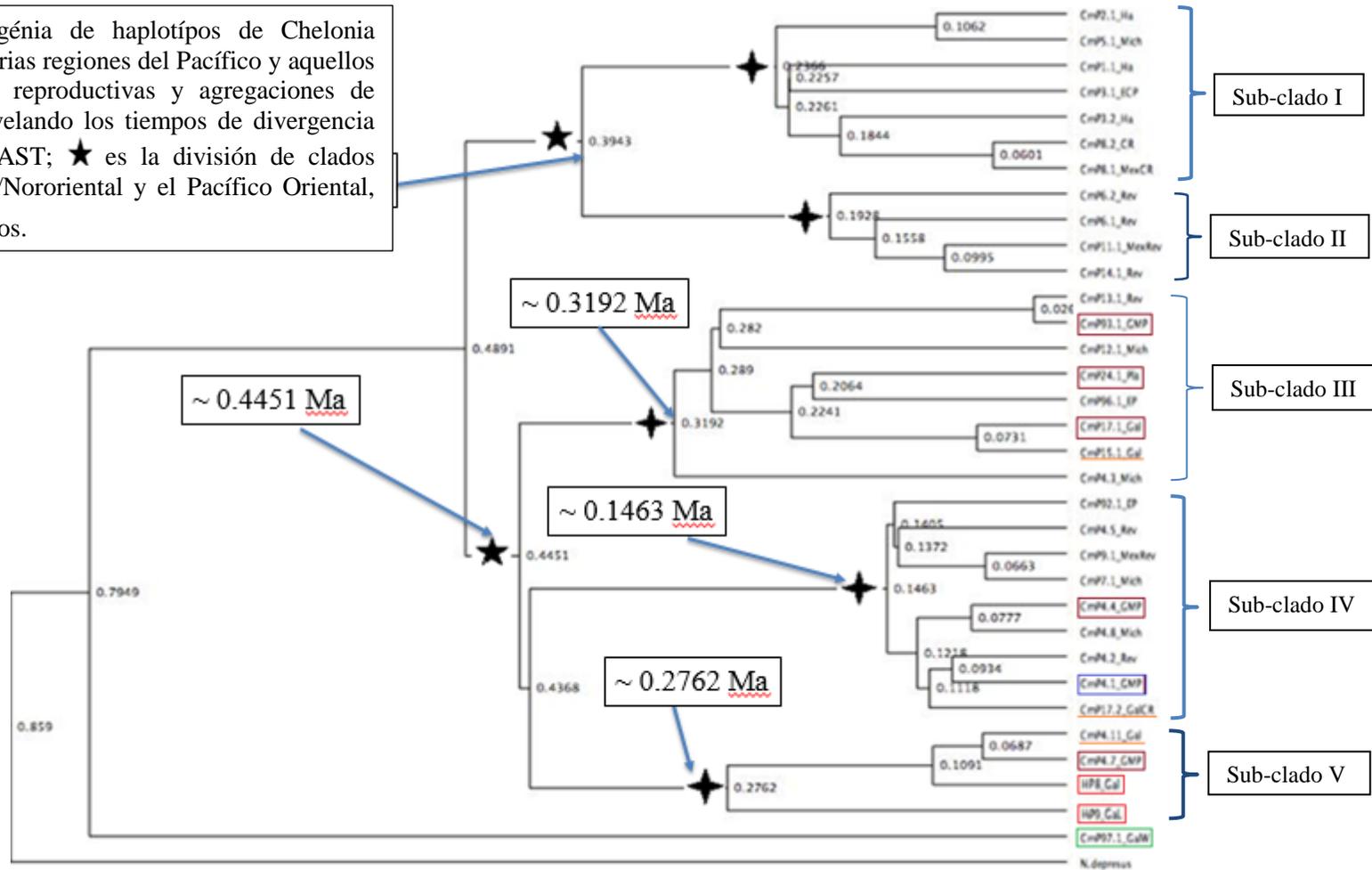
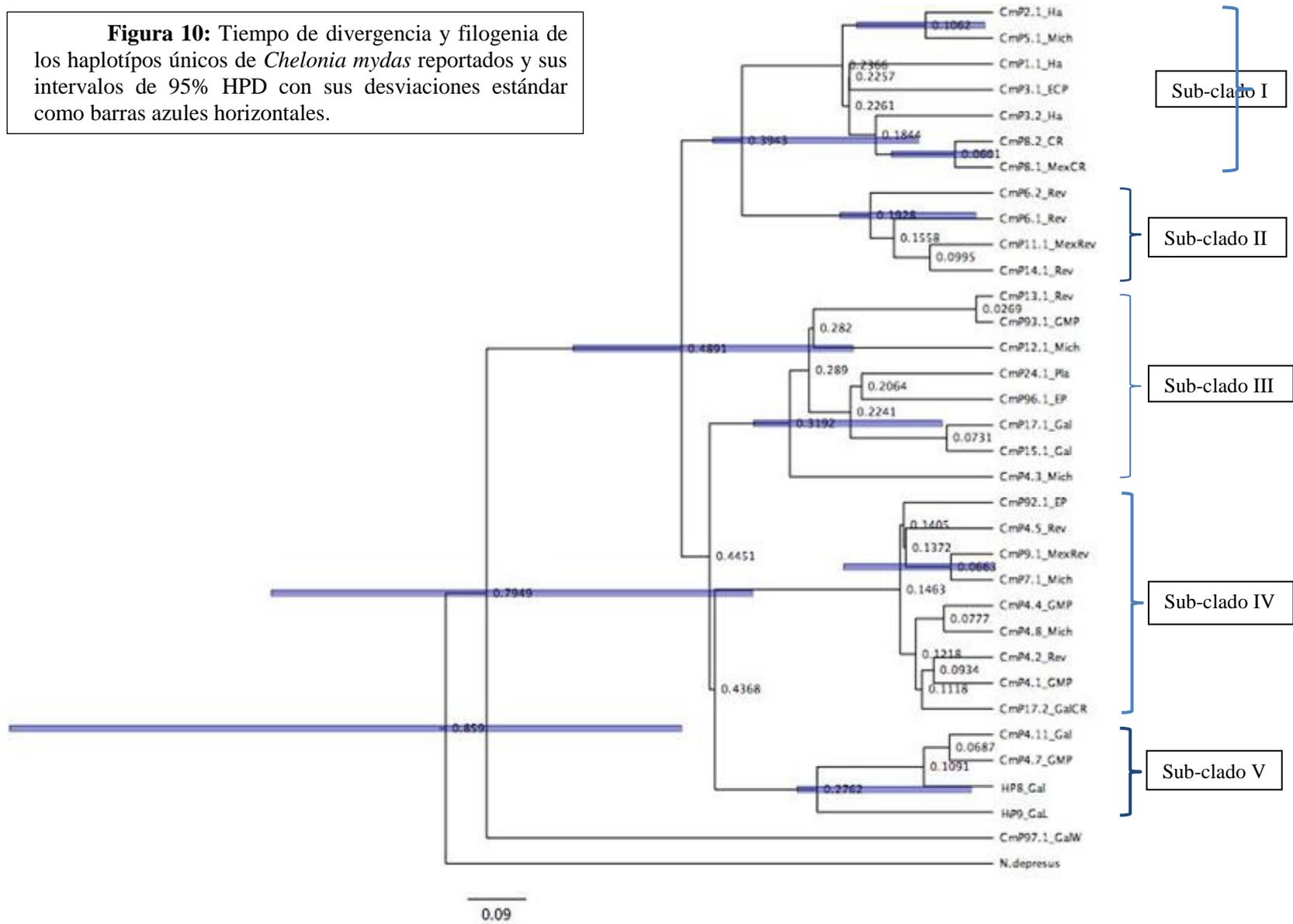


Figura 10: Tiempo de divergencia y filogenia de los haplotípos únicos de *Chelonia mydas* reportados y sus intervalos de 95% HPD con sus desviaciones estándar como barras azules horizontales.



ANEXOS

Anexo 1: Secuencias de GenBank de la región control de ADNmt y designación de haplotipos provenientes del Pacífico central, occidental y oriental (Dutton et al. 2014).

Haplotipo	Genbank Acc no.	Haplotipo	Genbank Acc no.
CmP1.1	KC306652.1	CmP7.1	KC306667.1
CmP2.1	KC306650.1	CmP8.1	KC306659.1
CmP3.1	KC306654.1	CmP8.2	KC306671.1
CmP3.2	KC306653.1	CmP9.1	KC306668.1
CmP4.1	KC306666.1	CmP11.1	KC306658.1
CmP4.2	KC306662.1	CmP12.1	KC306669.1
CmP4.3	KC306645.1	CmP13.1	KC306644.1
CmP4.4	KC306665.1	Cmp14.1	KC306656.1
CmP4.5	KC306664.1	CmP15.1	KC306649.1
CmP4.7	KC306660.1	CmP17.1	KC306648.1
CmP4.8	KC306663.1	CmP17.2	KC306670.1
CmP4.11	KC306661.1	CmP24.1	KC306646.1
CmP5.1	KC306651.1	CmP92.1	FJ917195.1
CmP6.1	KC306657.1	CmP93.1	FJ917194.1
CmP6.2	KC306655.1	CmP97.1	FJ917198.1

Anexo 2: Clasificación de haplotipos según la colonia reproductiva y agregación de forrajeo del Ecuador.

	AC	FC	AI	FI	GAL
AC		Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7
FC	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1		Hap1/CmP93.1 Hap2/CmP4.4 Hap3/CmP4.1	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1	Hap1/CmP93.1 Hap2/CmP4.4 Hap3/CmP4.1
AI	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7	Hap1/CmP93.1 Hap2/CmP4.4 Hap3/CmP4.1		Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7	Hap1/CmP93.1 Hap2/CmP4.4 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7
FI	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7	Hap5/CmP24.1	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7
GAL	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7	Hap1/CmP93.1 Hap2/CmP4.4 Hap3/CmP4.1	Hap1/CmP93.1 Hap2/CmP4.4 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7	Hap1/CmP93.1 Hap3/CmP4.1 Hap4/CmP4.7	Hap6/CmP97.1 Hap7 CmP17.1 Hap 8/orphan Hap9/orphan