

ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Caretta caretta* EN EL GRAN CARIBE Y LA COSTA ATLÁNTICA DE ESTADOS UNIDOS, CON ENFASIS EN COLONIAS DE ANIDACION DEL SUROESTE CUBANO.

Ariel Ruiz U. ¹, Mayumi Vega P. ¹, F. Brian Riverón G. ¹, F. Alberto Abreu G. ², Juan Solano A. ¹, Talia Pérez M. ³, Emir Pérez B. ¹, Julia Azanza R. ¹, Roberto Frías S. ¹, Rogelio Díaz F. ¹, María Elena Ibarra M. ¹ y Georgina Espinosa L. ^{1*}.

- (1) Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Calle 16 No. 114, CP 11300, Playa, Ciudad Habana, Cuba.
 (2) Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Mazatlán, Apdo. Postal 811, CP 82000, Mazatlán, Sinaloa, México.
 (3) Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna. Ave. Boteros No. 12555, Boyeros, Ciudad Habana, Cuba.
 (*) Autor correspondiente: Email: georgina@fbio.uh.cu

RESUMEN

Las relaciones genéticas entre colonias de anidación de caguama en el suroeste de Cuba (Península de Guanahacabibes, Cayería San Felipe, sur de la Isla de la Juventud y Cayo Largo del Sur), se determinaron usando secuencias de la región de control del mtDNA (375 pb del extremo 5'). Estos datos fueron analizados en un contexto regional para estimar la contribución de cada colonia a la estructura genética de la metapoblación del Gran Caribe y la costa atlántica de USA, empleando tablas de contingencia de χ^2 y Φ ST. Las incongruencias entre algunos de los resultados de estas pruebas fueron resueltas probando hipótesis de asociación genética y geográfica a través de AMOVAs. Dentro de las colonias de anidación cubanas, fueron encontrados haplotipos pertenecientes a dos linajes, i.e. norte y sur del Atlántico [A]; Gran Caribe – Mar Mediterráneo [B]. Un haplotipo perteneciente a este último (CC-A2), estuvo en alta frecuencia respecto a los demás (CC-A1, 8, 10, 12, 14). El haplotipo CC-A12, previamente reportado para áreas de forrajeo, resultó endémico de la Cayería San Felipe. No se encontraron diferencias significativas entre las colonias cubanas pero se encontró estructura genética cuando éstas fueron comparadas con las demás colonias de la región. La población de anidación cubana fue considerada como una unidad demográfica independiente al igual que las colonias de anidación del oeste y este del sur de la Florida. Por consiguiente, la población de anidación cubana constituye un demo de una metapoblación, que debe ser manejada en un contexto regional

Palabras claves: estructura genética; mtDNA; unidad demográfica; *Caretta caretta*; ASW.

ABSTRACT

Using ca. 375 bp sequences from the 5'-end of the mitochondrial DNA control region we elucidated the genetic relationships among four loggerhead rookeries in southwestern Cuba (Guanahacabibes Peninsula, San Felipe Cays, south of Isla de la Juventud and Cayo Largo del Sur), and analyzed these data within a regional context to understand the contribution of each to the genetic structure of the Greater Caribbean metapopulation. Contingency chi-square tables and Φ ST tests we applied to all pairwise comparisons of Cuban and previously analyzed rookeries for the species in the Atlantic basin. Incongruities between some of the results from these tests were resolved by testing hypotheses of genetic versus geographical association through AMOVAs. Within the Cuban rookeries, haplotypes belong to two different lineages, i.e. North and South Atlantic [A], and the Greater Caribbean – Sea Mediterranean [B] lineages. One haplotype (CC-A2) belonging to the latter, was in higher frequency respect to the others (CC-A1, 8, 10, 12, 14). One haplotype (CC-A12), previously only reported from foraging areas, was found to be endemic for the San Felipe rookery. No significant differentiation was found between any pair of Cuban rookeries, when the set of Cuban rookeries was compared to the remaining rookeries in the analyzed region, some genetic structuring was revealed. The Cuban population was considered as an independent demographic unit the same as the western and eastern rookeries of the south of the Florida. Cuban nesting population constitutes a deme of a metapopulation, which should be managed in a regional context.

Key words: genetic structure; mtDNA; demographic unit; *Caretta caretta*; ASW.

En la actualidad *C. caretta* está categorizada globalmente como especie en peligro de extinción (EN) por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Hilton-Taylor, 2000), y está en el apéndice 1 de la Convención sobre Comercio Internacional de Especies en Peligro (CITES). En el Atlántico las principales anidaciones de *C. caretta* tienen lugar en el

suroeste de los Estados Unidos de América (USA), representando aproximadamente el 90% del esfuerzo reproductivo (Murphy y Hopkins, 1984). Anidaciones pequeñas, pero significativas, se reportan en Bahamas, Cuba y el occidente de África (Dodd, 1988), pero no han sido estudiadas profundamente. En Cuba el área de anidación más importante se encuentra en el Archipiélago

de los Canarreos, destacándose la playa “El Guanál” del sur de la Isla de la Juventud donde fueron reportados 174 nidos en el periodo de anidación de 1989 (Nodarse *et al.*, 2000).

La región no codificadora del mtDNA ha demostrado ser un marcador molecular efectivo para detectar la estructura poblacional en las colonias anidadoras de tortugas marinas debido a su variabilidad (Bass *et al.*, 1996; Bowen y Kart, 2007; Bowen *et al.*, 1992, 1994 y 2007; Encalada *et al.*, 1996 y 1998; Laurent *et al.*, 1998).

Las colonias de anidación alrededor de Cuba, están estructuradas genéticamente en unidades demográficas independientes (Bowen y Karl, 2007), *i.e.* USA: noroeste de la Florida, sur de la Florida, y noreste de la Florida hasta Carolina del Norte (Encalada *et al.*, 1998), y Dry Tortugas (Francisco y Bowen, 2001), México; colectivamente denominadas colonias de anidación del Gran Caribe y costa atlántica de USA. Las colonias de anidación de Volusia County también han sido valoradas como otra unidad (Francisco *et al.*, 1999), aunque después se consideró como parte del noreste de la Florida (Francisco y Bowen, 2001), por estar situada al norte de la barrera biogeográfica de la costa atlántica de la Península de la Florida (Briggs, 1974). Recientemente, las colonias de anidación de Volusia County se integraron al sur de la Florida (Bowen, 2004). Considerando las tendencias poblacionales de *C. caretta* en la región y la necesidad de entender cómo cada unidad demográfica contribuye a las áreas marinas de agregación, crece el interés por determinar la identidad poblacional de otras colonias de anidación. En este trabajo se analiza la estructura genética de las colonias de anidación de *C. caretta* del suroeste de Cuba en un contexto regional, con vista al manejo de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Área de estudio

Las muestras analizadas en este trabajo se tomaron de la Península de Guanahacabibes [21° 56'N ;84° 30'O] y Archipiélago de los Canarreos (Cayo Real [21° 58'N; 83° 36'O]; Playa el Guanál [21° 30'N; 82° 41'O], Cayo Largo del Sur [21° 38'N; 81° 28'O]) en Cuba.

Obtención y procesamiento de las muestras

Muestras de tejido correspondientes a embriones de nidos diferentes, concomitantes en el estadio de desarrollo, fueron tomadas en playas del suroeste del archipiélago cubano: seis en Cayo

Real (Cayería San Felipe), en junio y agosto de 1998; diez en la Península de Guanahaca-bibes durante las temporadas de anidación comprendidas entre el 2000 y 2006; doce en El Guanál (Playa Larga, Isla de la Juventud) desde junio hasta agosto de 2006; ocho en playa Los Cocos (Cayo Largo del Sur) en marzo y junio de 2006. Las muestras fueron conservadas en etanol (90%) a temperatura ambiente.

La extracción del DNA se realizó a partir del método propuesto por Hillis *et al.* (1996). Amplificamos *ca.* 380 pares de bases (pb) de la región de control (dominio 5') del mtDNA, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los cebadores TCR5 y TCR6 (Norman *et al.*, 1994). La PCR se desarrolló en un volumen de reacción de 50 μ L, integrado por 2 unidades de *Taq* polimerasa, 1x PCR tampón II (Promega), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTP y 0.2 μ M de cada cebador por 10-500 ng de DNA genómico. El proceso se realizó en un termociclador automático (MJ Research), utilizando un paso de desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min, 45°C por 45 s, 72°C por 1 min; y 10 min a 72°C de extensión final de la reacción. El producto de la PCR fue purificado y secuenciado automáticamente en la compañía MacroGen. Cada muestra se secuenció en ambas direcciones. Las secuencias se rectificaron visualmente con los cromatogramas mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1997-2001).

Análisis de los datos

Las secuencias obtenidas a partir de las muestras de las colonias de anidación del suroeste cubano fueron identificadas mediante un alineamiento con los haplotipos que tipifican los linajes restringidos uno al Atlántico [A] y el otro, al Gran Caribe y mar Mediterráneo [B]: CC-A1 – 10, Encalada *et al.* (1998); CC-A11 – 17, Bolten *et al.* (1998); CC-A19 – 23 según Bowen; CCA-24 – 25 según Bass CCA-26 – 32 según Carreras; CCA-36 y 41 según Bolten (inscritos en el Archie Carr Center, 2005); y CCA-37 – 40 según Roberts, utilizando el programa Clustal X 1.8 (Thompson *et al.*, 1997). La numeración de los sitios polimórficos (SPs) fue realizada tomando como referencia la primera base de la región de control del mtDNA (Laurent *et al.*, 1998). En el caso en que existió un indel de más de una base, el SP fue identificado con el número correspondiente al primer nucleótido, manteniendo en el próximo SP una correspondencia entre la numeración del nucleótido y el SP en cuestión.

Para determinar la estructura genética entre las colonias de anidación del suroeste cubano, el grado de diferenciación genética Φ_{ST} (Slatkin,

1991) fue estimado utilizando el método de Tamura (Tamura, 1992). Los intervalos de confianza fueron obtenidos a través de 10 000 permutaciones aleatorias, utilizando el programa Arlequin ver. 3.0 (Excoffier y Schneider, 2005). Las frecuencias haplotípicas entre colonias de anidación también fueron comparadas utilizando la Prueba de independencia χ^2 (Sokal y Rohlf, 1981), corregida con el procedimiento de Bonferroni (Rice, 1989) y 1000 simulaciones (Roff y Bentzen, 1989), a través del programa CHIRXC (Zaykin y Pudovkin, 1993). Posteriormente, se probó que estas colonias de anidación del suroeste cubano junto con las otras colonias de anidación del Gran Caribe y costa atlántica de USA, constituyen una población panmicta a través de un Análisis de Varianza Molecular jerarquizado (AMOVA, escenario hipotético I) (Excoffier *et al.*, 1992) con 10 000 permutaciones aleatorias, mediante el programa arlequin ver. 3.0.

Se determinó la estructura genética entre las colonias de anidación del suroeste cubano, y las de estas con las que compartieron al menos un haplotipo, excepto con las del mar Mediterráneo por estar claramente estructuradas (Encalada *et al.*, 1998; Laurent *et al.*, 1998), *i.e.* USA: Melbourne Beach, Hutchinson Island, Port Everglades, norte y sur de Jetty, Key Island, Sarasota County, Cape San Blas, St. Joseph's, Tyndall Beach, Eglin Air Force Base, Georgia, Dry Tortugas, y México: Quintana Roo. En los análisis fueron empleadas las pruebas estadísticas antes mencionadas (Φ_{ST} y χ^2). Para conocer la dependencia entre la diferenciación genética (Φ_{ST}) y las distancias geográficas por pares de colonias de anidación fue aplicada la prueba de Mantel (Smouse *et al.*, 1986), con 10000 permutaciones aleatorias, utilizando el programa Arlequin ver. 3.0.

Se comprobó si las colonias de anidación cubanas constituyen una unidad demográfica independiente a través de un AMOVA jerarquizado (escenario hipotético I, que se muestra en la Tabla 3), considerando 1) las unidades demográficas propuestas por Encalada *et al.* (1998), Francisco y Bowen (2001) y Bowen (2004) los resultados de la diferenciación por pares de colonias de anidación. Adicionalmente, fueron aplicados otros dos AMOVAs jerarquizados (escenarios hipotéticos II y III, mostrados en la Tabla 3), semejantes al segundo, pero segregando las colonias de anidación del suroeste y sureste de la Florida. Respectivamente. La muestra dentro del área de anidación noreste de la Florida hasta Carolina del Norte fue simplificada a la colonia de anidación de Georgia (selección al azar), considerando que una agrupación de muestras integradas por el mismo haplotipo

puede provocar una significación del Φ_{SC} (error de tipo I).

El valor de probabilidad (p) para cada estadístico se obtuvo cuando el valor aleatorio fue menor o igual al observado, excepto en los estadísticos Φ_{CT} y Φ_{SC} donde el valor de p se obtuvo cuando la proporción fue mayor e igual porque se asume para el primer caso, que mientras que las poblaciones sean reales, las agrupaciones regionales son artificiales y para el segundo caso que mientras que las regiones sean reales, las poblaciones dentro de cada región son artificiales. La significación de los estadísticos se consideró para valores de probabilidad menores que 0.05. El número de sustituciones nucleotídicas *per* sitio nucleotídico fue estimado mediante el método Tamura (Tamura, 1992), considerando la desproporción entre los tipos de cambios nucleotídicos y que la suma de A+T es el doble de C+G.

RESULTADOS

Las secuencias parciales de las muestras del suroeste de Cuba pertenecieron a los linajes A y B. Estas secuencias correspondieron a seis patrones haplotípicos, *i.e.* CC-A1, 2, 8, 10, 12 y 14. El CC-A12, informado para las áreas de forrajeo de Azores y Madeira según Bolten *et al.* (1998), resultó ser endémico de la Cayería San Felipe. Las colonias de anidación del suroeste de Cuba no estuvieron estructuradas genéticamente entre sí ($\Phi_{ST(g=35)}=-0.006$, $p=0.41$, Tabla 1). Tampoco se encontró estructura genética entre las colonias de anidación pertenecientes a una misma unidad demográfica del Gran Caribe y la costa atlántica de USA, excepto entre Eglin Air Force Base *versus* Cape San Blas pertenecientes al noroeste de la Florida según la prueba χ^2 (Tabla 2).

El suroeste de Cuba sólo no está estructurado con las colonias de anidación Port Everglades y Hutchinson Island del sureste de la Florida, Key Island del suroeste de la Florida y Cape San Blas del noroeste de la Florida. Con respecto a Tyndall Beach hubo una incongruencia entre la significación de ambas pruebas, obteniéndose estructura genética con el χ^2 . Otras incongruencias ocurrieron entre Dry Tortugas *versus* Quintana Roo y Port Everglades. (Tabla 2). No obstante, Dry Tortugas y Quintana Roo están estructuradas con la generalidad de las colonias de anidación (85.71 y 92.86%, respectivamente). Entre las colonias de las áreas de anidación que integran el sur de la Florida no hubo estructura genética. Tampoco se encontró estructura genética entre las colonias de anidación del noroeste de la Florida *versus* la generalidad (71.88 %) de las

Tabla 1. Comparación por pares de colonias de anidación de *C. caretta* en el suroeste de Cuba, a partir de haplotipos de la región de control del mtDNA. Arriba de la diagonal: comparación de las frecuencias haplotípicas empleando la Prueba χ^2 a través del programa CHIRXC (Zaykin y Pudovkin, 1993) corregida con el procedimiento de Bonferroni y el método Monte Carlo (1000 simulaciones). El primer número se corresponde con el valor del estadígrafo, entre paréntesis los grados de libertad, seguido de la probabilidad (/ valor). Debajo de la diagonal: número absoluto de migrantes intercambiados en la parte superior, prueba de diferenciación por pares de colonias de anidación (Φ_{ST}), seguida de la probabilidad (/ valor). Para la nomenclatura de las colonias de anidación ver Fig. 1.

Colonias de anidación	CL	GU	IJ	SF
CL		6.19 (2)/0.06	0.38 (1)/0.65	6.34 (4)/0.14
GU	3.99 0.11/0.23		6.12 (2)/0.05	7.04 (4)/0.05
IJ	Inf -0.08/0.65	7.03 0.08/0.11		7.88 (4)/0.05
SF	12.61 0.11/0.38	10.25 0.05/0.24	7.03 0.07/0.11	

colonias de anidación de las otras áreas de la península.

Las frecuencias relativas de los haplotipos presentes en las colonias de anidación de USA, a partir de datos originales de Francisco y Bowen (2001), Francisco *et al.* (1999) y Encalada *et al.* (1998), constituyeron una variación clinal latitudinal de los haplotipos más distribuidos y representados de los linajes presentes en ambas costas de la Península de la Florida (Fig. 1). El haplotipo CC-A1 del linaje A aumentó con el incremento de la latitud mientras que el CC-A2 del linaje B disminuyó. Esta variación tiene un punto de inflexión en la colonia de anidación más sureña Dry Tortugas, donde el haplotipo CC-A2 alcanzó la frecuencia mayoritaria y en las colonias de anidación de Carolina del Sur y del Norte donde el haplotipo CC-A1 tuvo frecuencia unitaria. En cada costa de la Península de la Florida estuvo correlacionado el grado de diferenciación genética (Φ_{ST}) con la distancia geográfica (costa del Golfo México: $r=0.70$, $p<0.001$; costa atlántica: $r=0.73$, $p<0.001$) (Fig. 2). Esta dependencia fue mantenida cuando fueron incluidas todas las colonias de anidación de USA en la prueba de Mantel, aunque en el límite de la significación ($r=0.18$, $p=0.04$). La dependencia también se mantuvo cuando se analizaron todas las colonias de anidación de la región ($r=0.31$, $p=0.005$).

Con la aplicación del AMOVA jerarquizado I se pudo validar que las colonias de anidación del suroeste de Cuba constituyen una población panmicta, con un porcentaje de variación mayor dentro que entre las colonias de anidación (Tabla 3)

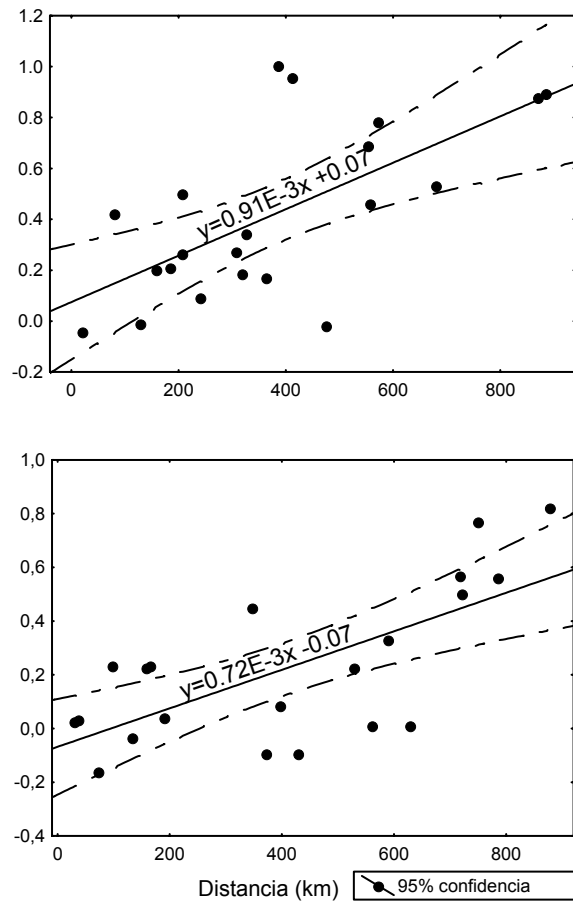


Fig. 2. Regresión lineal entre la diferenciación genética (Φ_{ST} estimado a partir de haplotipos de la región de control del mtDNA (ca. 380 pb)) versus la distancia geográfica por pares de colonias de anidación de *C. caretta* localizadas en las costas atlántica (a) y del Golfo de México (b) de la Península de la Florida. Líneas: continua, curva de regresión lineal; discontinua, límite de confianza.

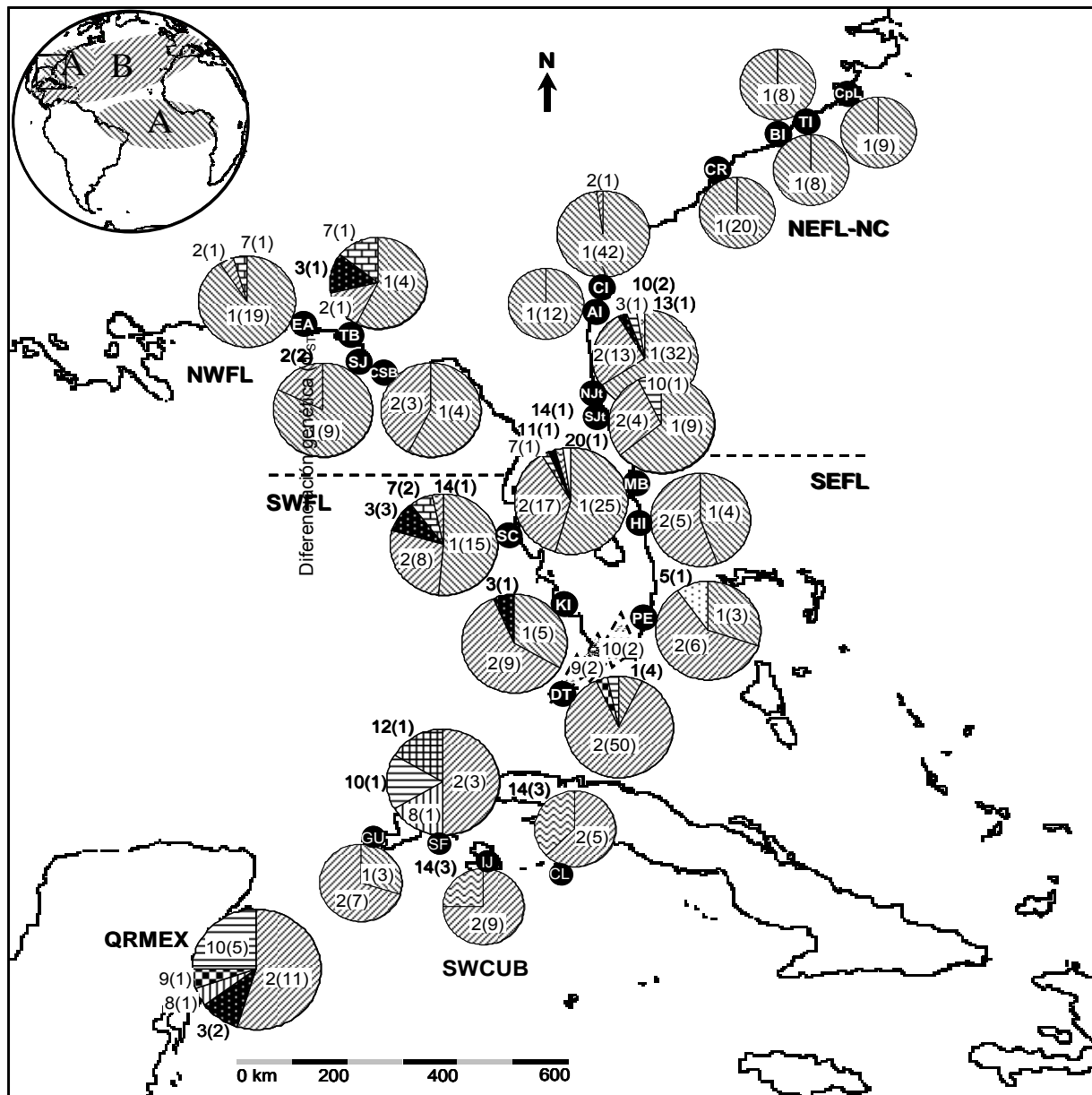


Fig. 1. Distribución y representación de los haplotipos (frecuencias absolutas y relativas representadas respectivamente por el número entre paréntesis y por matices en el pastel) de *C. caretta* en áreas/colonias de anidación (representadas con siglas) del Gran Caribe y la costa este de USA. El análisis se basó en secuencias de la RNC del mtDNA (ca. 380 pb). Linajes de la cuenca atlántica: A – Atlántico Sur y Norte; B – Gran Caribe y Mar Mediterráneo. Áreas / colonias de anidación: Carolina del Sur/ CR- Cape Romain; DT- Dry Tortugas; Georgia/ CI- Cumberland Island; NC- Carolina del Norte/ BI- Balhead Island, CpL- Cape Lookout y TI- Topsail Island; NEFL- noreste de la Florida/ Amelia Island; NWFL- noroeste de la Florida/ CSB- Cape San Blas, EA- Eglin Air Force Base, SJ- St Joseph's y TB- Tyndall Beach; QRMEX- Quintana Roo (México); SEFL- sureste de la Florida/ MB- Melbourne Beach, HI- Hutchinson Island, NJt- norte de Jetty, PE- Port Everglades, y SJt- sur de Jetty; SWCUB- suroeste de Cuba/ CL- Cayo Largo, GU- Guanahacabibes, IJ- Isla de la Juventud y SF- San Felipe; SWFL- suroeste de la Florida/ KI- Key Island y SC- Sarasota County. La generalidad de los datos de las colonias de anidación corresponden a Encalada *et al.* (1998), excepto en NJt y SJt (Francisco *et al.*, 1999); MB y SC (Francisco & Bowen, 2001; Encalada *et al.*, 1998); CSB y DT (Francisco & Bowen, 2001). Las líneas discontinuas indican las barreras biogeográficas de las costas oeste y este (Briggs, 1974) y de forma escalonada entre éstas (Muss *et al.*, 2001) de la península de la Florida. Haplotipos: CC-A1; 2; 3; 5 – 10 (Encalada *et al.*, 1998; Bolten *et al.*, 1998); CC-A12 – 14 (Bolten *et al.*, 1998) y CC – A20 (Bowen, inscrito en el Archie Carr Center). Por conveniencia sólo se representan los números ordinales que identifican a cada haplotipo delante del paréntesis.

Tabla 3. Resultados del análisis jerárquico de varianza molecular bajo tres niveles hipotéticos de estructura geográfica en colonias de anidación de *C. caretta* del Mediterráneo americano. Para la nomenclatura de las áreas y colonias de anidación ver fig. 1. p, probabilidad.

FUENTE DE VARIACIÓN	PARTICION OBSERVADA		Φ estadísticos	p
	VARIANZA	% TOTAL		
I. Estructura hipotética: colonias de anidación del SWCUB (CL, GU, IJ y SF) y las de la región (CSB, DT, EA, GE, HI, KI, MB, NJt, PE, QRMEX, SC, SJ, SJt y TB)				
Entre poblaciones	1.95	37.14	0.37	< 0.001
Dentro de poblaciones	3.31	62.86		
II. Estructura hipotética: colonias de anidación del SWCUB constituyen una unidad demográfica respecto a SFL (HI, MB, PE, NJt, SJt, KI y SC), NEFL-NC (GE), NWFL (CSB, EA, SJ y TB), DT y QRMEX				
Entre regiones	2.38	39.38	0.39	< 0.001
Entre poblaciones / regiones	0.18	3.01	0.05	0.001
Dentro de poblaciones	3.46	57.61	0.42	< 0.001
III. Estructura hipotética: colonias de anidación del SWCUB constituyen una unidad demográfica respecto a SEFL (HI, MB, PE, NJt y SJt), SWFL (KI y SC), NEFL-NC (GE), NWFL (CSB, EA, SJ y TB), DT y QRMEX				
Entre regiones	2.02	36.91	0.37	0.002
Entre poblaciones / regiones	0.18	3.22	0.05	0.54
Dentro de poblaciones	3.28	59.87	0.40	< 0.001

Al agruparse las muestras de las colonias de anidación del suroeste cubano en una unidad demográfica respecto a las preestablecidas, *i.e.* sur, noroeste y noreste de la Florida, Dry Tortugas y Quintana Roo, se obtienen porcentajes de variación semejantes dentro de las colonias de anidación y entre las agrupaciones. A pesar de que la probabilidad del índice de diferenciación entre grupos rechazó la hipótesis nula, el índice de diferenciación entre poblaciones dentro de los grupos también rechazó la hipótesis nula. Por consiguiente, el escenario hipotético II fue desechado. Similar comportamiento estadístico ocurrió con el escenario IV. Sin embargo, cuando se segregan las colonias de anidación del oeste y este del sur de la Florida (escenario hipotético III), donde las colonias de Volusia County forman parte del sureste, el índice de diferenciación entre poblaciones dentro de grupos aceptó la hipótesis nula. Por consiguiente, este escenario fue escogido como la estructura poblacional más probable.

DISCUSIÓN

Análisis de la estructura poblacional de las colonias de anidación.

Las incongruencias entre la significación de la prueba χ^2 con respecto a los valores de Φ_{ST} por pares de colonias de anidación, dependió de la resolución de cada estadístico en relación con el

tamaño de muestra y la diversidad genética, principalmente con la haplotípica en los casos en los que el χ^2 fue significativo. Para tamaños de muestras dispares con haplotipos pertenecientes a linajes diferentes y una desproporción de las frecuencias haplotípicas, el χ^2 se vuelve más sensible respecto al Φ_{ST} . El Φ_{ST} se expresa en tiempos de coalescencia probando la hipótesis nula por permutaciones de haplotipos entre poblaciones (Slatkin, 1991). Por consiguiente, en el caso de las interacciones entre las colonias de anidación suroeste de Cuba *versus* Tyndall Beach, Quintana Roo *versus* Dry Tortugas, y Cape San Blas *versus* Eglin Air Force Base, la media del tiempo de coalescencia de dos genes delineados en la misma población será cercana a la media del tiempo de coalescencia de dos genes delineados en dos poblaciones a comparar, resultando en la no significación del Φ_{ST} . Contrariamente, a pesar de que en la interacción Dry Tortugas *versus* Port Everglades están representados haplotipos de ambos linajes, la media del tiempo de coalescencia de dos genes delineados en una población distará de la media del tiempo de coalescencia de dos genes delineados en ambas poblaciones, resultando en la significación del Φ_{ST} .

La presencia de dos linajes en la unidad demográfica del suroeste de Cuba y la no existencia de estructura genética con algunas de las colonias del sur de la Florida, acentúa patrones de colonización relacionados más con

los que ocurrieron en la península de la Florida que con los que ocurrieron en México, a pesar de que estas unidades demográficas están en la misma cuenca del Mar Caribe y son las más cercanas geográficamente. La corriente de Yucatán provee un mayoritario flujo de agua hacia el Golfo de México que hacia el estrecho de la Florida, donde el flujo es pequeño y episódico a través de la contracorriente cubana (Ochoa *et al.*, 2001). A su vez, la existencia de la corriente de lazo, que en un extremo da paso directo a la corriente de la Florida, genera un flujo casi permanente de recirculación alrededor de Cuba (Gyory *et al.*, 2005). Por consiguiente, ha existido un flujo directo entre las aguas cercanas a Cuba con las del sur de la Florida, principalmente con el sureste, y limitado con las de México. Todo lo cual ha influenciado en la conformación de unidades demográficas perfectamente distinguibles entre las áreas de anidación de Cuba y México, y parecidas entre Cuba y el sureste de la Florida. Este sistema de corrientes ha sido una barrera efectiva para limitar el flujo de migrantes no sólo entre las unidades demográficas de Cuba y México, sino también entre México y noroeste de la Florida.

La dispersión de un linaje A lejanamente emparentado con el linaje B vicariante del Atlántico, la existencia de un porcentaje de variación mayor dentro que entre las colonias de anidación, la presencia de una clina de haplotipos en la península de la Florida, y la falta de endemismo en las unidades demográficas, evidencian que *C. caretta* ha fallado históricamente a la conducta de reproducción en el lugar de origen (natal homing). Probablemente, los fundadores del linaje dispersado [A] hayan tenido cierto éxito en la colonización de tierras templadas de las altas latitudes americanas durante los periodos interglaciales, debido al desafío además de largas distancias, de temperaturas menos cálidas al sur de África. El efecto fundador de este nuevo linaje sería más apreciable en las áreas no ocupadas por *C. caretta* (altas latitudes), que donde hubieran existido colonias de anidación previamente establecidas del linaje B. Durante la glaciación de Wisconsin (24 000 a 10 000 años según Hedgpeth (1954), *C. caretta* pudo anidar en el sur de la Florida, pero no en las colonias de anidación del norte de la Florida (Encalada *et al.*, 1998). Después de la glaciación, *C. caretta* pudo colonizar la costa norte de la Península de la Florida pero como fue reciente y por el linaje A, no ha existido tiempo suficiente para la diversificación del linaje y la estructuración significativa entre las colonias de anidación. Por lo que la estructura poblacional se ha considerado que abarca menos de 600 generaciones (Encalada *et al.*, *op.cit.*). Teniendo en

cuenta la semejanza de estas colonias de anidación ampliamente separadas, es muy probable que la deriva genética haya actuado durante la colonización de la parte norte de una población ancestral del sur (Francisco y Bowen, 2001), provocando la fijación del haplotipo CC-A1. Las relocalizaciones raras pueden indicar una habilidad para colonizar hábitat disponibles nuevamente en áreas de anidación durante escalas de tiempo evolutivamente largos, o una condición de desequilibrio como resultado de recientes eventos de colonización (Encalada *et al.*, 1998). La baja diversidad genética entre las colonias de anidación localizadas en la unidad noreste de la Florida hasta Carolina del Norte puede ser un reflejo de recientes dispersiones o expansiones demográficas que siguieron a los cuellos de botellas (Encalada *et al.*, *op.cit.*). Estos autores reconocen una mayor influencia de las glaciaciones sobre la demografía de las colonias de anidación localizadas en latitudes más altas que, lejos de enmascarar los límites poblacionales, revela un establecimiento reciente de la población de anidación. Sin embargo, los haplotipos que componen a las colonias de anidación de esta unidad pertenecen a un linaje [A] emparentado naturalmente con los linajes del Pacífico y no con el otro linaje atlántico [B], que aunado a la baja diversificación del linaje atlántico, revelan una reciente migración responsable en gran medida de la pérdida de límites de estructura genética entre las colonias de anidación distantes dentro de la misma unidad biogeográfica del noreste de USA.

Una vez asentado el nuevo linaje A tanto al oeste como al este de la península de la Florida, comenzó una introgresión entre las colonias de anidación donde ambos linajes se encuentran en frecuencia mayoritaria, dando lugar al surgimiento de una clina geográfica latitudinal. Estos eventos han ocurrido paralelamente en ambas costas, lo cual ha provocado falta de estructura genética entre algunas de las colonias de anidación del noroeste y noreste de la Florida, y entre todas las colonias del suroeste y sureste. Razón por la cual, la prueba de Mantel no da significativa cuando se aplica a todas las colonias de USA sin distinción de costa. No obstante, Encalada *et al.* (1998) plantean que la relocalización de ovíferas a grandes distancias puede explicar el alto estimado de migración entre las poblaciones de sitios opuestos de la península. Sin embargo, los eventos de relocalización mejor documentados han ocurrido entre playas de anidación adyacentes involucrando unas pocas decenas de kilómetros, mientras que las que ocurren a largas distancias son menos frecuentes (Richardson, 1982). En estudios de marcación se evidencian movimientos ocasionales de ovíferas entre playas de anidación

(Dodd, 1988; Bjordal *et al.*, 1983), acentuándose las conductas filopatria y fidelidad por el sitio de anidación de la especie en tiempo ecológico. La similitud de la distribución de haplotipos entre playas de anidación ampliamente separadas, quizás sea un remanente de un proceso histórico de colonización que un indicio de una migración paulatina.

La variación clinal en ambas costas de la península de la Florida ha ofrecido dificultades para el establecimiento de los límites de las unidades demográficas en esta región. La corriente de la Florida se desvía de la costa cerca de los 32°N generando remolinos, que decrecen cuesta abajo (Olson *et al.*, 1983). Francisco y Bowen (2001) consideran que las colonias de anidación de Volusia County debieron formar parte de la unidad demográfica del noreste de la Florida hasta Carolina del Norte por estar situada al norte de Cabo Cañaveral, límite biogeográfico reconocido según Avise (1992) y Briggs (1974). Sin embargo, Bowen (2004) describe una estructura genética significativa entre esta área de anidación y la unidad demográfica sur de la Florida. En el presente estudio aún más se restringe la pertenencia a la nueva unidad demográfica sureste de la Florida. Al parecer, la efectividad de la barrera marina para *C. caretta* está un poco más al norte (ca. 31°N), en la irregularidad topográfica conocida como "Charleston Bump". En esta zona, se ha descrito un carácter bimodal de la corriente de la Florida manifiesto en estados débiles y fuertes de desviación, pero con predominio de varios meses de los fuertes (Bane y Dewar, 1988). Quizás, como la colonia de anidación de Cumberland Island se localiza cerca de la zona pueda recibir migrantes de las colonias de latitudes más bajas, aunque de forma limitada. Por consiguiente, esta colonia de anidación y la vecina de Amelia Island constituyen el límite inferior de la unidad demográfica del noreste de la Florida hasta Carolina del Norte. Para el resto de las colonias de anidación de esa unidad demográfica, la barrera marina "Charleston Bump" es muy efectiva, ya que en éstas fijado el haplotipo CC-A1 a pesar de tener anidaciones con tamaños censales significativos (TEWG, 2000) en comparación con otras colonias del Gran Caribe. Sin embargo, a pesar de que en la costa noroeste de USA el haplotipo CC-A2 no se anula, la indisponibilidad de sitios para la anidación (barrera biogeográfica) en la zona central de la costa del oeste de la península de la Florida, delimita las unidades demográficas del norte y del sur. En el caso del sur de la Florida, a pesar de que no existe estructura genética por pares de colonias de anidación, exceptuando las interacciones con Dry Tortugas, se definen con el análisis de la varianza molecular jerarquizado

tres unidades demográficas en lugar de las dos clásicas (Francisco y Bowen, 2001; Encalada *et al.*, 1998). Todo lo cual reconoce la efectividad del desagüe de los Everglades (barrera biogeográfica) para limitar el flujo amplio de migrantes entre las colonias de anidación de Dry Tortugas, y del suroeste y sureste de la Florida.

Adicionalmente, Dry Tortugas permaneció sumergida durante los periodos interglaciares del Pleistoceno (Guertin *et al.*, 1999), lo que revela un origen reciente de sus colonias de anidación. Consecuentemente estos cayos han de comportarse como sumidero de las colonias vecinas tanto del sur de la Florida como del Gran Caribe, lo cual se evidencia en la presencia del linaje vicariante [B] con predominio del haplotipo mejor distribuido y más representado CC-A2.

Implicaciones para la conservación.

Las colonias de anidación del suroeste cubano constituyeron una unidad demográfica independiente. Por consiguiente, deberán tenerse en cuenta para implementar programas de manejo efectivos, que contribuyan a la preservación de la diversidad genética y de la supervivencia de estas poblaciones en el Gran Caribe. Estas colonias de anidación como otras de tamaño discreto han funcionado como reservorios genéticos durante eventos que han provocado el declive de colonias de anidación específicas, por lo que consecuentemente deben recibir atención en los programas de conservación regional. Conociendo que en la población de anidación del suroeste cubano está el haplotipo CC-A12, se podrá determinar con mayor eficiencia la contribución de las poblaciones de anidación a los hábitats marinos de agregación donde este haplotipo fue reportado con anterioridad por Bolten *et al.* (1998). Consecuentemente este resultado contribuye al conocimiento del nicho y la ruta migratoria de *C. caretta* durante su ciclo de vida en el Gran Caribe. Los resultados de este trabajo también aportan información útil para el diseño de áreas marinas protegidas (Bowen y Roman, 2005) en Cuba, encaminadas a la conservación de esta especie, integrando los hábitat que usa en función del nicho y considerando el potencial evolutivo de este demo dentro del genofondo de la metapoblación de *C. caretta* en el Gran Caribe y costa atlántica.

AGRADECIMIENTOS

Se le agradece a las personas e instituciones que han hecho posible el monitoreo y la obtención de las muestras, en particular a los voluntarios que han participado en el "Proyecto Universitario para el Estudio y Conservación de las Tortugas Marinas en Cuba" (Centro de Investigaciones

Marinas y Facultad de Biología de la Universidad de La Habana), Gonzalo Nodarse del Centro de Investigaciones Pesqueras de Cuba y a la Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna. De mucha utilidad han sido las sugerencias formuladas por Erik García, Aymee Robaina, James W. Wiley y Vicente Berovides Álvarez, así como el soporte económico aportado por el profesor Wiley en varias etapas de la investigación.

REFERENCIAS

- Avice, J.C. (1992): Molecular population structure and biogeographic history of a regional fauna: A case history with lessons for conservation biology. *Oikos* 63:62-76.
- Bane, J.M.Jr. and W.K. Dewar (1988): Gulf Stream bimodality and variability downstream of the Charleston Bump. *Journal of Geophysical Research* 93:6695-6710.
- Bass, A.L., D.A. Good, K.A. Bjorndal, J.I. Richardson, Z-M. Hillis, J.A. Horrocks and B.W. Bowen (1996): Testing models of female reproductive migratory behavior and population structure in the Caribbean Hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* with mtDNA sequences. *Molecular Ecology* 5:321-328.
- Bjorndal, K.A., A.B. Meylan and B.J. Turner (1983): Sea turtles nesting at Melbourne Beach, Florida. I. Size, growth and reproductive biology. *Biol. Conserv.* 26:65-77.
- Bolten, A.B., K.A. Bjorndal, H.R. Martins, T. Dellinger, M.J. Bischoff, S.E. Encalada and B.W. Bowen (1998): Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecological Applications* 8(1):1-7.
- Bowen, B.W. and J. Roman (2005): Gaia's Handmaidens: the Orlog Model for conservation biology. *Cons. Biol.*, pp: 1037-1043.
- Bowen, B.W. (2004): Conservation implications of complex population structure in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). Final report to the southeast fisheries science center. Requisition NFFN7020-4-00050, 34 pp.
- Bowen, B.W., and S.A. Karl. (2007). Population genetics and phylogeography of sea turtles. Invited review, *Molecular Ecology* 16: 4886-4907.
- Bowen, B.W., N. Kamezaki, C.J. Limpus, G.H. Hughes, A.B. Meylan and J.C. Avice (1994): Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evol.* 48:1820-1828.
- Bowen, B.W., W.S. Grant, Z. Hillis-starr, D.J. Shaver, K.A. Bjorndal, A.B. Bolten and A.L. Bass (2007): Mixed-stock analysis reveals the migrations of juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean Sea. *Molecular Ecology* 16:49-60.
- Briggs, J.C. (1974): *Marine Zoogeography*. McGraw-Hill, NY. 475 pp.
- Dood, C.K.Jr. (1988): Synopsis of the biological data on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Linnaeus 1758). *U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report* 88(14):1-110.
- Encalada, S.E., K.A. Bjorndal, A.B. Bolten, J.C. Zurita, B. Schroeder, E. Possardt, C.J. Sears and B.W. Bowen. (1998): Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Mar. Biol.* 130:567-575.
- Encalada, S.E., P.N. Lahanas, K.A. Bjorndal, A.B. Bolten, M.M. Miyamoto 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. *Mol. Ecol.* 5:473-483.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider (2005): Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Excoffier, L., P. Smouse y J. Quattro (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- FitzSimmons, N.N., J.D. Miller, C. Moritz, C.J. Parmenter, C.J. Limpus and R. Prince (1996): Comparative genetic structure of green, loggerhead, and flatback populations in Australia based on variable mtDNA and nDNA regions. *En: Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics* (B.W. Bowen and W.N. Witzell, eds.), *NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFSC-396*, pp: 25-32.
- Francisco, A. and B.W. Bowen (2001): Identification of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) stock structure in the southeastern united states and adjacent regions using nuclear DNA markers. Master Thesis, University of Florida, 71 pp.

- Francisco, A., A. Bass and B. Bowen (1999): Genetic characterization of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) Nesting in Volusia County. Department of Fisheries and Aquatic Sciences, <http://www.Floridaconservation.org>
- Guertin, L.A., D.F. McNeill, B.H. Lidz, and K.J. Cunningham (1999): Chronology and Transgressive Regressive Signatures in the Late Neogene Siliciclastic Foundation (Long Key Formation) of the Florida Keys. *Journal of Sedimentary Research*, vol. 69, pp. 653-666.
- Gyory, J., A.J. Mariano and E.H. Ryan (2005): The Loop Current. Ocean Surface Currents. <http://oceancurrents.rsmas.miami.edu/caribbean/loopCurrent>.
- Hall, T. (1997-2001): BioEdit version 5.0.6. North Carolina State University, Department of Microbiology.
- Hedgpeth, J.W. (1954): An introduction to the zoogeography of the northern Gulf of Mexico with reference to the invertebrate fauna. Institute of Marine Science, University of Texas, Port Arkansas, Texas, 3:111-211.
- Hillis, D., C. Moritz y B.K. Mable. (1996): Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 655 pp.
- Hilton-Taylor, C. (comp.) (2000): *2000 IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. XVIII + 61pp.
- Laurent, L., P. Casale, M.N. Bradai, B.J. Godley, G. Gerosa, A.C. Broderick, W. Schroth, B. Schierwater, A.M. Levy, D. Freggi, E.M. Abd El-Mawala, D.A. Hadoud, H.E. Gomati, M. Domingo, M. Hadjichristophorou, L. Kornaraky, F. Demirayak and CH. Gautier (1998): Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Mol. Ecol.* 7:1529-1542.
- Murphy, T.M. and S.R. Hopkins (1984): *Aerial and Ground Surveys of Marine Turtle Nesting beaches in the Southeast Region, United States*. Final Report to National Marine Fisheries Service Contract No. NA83-GA-C-00021, Southeast Fisheries Center, Miami, USA, 73 pp.
- Nodarse, G., F. Moncada, A. Meneses and C. Rodríguez (2000): Monitoring of loggerhead (*Caretta caretta*) nesting on the south coast of the Isla de la Juventud. *Proceedings of the twentieth Annual Symposium on Sea turtle Biology and Conservation* (A. Mosier, A. Foley and B. Brots, comp.), NOAA Tech. NMFS- SEFSC- 477, 369 pp.
- Norman, I.A., C. Moritz and C.J. Limpus (1994): Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Mol. Ecol.* 3:363-373.
- Ochoa, J., H. Sheinbaum, A. Badan, J. Candela and D. Wilson (2001): Geostrophy via potential vorticity inversion in the Yucatan Channel. *Journal of Marine Research* 59:725-747.
- Olson, D.B., O.B. Brown and S.R. Emerson (1983): Gulf Stream frontal statistics from Florida Straits to Cape Hatteras derived from satellite and historical data, *Journal of Geophysical Research* 88:4569-4577.
- Rice, W.M. (1989): Analyzing tables of statistical test. *Evol.* 43:223-225
- Richardson, J.I. (1982): A population model for adult female loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) nesting in Georgia. Univ. of Georgia, Athens, Georgia. Ph.D. 221 pp.
- Roff, D.A. and P. Bentzen (1989): The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X² and the problem of small samples. *Mol. Biol. Evol.* 6:539-545.
- Slatkin, M. (1991): Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res. Camb.* 58:167-175.
- Smouse, P.E., J.C. Long and R.R. Sokal (1986): Multiple regression and correlation extensions of the Mantel Test of matrix correspondence. *Syst. Zool.* 35:627-632
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf (1981): *Biometry*, 2^{da} edición. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 453 pp.
- Tamura, K. (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition – transversion and G+C content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9:678-687.
- TEWG (2000): *Assessment update for the Kemp's ridley and loggerhead sea turtle populations in the western North Atlantic*. NOAA Technical Memo-randum NMFS-SEFSC, 444 pp.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins (1997): The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-4882.
- Zaykin, D.V. and A.I. Pudovkin (1993): Two programs to estimate significance of X² values using pseudo-probability tests. *Journal of Heredity*. 84:152.

Aceptado: 12 de abril de 2008