

# Estudio poblacional y genético de la tortuga *Chelonia mydas agassizii* (Sauria: Cheloniidae) en la Playa Chinchorro, Arica, Chile

Population and genetic study of the turtle *Chelonia mydas agassizii* (Sauria: Cheloniidae) in Chinchorro Beach, Arica, Chile

David Veliz<sup>1</sup>, Paula Salinas<sup>2</sup>, Walter Sielfeld<sup>2</sup>, Darío Contreras<sup>2</sup>,  
Cristian Azocar<sup>2</sup>, Marcos Tobar<sup>2</sup> y Jesús Gallardo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Ecológicas, Instituto de Ecología y Biodiversidad y Núcleo Milenio de Ecología y Manejo Sustentable de Islas Oceánicas, Universidad de Chile, Casilla 653, Ñuñoa, Santiago, Chile. dveliz@uchile.cl

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias del Mar, Universidad Arturo Prat, Casilla 121, Iquique, Chile. paula.salinas@gmail.com

**Abstract.** Observations on *Chelonia mydas agassizii* have been carried out on a monthly basis for the last 2 years along the Chinchorro beach in Arica (northern Chile), with the aim of monitoring and describing genetic and population parameters in this group of turtles. Eighteen *Ch. mydas agassizii* individuals were captured and marked from December 2011, to July 2013. These individuals had long carapace of 47 to 75.7 cm, of which 11 were identified as females and the rest were of undetermined sex (individuals of smaller sizes). We were only able to recapture one of such individuals 6 months later in the same feeding area. Sequencing of the mtDNA Control Region showed 4 haplotypes: 3 that had never been described before and one observed in several regions of the Pacific (Japan, Mexico and Ecuador). This information suggests that *Ch. mydas agassizii* may stay in the same feeding zone for months. Nevertheless, the genetic information did not indicate any association between the individuals captured from the Chinchorro Beach and a nesting area in the Pacific.

**Key words:** mtDNA, northern Chile, feeding area, sandy beach

## INTRODUCCIÓN

La tortuga negra, *Chelonia mydas agassizii* (Bocourt, 1868), se encuentra distribuida a lo largo del Pacífico oriental, siendo común desde el centro de la Península de Baja California y el Golfo de California, hasta el norte de Perú. No obstante, en temporadas muy cálidas, se ha observado en British Columbia (Canadá) en el hemisferio norte y en la Región de Magallanes en el hemisferio sur (Guzmán & Campodónico 1973).

El primer reporte de esta tortuga negra para las costas chilenas, fue realizado por Philippi en 1899 quien detalló diferencias entre estas tortugas y la tortuga verde descrita por Linnaeus (1768) (Donoso-Barros 1966). En la actualidad aún existe discusión sobre su estado taxonómico, encontrándose diferencias en tamaño, coloración, forma del caparazón y distribución, no existiendo aun evidencias moleculares claras de esta diferencia. Sin embargo Urbiola & Chassin (2011) señalan la existencia de un consenso entre los opositores y defensores indicando que la tortuga negra es particular en sus haplotipos y características morfológicas.

Se ha descrito que *Ch. mydas agassizii* es herbívora, por lo que se asocia a sectores costeros con presencia de

algas y pasto marino (Mortimer 1981, Mendonça 1983). Esta especie nidifica principalmente en las costas de Michoacán (México), costa Pacífico de Costa Rica y en las Islas Galápagos, Ecuador (Eckert *et al.* 2000). Se ha descrito que el rango de talla de la longitud curva del caparazón de las hembras anidadoras en las colonias de México va desde un mínimo y un máximo de 65 y 117 cm, para el caso de Galápagos van desde 74 a 100 cm y en el Golfo de California van desde 59 a 107 cm (Márquez 1990).

Su filopatría hace que individuos juveniles migren desde su lugar de nacimiento a lugares de alimentación para luego de algunos años vuelvan a reproducirse a su lugar natal (Carr & Ogren 1960, Limpus *et al.* 1984, Bowen *et al.* 1992). Análisis realizados con la variabilidad del mtADN han mostrado la factibilidad de hacer una relación entre una zona de forrajeo y el lugar de nacimiento en esta especie. Por ejemplo, Proietti *et al.* (2009) indicaron que los individuos de la Isla Arvoredo (Brasil) provienen desde Isla Ascensión (en medio del océano Atlántico) e Isla Aves (Venezuela). Por otro lado, Bowen *et al.* (1992) mostraron claras diferencias genéticas entre individuos provenientes desde Surinam y la Isla Ascensión los cuales utilizan las mismas áreas de alimentación.

En Chile no se han descrito zonas de anidamiento por lo que la presencia de *Ch. mydas agassizii* se asocia a su periodo de desplazamiento y alimentación. Se ha observado esta especie ocasionalmente abundante durante periodos de El Niño, encontrándose algunos lugares con individuos alimentándose durante todo el año en Mejillones y Antofagasta (Bolados-Díaz *et al.* 2007<sup>1</sup>, Silva *et al.* 2007<sup>2</sup>).

Los principales motivos que incluyen a esta especie en la lista de especies en peligro (Seminoff 2004) son la reducción del área de reproducción y de alimentación, así como la captura incidental y contaminación de los mares (Broderick *et al.* 2006). Con el fin de establecer medidas de conservación de esta especie en la XV Región de Arica y Parinacota, desde hace 3 años el grupo 'Tortumar' de la Universidad Arturo Prat, ha monitoreado las tortugas negras del área de alimentación de playa Chinchorro. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue describir características poblacionales (sexo, tamaño y madurez sexual) de *Ch. mydas agassizii* además de una descripción genética utilizando la Región Control del mtADN con el fin de determinar la posible procedencia de estos individuos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDIO

La captura de *Chelonia mydas agassizii* se realizó en la playa Chinchorro de Arica, específicamente en la zona denominada La Puntilla (18°28'S). En este lugar desemboca el río San José el cual descarga aguas durante periodos de lluvia Altiplánica (diciembre a febrero). Esta zona se caracteriza por ser una playa expuesta, con presencia de cantos y bloques a profundidades mayores a 1 m las cuales están recubiertas de algas, principalmente *Ulva* y *Chondracanthus*, alimento de *Ch. mydas agassizii* (Silva *et al.* 2007<sup>2</sup>; P. Salinas obs. pers.).

### ANÁLISIS DE LOS INDIVIDUOS

Los especímenes estudiados fueron capturados mediante una red de pared de 110 m de largo 2,5 m de alto y abertura

de malla de 43 cm, así como también se capturaron de forma manual, durante las campañas de muestreo realizadas desde diciembre del 2011 a julio del 2013. Los individuos capturados (N= 18) fueron trasladados a la playa para su medición (cinta métrica flexible, precisión 1mm), marcaje (anillos de acero numerado) y posterior liberación. La medición del largo del caparazón, largo de la cola y garras se realizó de acuerdo lo indicado por Eckert *et al.* (2000); esta información permitió determinar la madurez y el sexo de los individuos (Marquez 1990).

### ANÁLISIS GENÉTICO

Desde cada espécimen muestreado se obtuvo una pequeña muestra de piel (1 g) proveniente de la aleta derecha la cual se mantuvo en tubos de 2 ml los cuales contenían 1 ml de etanol al 95% para el transporte. En el laboratorio, las muestras fueron secadas por 5 h a temperatura ambiente para luego proceder con la extracción de ADN utilizando el protocolo descrito por Aljanabi & Martinez (1997). Una vez obtenido el ADN, se midió su concentración utilizando un nanoespectrofotómetro (Nanodrop) y su integridad con geles de agarosa al 2%.

Se amplificó la Región Control del ADN mitocondrial, utilizando los partidores descritos por Allard *et al.* (1994). La reacción de PCR se llevó a un volumen final de 25  $\mu$ L que correspondió a buffer PCR 10X (50 mM KCL, 10 mM tris-HCL, pH 8,0), 3,2 nM MgCl<sub>2</sub>, 50 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> de cada partidor, 2,5 mM dNTP y 0,1 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> de Taq polimerasa. Se agregó 1,5  $\mu$ L de DNA a 50 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>. El protocolo de amplificación fue modificado en nuestro laboratorio utilizando con un ciclo de denaturación inicial a 94°C durante 5 min, 30 ciclos que contienen 95°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 30 s, la elongación final fue de 72°C durante 5 min. El producto PCR fue enviado a la empresa coreana MacroGen Inc.<sup>3</sup>, quienes secuenciaron ambas hebras de ADN en un secuenciador Applied Biosystems®. Las secuencias resultantes fueron alineadas utilizando el programa ProSeq (Filatov 2002) y corroboradas con ambas hebras con el programa Multalign (Corpet 1988). Finalmente, utilizando la

<sup>1</sup>Bolados-Díaz P, C Guerra-Correa, C Guerra & A Silva. 2007. Estudio poblacional de la congregación de tortuga verde, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), presente en bahía Mejillones del Sur, Antofagasta, Chile. VII Simposio sobre Medio Ambiente: Estado Actual y Perspectivas de la Investigación y Conservación de las Tortugas Marinas en las Costas del Pacífico Sur Oriental, Antofagasta-Chile, 27-29 de Septiembre 2007, p. 18.

<sup>2</sup>Silva A, C Guerra-Correa, C Guerra & P Bolados-Díaz. 2007. Descripción de áreas de forrajeo y su incidencia en la presencia de tortugas marinas. VII Simposio sobre Medio Ambiente: Estado Actual y Perspectivas de la Investigación y Conservación de las Tortugas Marinas en las Costas del Pacífico Sur Oriental, Antofagasta-Chile, 27-29 de Septiembre 2007, p. 19.

<sup>3</sup><<http://www. www.macrogen.com>>

herramienta bioinformática BLAST de GenBank<sup>4</sup> se contrastó nuestras secuencias con aquellas descritas en la base de datos internacional. Los haplotipos fueron publicados en GenBank (número de acceso: KM203873 a KM203876).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el periodo de muestreo fue posible estudiar 18 individuos (Tabla 1), los cuales presentaron un largo de caparazón que fluctuó entre 47 y 75,7 cm. Estos valores

**Tabla 1. Características de tamaño, fecha de captura y haplotipo of *Chelonia mydas agassizii* en Playa Chinchorro. LCC= Largo curvo del caparazón / Characteristics of size, sex, date of capture and haplotype of *Chelonia mydas agassizii* in Chinchorro Beach. LCC= Curve length of the carapace**

Identificador	LCC (cm)	Sexo	Mes de captura	Haplotipo
1	75,5	hembra	Abr-12	H1
2	69,5	hembra	May-12	H2
3	66,8	hembra	May-12	H1
4	69,4	hembra	Jun-12	H1
5	66,0	hembra	Ago-12	H3
7	70,0	hembra	Ago-12	H1
8	69,0	hembra	Sep-12	H1
9	64,0	hembra	Dic-12	H1
11	48,0	indeterminado	Dic-12	H1
12	55,5	indeterminado	Ene-13	H2
13	53,5	indeterminado	Ene-13	H2
14	71,5	hembra	Ene-13	H1
15	60,4	indeterminado	Jun-13	H1
16	47,0	indeterminado	Jun-13	H1
17	57,7	indeterminado	Jun-13	H1
18	74,8	hembra	Jun-13	H1
19	51,0	indeterminado	Jul-13	H2
20	75,7	hembra	Jul-13	H4

fueron similares a los informados por Bolados-Díaz *et al.* (2007)<sup>1</sup> para individuos presentes en Mejillones (40 a 82,5 cm) y para aquellos medidos por Brito *et al.* (2007)<sup>5</sup> en Bahía Salado, Región de Atacama (40 a 120 cm). Utilizando el criterio de Eckert *et al.* (2000), 7 de estos individuos fueron clasificados en la categoría de indeterminados y los 11 individuos de mayor tamaño fueron clasificados en la categoría hembra. No se detectó individuos que presentaran una cola larga, característico de individuos machos. Si bien la ausencia de machos en esta colonia resulta ser interesante, otros estudios realizados en el país mostraron un patrón similar. Mientras que Bolados-Díaz *et al.* (2007)<sup>1</sup> registró 2 machos de un total de 127 individuos censados en un estudio realizado durante 5 años (2003 a 2007) en Mejillones, Salinas & Sielfeld (2007)<sup>6</sup> registraron 1 macho de un total de 76 individuos estudiados durante 7 años (2001 a 2007) en Bahía Chipana, Iquique.

En el presente estudio se realizó solo una recaptura (marca 0020-0019). Este individuo hembra fue capturado por primera vez en enero 2013 y su recaptura en julio del mismo año, sugiriendo que permaneció durante todo ese tiempo en el sector. Al igual a nuestras observaciones, Bolados-Díaz *et al.* (2007)<sup>1</sup> describen individuos recapturados después de 3 años, por lo que la zona norte de Chile sería parte de la zona de alimentación de esta especie y no sólo una zona de paso. Se ha descrito que esta conducta es típica de los lugares de alimentación de esta especie en la cual los individuos viven hasta el momento que realizan la migración reproductiva (Márquez 1996). Considerando el rango de tamaños observado en nuestro estudio, Bolados-Díaz *et al.* (2007)<sup>1</sup> y Brito *et al.* (2007)<sup>7</sup>, los individuos que permanecen en zonas de alimentación han llegado en diferentes periodos, mezclándose individuos que aún no están en edad reproductiva y otros que podrían estar migrando a las áreas de reproducción.

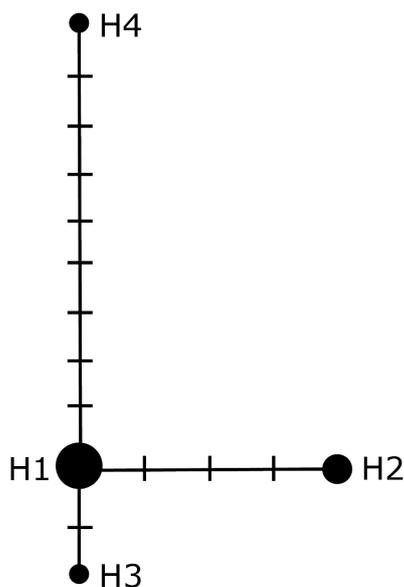
<sup>4</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<sup>5</sup>Brito JL, G Domínguez, M Marambio & P Gysel. 2007. La necesidad de proteger a las tortugas marinas de Chascos, Bahía Salado, Región de Atacama, Chile. VII Simposio sobre Medio Ambiente: Estado Actual y Perspectivas de la Investigación y Conservación de las Tortugas Marinas en las Costas del Pacífico Sur Oriental, Antofagasta-Chile, 27-29 de Septiembre 2007, p. 20

<sup>6</sup>Salinas P & W Sielfeld. 2007. Registros de cadáveres de tortuga negra *Chelonia agassizii* (Bocourt, 1868) en Bahía Chipana (21°19'S-70°03'W), Iquique, Chile. VII Simposio sobre Medio Ambiente: Estado Actual y Perspectivas de la Investigación y Conservación de las Tortugas Marinas en las Costas del Pacífico Sur Oriental, Antofagasta-Chile, 27-29 de septiembre 2007, p. 21.

<sup>7</sup>Brito JL, G Domínguez, M Marambio & P Gysel. 2007. La necesidad de proteger a las tortugas marinas de Chascos, Bahía Salado, Región de Atacama, Chile. VII Simposio sobre Medio Ambiente: Estado Actual y Perspectivas de la Investigación y Conservación de las Tortugas Marinas en las Costas del Pacífico Sur Oriental, Antofagasta-Chile, 27-29 de septiembre 2007, p. 20

En el análisis genético, se obtuvo secuencias de 540 pares de bases sin ambigüedades, los cuales alineados revelaron la presencia de 4 haplotipos (Fig. 1). El primer haplotipo (H1) fue observado en 12 de los individuos estudiados. El segundo haplotipo (H2) se observó en 4 individuos y presentó 3 pasos mutacionales con el haplotipo 1 (posición 34, 217 y 303). El haplotipo 3 (H3) se registró en un individuo y presentó solo un paso mutacional con el haplotipo 1 (posición 142). Finalmente el haplotipo 4 (H4) presentó la inserción de 8 bases (posición 36 al 42 y la posición 46). La utilización de la herramienta BLAST de GenBank mostró que el haplotipo 1 fue registrado en Galápagos (Número de acceso JX454978.1) y México (JX454974.1) por Duchene *et al.* (2012); además de estar descrito en individuos de Japón (AB485794.1) por Nishizawa *et al.* (2010). Finalmente los haplotipos 2, 3 y 4 no han sido reportados en la base de datos.



**Figura 1.** Red de haplotipos indicando el número de pasos mutacionales (líneas perpendiculares a los enlaces) entre los diferentes haplotipos (círculos). H1= 12 individuos, H2= 4 individuos, H3 y H4= 1 individuo / Haplotype network indicating the number of mutational steps (perpendicular lines to links) among the haplotypes (circles). H1= 12 individuals, H2= 4 individuals, H3 and H4= 1 individual

La presencia de un haplotipo (H1) descrito en varios lugares dentro del océano Pacífico y otros 3 jamás descritos hicieron que un análisis cuantitativo de asignación poblacional sea irrealizable. En este plano, el análisis cualitativo mostró que los individuos presentes en Playa Chinchorro no pueden ser aún atribuidos a una zona específica de nidificación. Esto quiere decir, que se necesita la utilización de otras metodologías que permitan un seguimiento directo de los individuos, por ejemplo a través de la utilización de seguimiento satelital. Este tipo de técnica ha mostrado los amplios movimientos de esta especie en el Pacífico, inclusive individuos que se han monitoreado desde Colombia a Isla de Pacífico Oeste (Amarocho *et al.* 2012).

Es posible que *Ch. mydas agassizii* presente en Playa Chinchorro provengan desde las Islas Galápagos, el lugar de nidificación más cercano conocido y de mayor envergadura en el Pacífico Este (Hurtado 1984, 2001). Sin embargo, se requieren más investigaciones, *e.g.*, que utilicen un mayor número de marcadores moleculares como por ejemplo microsatelites y SNPs, como los resultados recientes de Roden *et al.* (2013) quienes lograron discriminar grandes grupos poblacionales dentro del Pacífico.

Finalmente, la conservación de esta especie depende no sólo de conservar las zonas de nidificación; la conservación de las áreas de alimentación son prioritarias dado que es la zona en la cual los individuos permanecen por un mayor tiempo. En este punto, playa Chinchorro resulta ser un lugar importante, principalmente por la presencia de hembras de tortuga negra de diferentes tamaños, utilizando estas costas para obtener alimento y estar en condición para la reproducción y la migración al lugar de nidificación.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al editor y a los evaluadores por sus valiosos comentarios. A R Gauci y P Muñoz-Rojas por el trabajo de laboratorio, al equipo Tortumar-Chile de la Universidad Arturo Prat y a todos los voluntarios de terreno. Este trabajo fue financiado por el proyecto FIC Gobierno Regional de Arica y Parinacota 'Programa de conservación de tortugas marina en la región de Arica y Parinacota y su potencial para el desarrollo de actividades de turismo de interés especiales'. DV agradece a los proyectos ICM P05-002, CONICYT PFB-23 y Proyecto Núcleo Milenio NC120030.

## LITERATURA CITADA

- Aljanabi SM & I Martinez. 1997.** Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Allard MW, MM Miyamoto, KA Bjorndal, AB Bolten & BW Bowen. 1994.** Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. *Copeia* 1: 34-41.
- Amorocho DF, FA Abreu-Grobois, PH Dutton & RD Reina. 2012.** Multiple distant origins from Green sea turtles aggregating off Gorgona Island in the Colombian Eastern Pacific. *PlosOne* 7: e31486.
- Bowen BW, AB Meylan, JP Ross, CJ Limpus, GH Balazs & JC Avise. 1992.** Global population structure and natural history of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46: 865-880.
- Broderick AC, R Frauenstein, F Glen, GC Hays, AL Jackson, T Pelembe, GD Ruxton & BJ Godley. 2006.** Are green turtles globally endangered? *Global Ecology and Biogeography* 15: 21-26.
- Carr A & L Ogren. 1960.** The ecology and migrations of sea turtles, IV: the green turtle in the Caribbean Sea. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 121: 1-48.
- Corpet F. 1988.** Multiple sequence alignments with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16: 10881-10890.
- Donoso-Barros R. 1966.** Reptiles de Chile, 458 pp. Ediciones Universidad de Chile, Santiago.
- Duchene S, A Frey, A Alfaro-Nunez, PH Dutton, P Thomas, M Gilbert & PA Morin. 2012.** Marine turtle mitogenome phylogenetics and evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 241-250.
- Eckert KL, KA Bjorndal, FA Abreu-Grobois & M Donnelly. 2000.** Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación Número 4: 1-270.
- Filatov DA. 2002.** ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes* 2: 621-624.
- Guzmán ML & GI Campodónico. 1973.** Presencia de *Chelonia mydas agassizi* Bocourt, 1868, en Magallanes. *Anales del Instituto de la Patagonia* 4: 439-441.
- Limpus CJ. 1993.** The green turtle, *Chelonia mydas*, in Queensland -breeding males in the southern Great Barrier Reef. *Wildlife Research* 20: 513-523.
- Márquez R. 1990.** FAO Species Catalogue. Vol. 11. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtles species know to date. FAO Fisheries Synopsis 125(11): 1-81.
- Márquez R. 1996.** Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de Cultura Económica, México D.F. La Ciencia desde México 144: 1-197.
- Mendonça MT. 1983.** Movements and feeding ecology of immature green turtles (*Chelonia mydas*) in a Florida Lagoon. *Copeia* 1983: 1015-1023.
- Mortimer JA. 1981.** The feeding ecology of the west caribbean green turtle (*Chelonia mydas*) in Nicaragua. *Biotropica* 13: 49-58.
- Nishizawa H, J Okuyama, M Kobayashi, O Abe & N Arai. 2010.** Comparative phylogeny and historical perspectives on population genetics of the Pacific Hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) and Green turtles (*Chelonia mydas*), inferred from feeding populations in the Yaeyama Islands, Japan. *Zoological Science* 27: 14-18.
- Proietti MC, P Lara-Ruiz, JW Reisser, LS Pinto, OA Dellagostin & LF Marins. 2009.** Green turtles (*Chelonia mydas*) foraging at Arvoredo Island in southern Brazil: genetic characterization and mixed stock analysis through mtDNA control region haplotypes. *Genetics and Molecular Biology* 32: 613-618.
- Roden SE, PA Morin, A Fey, GH Balazs, P Zarate, I-J Cheng & PH Dutton. 2013.** Green turtle population structure in the Pacific: new insights from single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Endangered Species Research* 20: 227-234.
- Seminoff JA. 2004.** *Chelonia mydas*. In: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>
- Urbiola E & O Chassin. 2011.** Relaciones filogenéticas del género *Chelonia*. *Biológicas, México* 13: 41-47.

Recibido el 27 de enero de 2014 y aceptado el 4 de agosto de 2014

Editor: Claudia Bustos D.