



NUEVOS MARCADORES MITOCONDRIALES MEJORAN LA FILOGENIA DE LA TORTUGA CAREY *Eretmochelys imbricata* (TESTUDINES: CHELONIIDAE)

NEW MITOCHONDRIAL MARKERS IMPROVE THE PHYLOGENY OF THE HAWKSBILL TURTLE *Eretmochelys imbricata* (TESTUDINES: CHELONIIDAE)

Beltrán-Torres G.C.¹, Hernández-Fernández J.^{1,*}

¹ Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Grupo de Investigación en Genética, Biología Molecular y Bioinformática-GENBIMOL, Carrera 4 No. 22-61, Bogotá, Colombia.

* Autor correspondiente: javier.hernandez@utadeo.edu.co

ABSTRACT

The sea turtles (Cheloniidae) are a group of seven species of cretaceous origin. Analyses of partial mitochondrial sequences have revealed phylogenetic inconsistencies within this group. Nevertheless, these mitochondrial markers have allowed us to understand, explain and clarify population composition in areas of foraging, reproductive habits, inferences of migration patterns and, also, to define management units in the world, in order to trace conservation and monitoring plans. In this study, four methods were evaluated and compared for phylogenetic inference (Neighbor-Joining-NJ, Maximum Likelihood-ML, Maximum Parsimony-MP and Bayesian inference-BI) by using coding genes, ribosomal genes and full mitogenomes of the hawksbill, *E. imbricata*, and other six species of sea turtles obtained from GenBank. The sequences were analyzed independently and jointly to identify the method and marker that better explain the phylogenetic relationships among this group of reptiles. The NJ, ML, MP and BI trees showed that ND2, COX1, 16S rRNA, ND5, 12S rRNA, ND4 and COX3 are the markers that give phylogenetic trees with better resolution and support, with bootstrap values ranging from 89.0% to 99.98%. ATP6, ATP8, COX2, ND1, ND3, ND5 and ND4L genes presented polytomies. The analysis with full mitogenome often provides highly supported trees (bootstrap 98.0%) compared with single marker analysis. Trees obtained with the BI method and the ND2 gene is the one that better resolved the evolutionary relationships among the species, consolidating the position of *E. imbricata* within the Caretini tribe with a value of posterior probability of 0.98-1.0. The markers ND2, ND4, ND5 and COIII, not used in previous works, represent a new alternative to explain the phylogeny in this group of marine reptiles. In the present study, a complete mitogenome analysis produced robust and highly supported trees.

Key words: phylogenetic relationships, *Eretmochelys imbricata*, mitogenoma, sea turtles, *bootstrap*, polytomies

RESUMEN

Las tortugas marinas (Cheloniidae) son un grupo de siete especies originadas en el cretáceo. Análisis de secuencias parciales de DNA mitocondrial han revelado inconsistencias filogenéticas dentro de este grupo de quelonios. Sin embargo, estos marcadores mitocondriales han permitido entender y dilucidar la composición de las poblaciones en áreas de forrajeo, hábitos reproductivos, inferencias de patrones de migración y también definir las unidades de manejo en el mundo, con el fin de proponer planes de manejo y conservación. El objetivo de este estudio fue evaluar la posición de la tortuga carey *E. imbricata* dentro de la familia Cheloniidae y la filogenia de las tortugas marinas utilizando genes mitocondriales codificantes de proteínas, genes ribosómicos y el genoma mitocondrial completo de la tortuga carey anidante del Caribe colombiano, al compararlo con las otras seis especies de tortugas marinas disponibles en GenBank. Se utilizaron cuatro métodos de inferencias filogenéticas: Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verosimilitud (ML), Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (IB). Los árboles NJ, ML, MP e IB mostraron que ND2, COX1, 16S ARNr, ND5, 12S ARNr, ND4, COX3 y ND1 son los marcadores que presentan una mejor resolución filogenética con sustentos *bootstrap* entre 89,0% y 99,98%. Los genes ATP6, ATP8, COX2, ND3, ND4L y ND5 presentaron politomías y establecieron relaciones filogenéticas equivocadas. El análisis con el mitogenoma completo presentó árboles altamente sustentados (*bootstrap* de 98,0%) en comparación con el análisis con marcadores individuales. Los árboles obtenidos con el gen ND2 e IB resolvieron con buen sustento las relaciones evolutivas entre las especies comparadas, consolidándose la posición de *E. imbricata* dentro de la tribu Caretini con probabilidad posterior de 0,98-1,0. Los marcadores ND2, ND5, ND4, COX3 y ND1 no han sido utilizados en trabajos previos y representan una nueva alternativa para explicar la filogenia en este grupo de reptiles marinos. En el presente caso utilizando mitogenomas completos se obtuvieron árboles robustos y altamente sustentados.

Palabras clave: relaciones filogenéticas, *Eretmochelys imbricata*, mitogenoma, tortugas marinas, *bootstrap*, politomías

INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas son reptiles que aparecieron en el cretácico, han poblado los mares del mundo por más de 200 millones de años (Márquez y del Carmen Farías, 2000) y ocupan una amplia diversidad de hábitats oceánicos y costeros. La tortuga carey es componente relevante de diferentes hábitats vitales para el ecosistema (arrecifes de coral, praderas de pastos marinos, fondos blandos) (Kinan, 2002). Las tortugas marinas realizan migraciones de miles de kilómetros y tardan décadas para madurar sexualmente, por lo tanto, sirven como importantes indicadores de la salud de los ambientes costeros y marinos tanto a escala local como global (Eckert *et al.*, 2000; Heithaus, 2013).

Actualmente existen dos familias de tortugas marinas, Cheloniidae, representada por seis especies, la tortuga plana (*Natator depressus*), la tortuga golfinia (*Lepidochelys olivacea*), la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*), la tortuga caguama (*Caretta caretta*), la tortuga carey (*E. imbricata*) y la tortuga verde (*Chelonia mydas*) (Pritchard, 1999); y la familia Dermochelyidae, representada hoy en día por una sola especie, la tortuga laud (*Dermochelys coriacea*) (Trujillo-Arias *et al.*, 2014). De la primera familia anidan y/o se alimentan en las costas colombianas: *C. caretta*, *C. mydas*, *E. imbricata*, *L. olivacea* y *L. kempii*, mientras que de la segunda familia se encuentra a *D. coriacea*. Todas estas especies anidan en las dos costas, con excepción de *L. kempii* que lo hace únicamente en la costa Atlántica (Ceballos-Fonseca, 2000).

La tortuga carey *E. imbricata* (Linnaeus, 1766), es considerada una especie circumtropical que se encuentra en aguas costeras y se distribuye en las playas de 108 unidades geopolíticas (Meylan y Donnelly, 1999). Esta tortuga se reportó por primera vez como especie en peligro por la IUCN en 1968. En 1996 su estatus cambió a especie en peligro crítico, además, se encuentra registrada en el apéndice I del CITES (Amarocho, 1999; Revuelta y Tomás, 2010; Tabib *et al.*, 2011).

Estudios realizados por Bass *et al.* (1996), Bowen *et al.* (1996; 2007), Bass (1999), Abreu-Grobois (1999), Troeng *et al.* (2005), Lara-Ruiz *et al.* (2006), Velez-Zuazo *et al.* (2008), Blumenthal *et al.* (2009), Browne *et al.* (2010), Monzón-Arguello *et al.* (2010; 2011), Leroux *et al.* (2012) y Trujillo-Arias *et al.* (2014) con marcadores moleculares mitocondriales han permitido establecer la composición poblacional de la tortuga carey y describir parte de su historia de vida. Además, estos estudios basados en marcadores mitocondriales han permitido evaluar hipótesis

sobre comportamientos reproductivos y filogeográficos, composición de poblaciones de forrajeo e inferencia de patrones de migración. El conocimiento de la estructura genética puede ser utilizada para definir unidades de manejo, estrategia útil en planes de conservación (Kinan, 2002). Por otro lado, se ha demostrado que en el ADNmt se acumulan y fijan mutaciones con mayor rapidez que en el nuclear, proceso que ha sido atribuido a una tasa de mutación rápida durante la replicación y a un tamaño poblacional menor por su herencia estrictamente maternal (Awise *et al.*, 1992; Liu y Cordes, 2004; Drosopoulou *et al.*, 2012).

EL ADNmt de tortugas marinas y de vertebrados en general, consiste en una molécula circular de doble cadena la cual codifica para 22 ARNt, 2 ARNr, 13 proteínas, y una región mayor no codificable (región control, D-loop) la cual contiene señales para la transcripción y replicación mitocondrial (Boore, 1999; Drosopoulou *et al.*, 2012).

Los primeros estudios de filogenia sobre tortugas marinas fueron realizados por Zangerl *et al.* (1988) y Limpus *et al.* (1988), ellos trabajaron en morfología y electroforesis de proteínas respectivamente. Sin embargo, estos primeros árboles presentaron inconsistencias dentro de la familia Cheloniidae. Estudios realizados por Bowen *et al.* (1993), Dutton *et al.* (1996) y Naro-Maciel *et al.* (2008) presentaron resultados en los que se demuestra la formación de un grupo monofilético y de dos tribus, Chelonini (*C. mydas* y *N. depressa*) y Caretteni (*L. olivacea*, *L. kempii*, *C. caretta* y *E. imbricata*). El uso de diferentes marcadores moleculares ha permitido dilucidar diferentes relaciones filogenéticas, tal es el caso de la tortuga plana (*N. depressa*) que se situaba como taxón hermano de Caretteni, basándose en los genes ND4, Cytb y la región control (Dutton *et al.*, 1996). Utilizando una mayor cantidad de datos, los genes 12S ARNr, 16S ARNr y cuatro genes nucleares, *N. depressa*, se agrupó con *C. mydas* (Naro-Maciel *et al.*, 2008).

Actualmente se ha podido secuenciar mitogenomas completos de tortugas marinas (Duchene *et al.*, 2012; Frey y Dutton, 2012; Shamblin *et al.*, 2012), aumentando la cantidad de información generada, pasando de estudios que producían conclusiones basadas en secuencias de genes de 2000 pb a estudios que utilizan más de 16000 pb. Los nuevos estudios han permitido proponer nuevas relaciones evolutivas entre las especies de quelonidos (Duchene *et al.*, 2012) y confirmar evidencias previas en las que se determinaba que el reloj molecular en tortugas marinas es

mucho más lento que otros linajes de vertebrados (Avisé *et al.*, 1992; Duchene *et al.*, 2012). El uso de esta información filogenética ha permitido resolver un debate en ecología evolutiva al realizar un mapeo sobre el árbol de relaciones de los hábitos alimenticios, el cual indicó que la tortuga espongiadora *E. imbricata* evolucionó de un antepasado carnívoro y no de uno herbívoro como se tenía entendido (Bowen *et al.*, 1993).

En el presente estudio, con los datos obtenidos en estudios previos de la secuencia del mitogenoma de una tortuga carey y las secuencias de mitogenomas obtenidos en bases de datos para otras seis tortugas marinas, se realizaron análisis en primer término para estudiar cual de 15 marcadores resuelven con mayor sustento la posición de la tortuga carey *E. imbricata* dentro de la familia Cheloniidae y la filogenia de las tortugas marinas, y en segundo término, para evaluar el uso del mitogenoma completo y compararlo con los análisis filogenéticos realizados con fragmentos parciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Secuenciación:

La estandarización y obtención del mitogenoma de la tortuga carey *E. imbricata* se publicó previamente en GenBank (KP221806) (Beltran-Torres *et al.*, 2013). Este mitogenoma se obtuvo amplificando 24 fragmentos contiguos de 800-1000 pb solapados en 50-100 pb. Los fragmentos amplificados se secuenciaron en ambas direcciones (5'-3' y 3'-5') utilizando el método automatizado tagDyeDeoxy Terminator Cycle-sequencing en un secuenciador 3730XL (Applied Biosystems) en SSGMOL (Universidad Nacional de Colombia: <http://www.ssigmol.unal.edu.co/>). Las secuencias obtenidas se alinearon y ensamblaron utilizando el programa Geneious R6 (Biomatters Ltda., Nueva Zelanda), posteriormente se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI para todas las tortugas carey (Tabla 1) mediante la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para determinar su identidad, y de la misma forma, identificar los genes mitocondriales.

Análisis de datos

Se realizaron cuatro análisis filogenéticos utilizando los algoritmos Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verosimilitud

(ML) e Inferencia Bayesiana (IB) utilizando el programa Geneious R6 (Biomatters Ltda., Nueva Zelanda) y Máxima Parsimonia (MP), utilizando MEGA 5.2. (Tamura *et al.*, 2011). Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando genes individuales (12S ARNr, 16S ARNr, COX1, COX2, COX3, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, CytB, ATP6 y ATP8) y mitogenomas completos de la tortuga carey, anidante del Caribe colombiano de este estudio, y cuatro individuos de carey previamente descritos (Duchene *et al.*, 2012 y Tandon *et al.* (datos no publicados) con secuencias de seis tortugas marinas disponibles en la base de datos de GenBank (Tabla 1). Adicionalmente, se utilizaron las secuencias de la tortuga acuática, *Trachemys scripta*, y de la tortuga terrestre, *Geochelone nigra*, como grupo externo. Los modelos de sustitución Tamura-Nei (TN), Hasegawa, Kishino y Yano (HKY) y Generalised Time Reversible (GTR) usados para realizar los árboles filogenéticos de NJ, ML e IB, respectivamente, se escogieron con base a los menores puntajes obtenidos en los resultados de Bayesian Information Criterion (BIC) utilizando MEGA 5.2. (Nei y Kumar, 2000; Tamura *et al.*, 2011) y de forma independiente para cada juego de datos y cada gen analizado. Para NJ, ML y MP se realizaron 1000 réplicas de *bootstrap*. Se consideraron valores *bootstrap* $\geq 70\%$ como sustento aceptable para los diferentes clados obtenidos, de acuerdo a Hillis y Bull (1993). Para el algoritmo de IB se utilizaron cuatro cadenas de MCMC, por 20 millones de generaciones, muestreando cada 2000 generaciones. El árbol consenso fue construido con los últimos 1000 árboles (*burn-in*=9000 muestras), y se obtuvo un árbol consenso con valores de probabilidad posterior (PP).

RESULTADOS

El mitogenoma completo obtenido de la tortuga carey anidante del Caribe colombiano posee un tamaño de 16386 pb. Al analizar la secuencia con la herramienta BLASTX se identificaron los trece genes codificantes de proteínas (ATP6, ATP8, COX1, COX2, COX3, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 y CytB), dos genes ribosómicos completos (12S ARNr y 16S ARNr) y 22 ARNt.

Mediante el análisis BIC se evaluaron los modelos de sustitución (Tabla 2). El mejor modelo para interpretar los genes 12S ARNr, ATP6, COX1, COX2, COX3, ND2, ND4 y ND6 fue TN, para los genes ATP8 y ND4L fue HKY y para los genes 16S ARNr, CytB, ND1, ND3, ND5

y el mitogenoma completo fue GTR (Tabla 2). De acuerdo con estos resultados se realizaron los análisis filogenéticos.

En la Figura 1 se muestran los árboles obtenidos con los diferentes análisis filogenéticos realizados con los cuatro criterios de búsqueda y generando un árbol consenso en aquéllos que demostraron una asociación congruente para este grupo de reptiles. Se demostró que los dos genes ribosómicos, 12S ARNr y 16S ARNr, y los cinco genes codificantes de proteínas COI, COIII, ND2, ND4 y ND5 son los marcadores que resuelven con la misma topología la filogenia de este grupo de reptiles, diferenciando las dos familias existentes, Dermochelyidae, con una única especie, *D. coriácea*, y Cheloniidae, donde se encuentran las otras seis especies de tortugas marinas. Se agrupan de forma congruente las dos tribus: la tribu Chelonini, con *N. depressa* y *C. mydas*, y la tribu Caretini, con las tortugas *L. kempii*, *L. olivácea*, *C. caretta* y *E. imbricata*. Dentro de la tribu Caretini las dos especies de *Lepidochelys* forman un grupo hermano, uniéndose basalmente al taxón hermano de *C. caretta*; estas tres especies forman un grupo hermano con *E. imbricata*. En todos los casos siempre se agrupan bajo un

mismo nodo las diferentes tortugas carey utilizadas como referencia y la secuenciada obtenida por Beltrán-Torres *et al.* (2013) como parte de este estudio. En las Figuras 1A, 1B, 1C y 1E, construidas con los genes individuales 12S ARNr, 16S ARNr, COI y ND2 respectivamente, se presenta una politomía dentro del grupo carey, que corresponde a las tortugas del Pacífico; se observa que estos genes explican una diferenciación geográfica en forma general pero no específica entre regiones.

A pesar de que estos siete genes mitocondriales explican de la misma manera la filogenia de las tortugas marinas (Figura 1), no todos los algoritmos usados muestran la misma filogenia en los diferentes casos. Para el gen ribosómico 12S ARNr se descartó el árbol por NJ debido a la baja resolución obtenida de la tribu Caretini. Lo mismo ocurrió con el árbol generado por NJ con el gen COIII, que presentó politomías en la diferenciación de las familias y dentro de la tribu Caretini. Para el gen ND2 los algoritmos NJ y MP presentaron politomías y sustentos inferiores al 50%, además de asociaciones atípicas dentro de la tribu Caretini (figura no presentada).

Tabla 1. Referencia de los mitogenomas de las especies de tortugas analizadas. Se presenta la longitud de la secuencia en pares de bases (pb), referencia bibliográfica y el número de entrada para la base de datos de GenBank.

Especie	Longitud (pb)	Referencia	Número de Entrada	Origen Geográfico
<i>Dermochelys coriacea</i>	16,420	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454969	México
<i>Caretta caretta</i>	16,737	Drosopoulou <i>et al.</i> (2012)	FR694649	Grecia
<i>Natator depressa</i>	16,281	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454975	Australia
<i>Chelonia mydas</i>	16,497	Kumazawa y Nishida (1999)	AB012104	Océano Atlántico
<i>Eretmochelys imbricata</i>	16,386	Beltrán-Torres <i>et al.</i> (2013)	KP221806	Colombia
<i>Eretmochelys imbricata*</i>	16,347	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454986	Costa Rica
<i>Eretmochelys imbricata*</i>	16,349	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454980	Singapur
<i>Eretmochelys imbricata*</i>	16,354	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454970	Hawái
<i>Lepidochelys kempii</i>	16,382	Duchene <i>et al.</i> (2012)	JX454981	USA
<i>Geochelone nigra</i>	16,164	Lourenço, Claude, Galtier y Chiari (2012)	JN999704	Francia
<i>Trachemys scripta</i>	16, 810	Russell y Beckenbach (2008)	NC_011573	Canadá

*referencia para análisis BLAST de la tortuga carey del presente estudio.

El árbol generado por NJ utilizando el gen ND5 presentó politomías en diferentes ramas.

El método IB permite mostrar siempre un árbol dicotómico, el cual presenta los mejores sustentos por nodo desarrollando de manera congruente la filogenia típica de este grupo de reptiles, seguido por ML, MP y NJ.

Los árboles generados por los genes ATP6, ATP8, COII, ND3, ND4L, ND6 y CytB se descartaron ya que los sustentos *bootstrap* que presentaron en diferentes clados se encontraron por debajo del 70%. Además, mostraban politomías y generaron asociaciones atípicas de las especies en las diferentes metodologías.

Tabla 2. Puntajes BIC para los trece genes codificantes de proteínas y dos genes ribosomales evaluados. Referencia BLAST: *E. imbricata* números de entrada NC_012398, JX454986, JX454980, JX454970.

Gen	BLASTX	BLAST	TN93	HKY	GTR
12S ARNr	---	99%	6,492,221	6,538,245	6,495,769
16S ARNr	---	99%	10,943,286	11,058,623	10,903,611
ATP6	99%	99%	5,738,487	5,749,197	5,756,097
ATP8	96%	98%	1,718,933	1,712,776	1,739,859
COX1	99%	99%	11,779,484	11,828,592	11,783,044
COX2	99%	99%	5,041,942	5,064,424	5,063,247
COX3	98%	99%	5,605,387	5,664,730	5,621,455
ND1	98%	99%	7,771,880	7,783,839	7,763,348
ND2	99%	98%	7,997,499	8,019,636	8,005,685
ND3	95%	99%	3,093,563	3,098,822	3,088,590
ND4	98%	99%	11,775,272	11,817,615	11,783,704
ND4L	100%	99%	2,529,381	2,526,712	2,549,514
ND5	98%	99%	16,454,976	16,500,061	16,450,638
ND6	100%	99%	4,394,187	4,416,221	4,415,817
CytB	99%	99%	9,242,529	9,255,393	9,237,105
Genoma Completo	---	99%	131,872,559	132,454,583	131,625,283

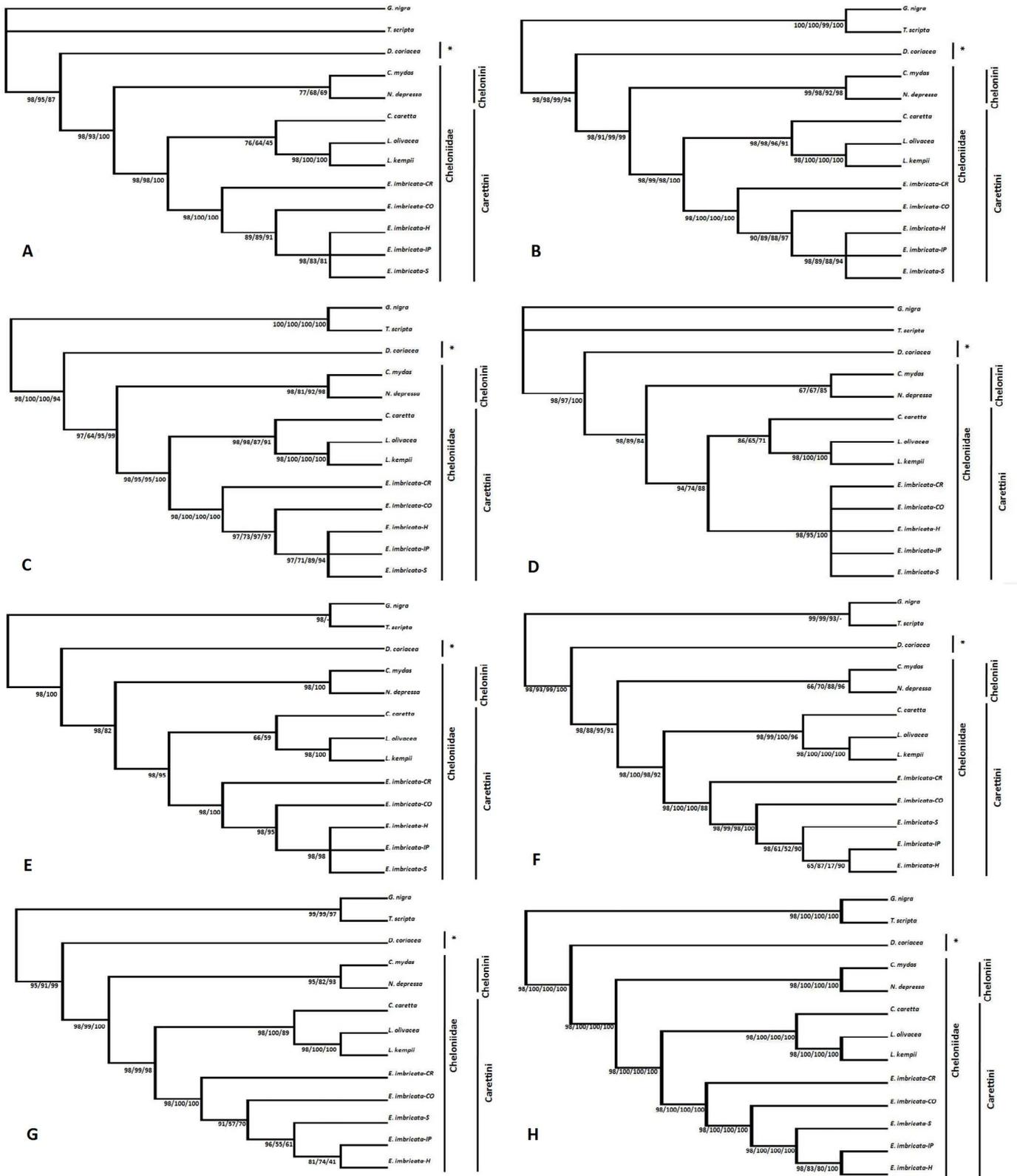


Figura 1. Árbol consenso por regla de mayoría obtenido A. Análisis del gen ribosomal 12S ARNr (993 pb) B. Análisis del gen ribosomal 16S ARNr (1,663 pb) C. Análisis del gen COI (1,556 pb) D. Análisis del gen COIII (786 pb) E. Análisis del gen ND2 (1,048 pb) F. Análisis del gen ribosomal ND4 (1,385 pb) G. Análisis del gen ND5 (1,846 pb) H. Análisis de mitogenomas completos (>16 500). Los valores ubicados en los nodos hacen referencia a la probabilidad posterior de IB/ y bootstrap obtenidos con los métodos de ML/ MP/ y NJ/. * Familia Dermochelyidae.

DISCUSIÓN

Las secuencias obtenidas de todos los genes y el genoma mitocondrial completo de la tortuga carey de este estudio mostraron una alta similitud con las secuencias de la tortuga carey previamente descritas en la base de datos de GenBank. Cuando se utilizaron los mitogenomas completos para generar la filogenia se obtuvieron árboles más robustos y con mejores sustentos (81,0-100%), debido a que son genes que se encuentran estrechamente ligados en una sola molécula y ofrecen en conjunto una mayor información de datos y de esta manera permiten obtener resultados más robustos. En cuanto a los árboles con base en genes individuales, los que presentaron mejores conformaciones con sustentos más altos fueron: 16S ARNr (88,0-100%), COI (64,0-100%), ND2 (59,0-100%), ND4 (56,0-100%), ND5 (55,0-100%), 12S ARNr (50,0-100%) y COIII (50,0-100%).

En estudios previos los métodos utilizadas de filogenia se basaron en sólo uno de los diferentes algoritmos, NJ (Duchene *et al.*, 2012), MP (Dutton *et al.*, 1996; Naro-Maciel *et al.*, 2008) ML (Duchene *et al.*, 2012) e IB (Naro-Maciel *et al.*, 2008; Drosopoulou *et al.*, 2012). En este estudio se utilizaron los cuatro algoritmos más comunes para determinar cual de ellos explica mejor y se ajusta a las representaciones filogenéticas en tortugas marinas. Los árboles producidos por NJ son árboles fenéticos; es un algoritmo muy popular que se basa en el agrupamiento por similitudes entre secuencias, con un modelo de evolución molecular básico y de probabilidades, lo que lo hace un árbol sencillo y básico para unos primeros análisis filogenéticos (Willems *et al.*, 2014). Los otros tres métodos producen una resolución más robusta, poseen algoritmos que identifican similitudes y dependiendo del modelo de sustitución utilizado, generan puntajes y penalidades a las diferencias que se encuentren, ya sea por transiciones o transversiones entre bases nucleotídicas, y tienen en cuenta variaciones de frecuencia de cada nucleótido (Nei y Kumar, 2000). En el presente estudio se encontró que los árboles generados por IB son los que poseen la mejor representación filogenética en las tortugas marinas, obteniendo valores de probabilidades posteriores promedio de 0,94. IB no sólo tiene en cuenta transiciones y transversiones en las bases nucleotídicas, sino que también se basa en probabilidades posteriores de cambios en dichas bases, teniendo en cuenta: tasas mutacionales, probabilidades anteriores del parámetro y verosimilitud de

los datos (Nei y Kumar, 2000). IB es un método completo que evalúa también relojes moleculares y da ventajas en los análisis por el uso de información *a priori* y su velocidad de procesamiento (Nei y Kumar, 2000; Duchene *et al.*, 2011).

Los marcadores moleculares con base en genes individuales utilizados para explicar la filogenia de tortugas marinas y que han generado las mejores explicaciones y propuesto las mejores relaciones han sido construidos con los genes 12S ARNr y 16S ARNr (Naro-Maciel *et al.*, 2008), Región Control (Dutton *et al.*, 1999) y el conjunto de ND4-tRNA^{Leu}-citocromo B-región control (Dutton *et al.*, 1996). Sin embargo, no en todos los estudios realizados tienen en cuenta el análisis por modelos de sustitución de bases nucleotídicas. Además, tampoco describen los valores *bootstrap* que dan sustento a los árboles descriptos, para determinar si tienen el índice de confianza mínimo necesario para explicar la filogenia en este grupo de reptiles.

Duchene *et al.* (2012) determinaron mediante análisis BIC, que el modelo que se ajusta para realizar la filogenia con base en mitogenomas completos es GTR, resultado igual al obtenido en este estudio. Duchene *et al.* (2011) realizaron este mismo análisis para genes mitocondriales individuales en delfines y orcas, encontrando que el modelo de sustitución varía dependiendo de la secuencia del gen analizado, al igual que lo observado en el presente estudio, donde con ocho de los genes (12S ARNr, ATP6, COX1, COX2, COX3, ND2, ND4 y ND6) se utilizó el modelo TN, con dos genes (ATP8 y ND4L) se utilizó HKY y cinco genes (16S ARNr, CytB, ND1, ND3 y ND5) y el mitogenoma completo, se utilizó el modelo GTR.

Los adelantos en tecnologías de secuenciación han permitido ampliar el uso de rango de los marcadores moleculares, especialmente en mitogenomas, ya sea usando los genes a nivel individual o en conjunto con genomas mitocondriales parciales o completos (Kumazawa y Nishida, 1999; Duchene *et al.*, 2012). Duchene *et al.* (2011) realizaron trabajos de filogenia con marcadores moleculares mitocondriales en delfines y ballenas orcas, demostrando de esta manera que no todos los marcadores poseen la misma resolución para generar relaciones filogenéticas, sino que por el contrario, dependiendo de la especie o grupo taxonómico al que pertenezcan, algunos marcadores pueden generar explicaciones con mejores sustentos.

En estudios previos los marcadores moleculares 16S ARNr y COX1, son los que han explicado con mayor soporte las relaciones filogenéticas de las tortugas marinas (Naro-Maciel *et al.*, 2008), así como también el gen

ND4 en conjunto con otros genes (Dutton *et al.*, 1996). Sin embargo, este estudio presenta los marcadores ND2, ND5, ND4, COX3 Y ND1 como nuevas alternativas para este tipo de análisis, debido a que no han sido utilizados con anterioridad y generaron un sustento suficiente, produciendo arboles robustos y explicaciones filogenéticas satisfactorias para las tortugas marinas.

Los estudios de Drosopoulou *et al.* (2012), Duchene *et al.* (2012), Hernández *et al.* (2017) y Hernández y Delgado (2018) utilizaron los mitogenomas completos de las tortugas para realizar los análisis filogenéticos, demostrando de esta forma lo descrito por Duchene *et al.* (2011) quienes concluyeron que entre mayor información genética se posea (pares de bases), los árboles filogenéticos y los sustentos de las diferentes ramas van a ser mucho más robustos y con mejor confianza al momento de obtener los análisis. En este estudio se muestra la misma tendencia ya que el mejor marcador molecular individual fue el gen ND2 (1048 pb) mediante el algoritmo IB con valores de probabilidad posterior de 0,948. El árbol filogenético obtenido utilizando el algoritmo IB y mitogenomas completos fue el más robusto, con un soporte de probabilidad posterior de 0,98.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu-Grobois F.A. (1999) Genética poblacional y filogeografía de las tortugas marinas golfina (*Lepidochelys olivacea*) y laúd (*Dermochelys coriacea*) en el Pacífico mexicano. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. G007, México.
- Amoroch D.F., Network W.C.S.T. (1999) Status and distribution of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in the wider Caribbean region. In: Proceedings of the Regional Meeting “Marine Turtle Conservation in the Wider Caribbean Region: A Dialogue for Effective Regional Management”, Santo Domingo pp. 16-18.
- Avise J.C., Bowen B.W., Lamb T., Meylan A.B., Bermingham E. (1992) Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Mol. Biol. Evol.* 9 (3): 457-473.
- Bass A., Good D., Bjorndal K., Richardson J., Hillis Z., Horrocks J., Bowen B. (1996) Testing models of female reproductive migratory behavior and population structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. *Mol. Ecol.* 5: 321-328.
- Bass A.L. (1999) Genetic Analysis to Elucidate the Natural History and Behavior of Hawksbill Turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Wider Caribbean: a Review and Re-Analysis. *Chelonian Conservation and Biology* 3 (2): 195-199.
- Beltrán-Torres G., Otálora-Acevedo K., Daza L.A., Hernández-Fernández J. (2013) Estandarización de la técnica de PCR para amplificar el genoma mitocondrial de las tortugas cabezazona (*Caretta caretta*) y carey (*Eretmochelys imbricata*) anidantes del Caribe colombiano. *Mutis* 3 (2): 21-30.
- Blumenthal J., Abreu-Grobois F., Austin T., Broderick A., Bruford M., Coyne M., Ebanks-Petrie G., Formia A., Meylan P., Godley B. (2009) Turtle groups or turtle soup: dispersal patterns of hawksbill turtles in the Caribbean. *Mol. Ecol.* 18: 4841-4853.
- Boore J.L. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic acids research* 27 (8): 1767-1780.
- Bowen B.W., Nelson W.S., Avise J.C. (1993) A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90 (12): 5574-5577.
- Bowen B.W., Bass A.L., García-Rodríguez A., Diez C.E., Van Dam R., Bolten A., Bjorndal K.A., Miyamoto M.M., Ferl R.J. (1996) Origin of hawksbill turtles in a Caribbean feeding area as indicated by genetic markers. *Ecol. Appl.* 566-572.
- Bowen B., Grant W., Hillis-Starr Z., Shaver D., Bjorndal K., Bolten A., Bass A. (2007) Mixed-stock analysis reveals the migrations of juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean Sea. *Mol. Ecol.* 16: 49-60.
- Browne D.C., Horrocks J.A., Abreu-Grobois F.A. (2010) Population subdivision in hawksbill turtles nesting on

- Barbados, West Indies, determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Conservation Genetics* 11: 1541-1546.
- Ceballos-Fonseca C.P. (2000) Tortugas (Testudinata) marinas y continentales de Colombia. *Biota Colombiana* 1 (2): 187-194.
- Drosopoulou E., Tsiamis G., Mavropoulou M., Vittas S., Katselidis K.A., Schofield G., Palaiologou D., Sartsidis T., Bourtzis K., Pantis J., Scouras Z.G. (2012) The complete mitochondrial genome of the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae): Genome description and phylogenetic considerations. *Mitoch. DNA* 23 (1): 1-12.
- Duchene S., Archer F.I., Vilstrup J., Caballero S., Morin P.A. (2011) Mitogenome phylogenetics: the impact of using single regions and partitioning schemes on topology, substitution rate and divergence time estimation. *PLoS One* 6 (11): e27138.
- Duchene S., Frey A., Alfaro-Núñez A., Dutton P.H., Thomas P., Gilbert M., Morin P.A. (2012) Marine turtle mitogenome phylogenetics and evolution. *Mol. Phylo. Evol.* 65 (1): 241-250.
- Dutton P.H., Davis S.K., Guerra T., Owens D. (1996) Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-leucine tRNA and control regions of mitochondrial DNA. *Mol. Phylo. Evol.* 5 (3): 511-521.
- Dutton P.H., Bowen B.W., Owens D.W., Barragan A., Davis S.K. (1999) Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *J. Zool.* 248 (3): 397-409.
- Eckert K.L., Bjørndal K.A., Abreu-Grobois F.A., Donnelly M. (2000) Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo especialista en Tortugas Marinas. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Comisión de Supervivencia de Especies. Frey A., Dutton P.H. (2012) Whole Mitogenomic Sequences for Further Resolution of Ubiquitous D-Loop Haplotypes in Pacific Green Turtles. In: Jones T.T., Wallace B.P. (Eds.) *Proceedings of the Thirty-first Annual Symposium on a Turtle Biology and Conservation.*
- Heithaus M.R. (2013) Chapter 10: Predators, Prey and the Ecological Roles of sea turtles. In Wyneken J., Lohmann K.J., Musick J.A. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles* (Vol. 3), CRC Press.
- Hernandez J., Beltran G., Mariño-Ramirez L. (2017) Complete mitochondrial genome of the nesting Colombian Caribbean Hawksbill Turtle. *Mitochondrial DNA Part B*, 2 (1): 128-129, DOI: 10.1080/23802359.2017.1292477.
- Hernandez J., Delgado D. (2018) Complete mitochondrial genome of the three Colombian Caribbean loggerhead sea turtles, using next-generation sequencing. *Mitochondrial DNA Part B*, 3 (2): 626-627, DOI: 10.1080/23802359.2018.1450664.
- Hillis D.M., Bull J.J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *System Biol.* 42 (2): 182-192.
- Kinan I. (2002) *Proceedings of the Western Pacific Sea Turtle Cooperative Research and Management Workshop, Western Pacific Regional Fishery Management Council, Honolulu.*
- Kumazawa Y., Nishida M. (1999) Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles. *Mol. Biol. Evol.* 16 (6): 784-792.
- Lara-Ruiz P., López G., Santos F., Soares L. (2006) Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. *Conservation Genetics* 7: 773-781.
- Leroux R.A., Dutton H.P., Abreu-Grobois F.A., Lagueux C.J., Campbell C.L., Delcroix E., Chevalier J., Horrocks J.A., Hillis-Starr Z., Troëng S., Harrison E., Stapleton S. (2012) Re-examination of population structure and phylogeography of hawksbill turtles in the wider Caribbean using longer mtDNA sequences. *J. Hered.* 103 (6): 806-820.

- Limpus C.J., Gyuris E., Miller J.D. (1988) Reassessment of the Taxonomic Status of the Sea Turtle Genus *Natator* McCulloch, 1908, With a Redescription of the Genus and Species. *Transactions of the Royal Society of South Australia Incorporated* 112: 1-10.
- Liu Z.J., Cordes J.F. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238 (1): 1-37.
- Márquez R., del Carmen Farías M. (2000) Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de Cultura Económica.
- Meylan A.B., Donnelly M. (1999) Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as critically endangered on the 1996 IUCN Red List of Threatened Animals. *Chelonian Conservation and Biology* 3 (2): 200-224.
- Monzón-Argüello C., Rico C., Marco A., López P., López-Jurado L. (2010) Genetic characterization of eastern Atlantic hawksbill turtles at a foraging group indicates major undiscovered nesting populations in the region. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 387: 9-14.
- Monzón-Argüello C., Loureiro N., Delgado C., Marco A., López J., Gómez M., Abreu-Grobois F. (2011) Príncipe island hawksbills: Genetic isolation of an eastern Atlantic stock. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 407: 345-354.
- Naro-Maciel E., Le M., FitzSimmons N.N., Amato G. (2008) Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Phylo. Evol.* 49 (2): 659-662.
- Nei M., Kumar S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press.
- Pritchard P.C.H. (1999) Status of the black turtle. *Conserv. Biol.* 13: 1000-1003.
- Revuelta O., Tomás J. (2010) Tortuga carey-*Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766). En: Salvador A., Marco A. (Eds.) *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Shamblin B.M., Bjorndal K.A., Bolten A.B., Hillis-Starr Z.M., Lundgren I., Naro-Maciel E., Nairn C.J. (2012) Mitogenomic sequences better resolve stock structure of southern Greater Caribbean green turtle rookeries. *Mol. Ecol.* 21 (10): 2330-2340.
- Tabib M., Zolgharnein H., Mohammadi M., Salari-Aliabadi M.A., Qasemi A., Roshani S., Rajabi-Maham H., Frootan F. (2011) mtDNA variation of the critically endangered hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting on Iranian islands of the Persian Gulf. *Gen. Mol. Res.* 10 (3): 1499-1503.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10): 2731-2739.
- Troeng S., Dutton P., Evans D. (2005) Migration of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* from Tortuguero, Costa Rica. *Ecography* 28: 394-402.
- Trujillo-Arias N., Amorocho D.F., López-Álvarez D., Mejía-Ladino L.M. (2014) Relaciones filogeográficas de algunas colonias de alimentación y anidación de la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*) en el Pacífico y Caribe Colombianos. *Bol. Invest. Mar. y Cost.* 43: 159-182.
- Velez-Zuazo X., Ramos W.D., van Dam R.P., Diez C.E., Abreu-Grobois A., McMillan W. (2008) Dispersal, recruitment and migratory behavior in a hawksbill sea turtle aggregation. *Mol. Ecol.* 17 (3): 839-853.
- Willems M., Tahiri N., Makarenkov V. (2014) A new efficient algorithm for inferring explicit hybridization networks following the Neighbor-Joining principle. *J. Bioinf. Comput. Biol.* 12 (5): 1450024.
- Zangerl R., Hendrickson L.P., Hendrickson J.R. (1988) A redescription of the Australian flatback sea turtle, *Natator depressus*. Bishop Museum Press.

AGRADECIMIENTOS

Al Oceanario CEINER en la Isla de San Martín de Pajarales (Bolívar) y a Jaime Rojas quienes cedieron gentilmente las muestras de sangre de las tortugas para poder realizar esta investigación. La Financiación de este estudio fue realizada por el Departamento de Investigación, Creatividad e Innovación de La Universidad Jorge Tadeo Lozano. Al Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible por otorgar el permiso de Investigación Científica en diversidad Biológica N° 24 de Junio 22 de 2012 y el ANLA por el Contrato de Acceso a Recursos Genéticos N° 64.