

Documento de Tesis.

Catálogo para identificación morfo genotípica de tortuga verde (*Chelonia mydas*) en Isla Gorgona del Pacífico Oriental Colombiano.

Daniel Alfredo Sánchez Forero

E-mail: da.sanchez3247@uniandes.edu.co

Directora: Susana Caballero PhD

E-mail: sj.caballero26@uniandes.edu.co

Laboratorio de Ecología Molecular de Vertebrados Acuáticos (LEMVA), Universidad de los Andes, Carrera 1 No. 18A – 10 / Bogotá, Colombia.

Codirector: Diego Amorocho PhD

E-mail: dfamorocho@wwf.org.co

World Wide Fund for Nature (WWF), Carrera 35 No. 4A-25 / Cali, Colombia. Centro de Investigación para el Manejo Ambiental y el Desarrollo (CIMAD).

PALABRAS CLAVE: *Chelonia mydas*, Foto identificación, Catalogo, Haplotipos, Conservación.

RESUMEN

Dentro del ámbito de la conservación de la tortuga verde se propone implementar nuevas herramientas para facilitar el estudio de la especie. Dentro de estas está la foto identificación, la cual maximiza la eficiencia de conteos y censos poblacionales con el fin de conocer más sobre el estado de la especie. En este artículo se utilizan técnicas moleculares para evaluar si existe una relación entre la coloración del caparazón del individuo con su haplotipo y con su lugar de origen geográfico. A partir de los resultados se propone la creación de un catálogo de foto identificación que incluya la máxima información posible del individuo desde la coloración hasta su haplotipo y lugar de origen. Al llevar a cabo la toma de muestras y los análisis moleculares se encontraron 3 haplotipos en la zona de Gorgona en el Pacífico Colombiano de los cuales 2 ya habían sido reportados; uno como el más común (CMP4/GPC1) y otro como presente en la zona pero de procedencia de Australasia (CMP49/C3), el tercer haplotipo presenta un 99% de identidad con el CMP96 de la región del Pacífico Central y Oriental pero se requieren secuencias de comparación más largas para asegurar que sea ese o sea un haplotipo nuevo. Se encontró una relación entre la coloración, el haplotipo y el lugar de origen por lo que se hace necesario incluir toda esta información en el catálogo de foto identificación. Como continuación a este estudio y en futuros estudios se deben obtener secuencias de la región control mitocondrial más largas para no perder información en el momento de realizar las comparaciones de las secuencias de las muestras con las bases de datos.

INTRODUCCIÓN

La tortuga verde (*Chelonia mydas*) tiene una distribución geográfica cosmopolita, extendiéndose dentro de aguas tropicales y subtropicales. Las hembras de esta especie muestran un fuerte filopatría y fidelidad al sitio de anidación (Meylan, Bowen and Avise, 1990; Bowen et al., 1992) lo cual resulta en la diferenciación genética entre colonias (Encalada et al., 1996).

A pesar de la filopatría y fidelidad al sitio de anidación estas tortugas son altamente migratorias y tienen complejos movimientos y rutas en las que incluyen hábitats geográficamente muy distantes. Sus movimientos exactos entre todos los ambientes marinos no son bien conocidos pero se cree que habitan aguas costeras de más de 140 países, (Groombridge and Luxmoore, 1989) dentro de los cuales se encuentra Colombia. A partir de otros estudios más recientes y para la zona del este del Pacífico algunos autores proponen que las grandes dispersiones en etapas tempranas de vida y patrones de migración de adultos se llevan a cabo en busca de alimentación (Senko, 2010; Volker, 2007).

Se sugiere entonces que el cubrimiento geográfico se da según las áreas de alimentación que son compuestas principalmente de algas y pastos marinos desde el norte de México hasta Centro América pasando por California (Dethmers et al., 2010; Naro-maciel, 2007; Seminoff 2007, Volker 2007; Senko et al., 2010) y zonas con abundancia de crustáceos, peces y manglares como lo son el pacifico Colombiano, Ecuador y Perú. (Amorocho & Reina 2007, Hirth 1997, Ogden 1983, Zarate & Carrion 2007). En el pacifico Colombiano es muy común encontrarlas en isla Gorgona.

En general algunos autores reconocen actualmente dos subespecies, *Chelonia mydas mydas* (Linnaeus, 1758), la cual ocurre en aguas del océano Atlántico y Mediterraneo, y *Chelonia mydas agassizii* (Marquez, 1990; Hirt, 1971; Bocourt, 1868), distribuida en el océano Pacífico e Indico. Sin embargo, otros estudios que utilizan herramientas moleculares han indicado que las tortugas del Pacífico (*agassizii*) son una población melánica regional dentro del clado de las *C. mydas* distribuidas en el Pacífico (Dutton et al., 1996; Karl and Bowen, 1999; Chassin-Noria, 2002). Los polimorfismos en la coloración de esta especie son fácilmente identificables y pueden servir como un acercamiento para conocer la historia de vida de cada individuo (Amorocho, 2012). La variabilidad intraespecífica en la coloración del caparazón también ha sido documentada en otra especie de tortuga, en la cual el color del caparazón difiere según hábitat y el lugar de origen del individuo (Barrio-Amorós & Narbaiza, I. 2008).

Isla Gorgona es una isla continental, perteneciente al departamento del Cauca-Colombia y situada a 56 km del mismo, está incluida en el sistema de Parques Nacionales Naturales (PNN) del país. En esta zona del Pacífico la abundancia de las tortugas marinas es alta y con mucha frecuencia se da el avistamiento de *C. mydas* en los arrecifes coralinos como en algunas playas de anidación (Ceballos-Fonseca, 2003).

La ecología de estas tortugas indica que en la zona del PNNNG se alimentan en su mayor parte de tunicados (los cuales son muy abundantes en los alrededores de isla Gorgona) en sus etapas de vida juvenil, pero que en general son omnívoras. (Amarocho & Reina, 2007). La tortuga verde puede ser considerada como un mega herbívoro que regula las redes tróficas en el océano (Christianen et al., 2012) por lo que es de gran importancia realizar esfuerzos para su conservación.

En la actualidad la mayoría de estudios que se llevan a cabo para evaluar el estado de conservación de las tortugas son hechos a partir de datos obtenidos por métodos de marcaje artificial. El principal objetivo del marcaje es identificar individualmente cada tortuga. El marcaje es usado para múltiples propósitos como por ejemplo conseguir información sobre tendencias poblacionales, residencia en un hábitat, patrones de movimiento (migración), tasas de crecimiento individual, historial reproductivo, etc. (Eckert & Beggs, 2006). A pesar de que el marcaje artificial es el más usado globalmente tanto en esta como en otras especies de tortugas, el porcentaje de pérdida o daño de las etiquetas que llevan la información del individuo es considerablemente alto sin importar el material que se use para el marcaje (Reisser et al., 2008; Bjorndal, 1996;). Algunos de los principales factores que llevan a la pérdida o daño de las etiquetas de metal son abrasión, corrosión, necrosis del tejido, desgarramiento y epibiontes (Balazs, 1982; Sazima, 2010) pero además la probabilidad de pérdida aumenta con el paso del tiempo por el hecho de que estas tortugas tengan una vida longeva y activa (Limpus, 1992; Bjorndal et al., 1996). La tasa de pérdida de las etiquetas presenta un reto para la interpretación de los datos lo cual puede llevar a importantes implicaciones sobre los resultados o interrumpir los estudios en los que se utilice este método (Bjorndal et al., 1996; Sibly et al., 2005).

Otro método que se ha venido usando en los últimos años es la foto identificación a partir de morfometría, el cual se usa activamente en muchos otros animales (Cadrin, 1999; Speed et al., 2007; Wells, 1986). La morfometría es una rama de la estadística que combina herramientas geométricas y de biometría para el análisis de la variación de formas biológicas (Bookstein, 1996; Cadrin, 1999). La morfometría es la base de la foto identificación la cual tiene como objetivo encontrar y establecer marcas específicas (puntos de referencia) que sean únicas para cada individuo y a partir de esto usarlas como una herramienta para la identificación individual en estudios de censos poblacionales, captura-recaptura, migraciones, etc. (McDonald & Dutton, 1996; Da Silva, 2000; Dutton, 2005; Hillman, 2003; Schofield et al., 2008). La foto identificación la puede llevar a cabo el investigador a partir de observaciones en las fotografías o puede utilizar un software que evalúe las marcas deseadas en las fotografías (De angelis, 2009; Ranquelova, 2004; Reisser, 2008; Schofield et al., 2008)

Esta técnica tan usada en muchos organismos se ha comenzado a implementar en tortugas como la tortuga boba (*Caretta caretta*), carey (*Eretmochelys imbricata*) y verde (*Chelonia mydas*) pues cumple con el mismo objetivo de identificación individual y además se ha comprobado que es un herramienta muy acertada, sencilla, practica y poco costosa que es de gran utilidad para los mismos estudios realizados con etiquetas artificiales (Reisser et al., 2008; Schofield, 2008). Incluso se han creado catálogos de foto identificación con fotografías de las escamas laterales de la cabeza de las cuales

ya se sabe que son únicas para cada individuo y no cambian a través del tiempo (Bennett et al., 2000; Reisser et al., 2008; Schofield, 2008).

A partir del estado de conservación de la tortuga verde y conociendo las oportunidades de implementación de la foto identificación como una herramienta muy útil, el propósito de este estudio es la creación de un catalogo para el PNNG en el cual se encuentre toda la información correspondiente al individuo con la finalidad de facilitar las investigaciones sobre la especie. El catalogo debe facilitar la identificación del individuo permitiéndole al investigador conocer la información de la historia de vida del individuo encontrado.

Si bien el primer objetivo de este estudio es la creación del catalogo también se busca evaluar si existe una relación entre las variaciones de coloración del caparazón y los diferentes haplotipos de la región control del ADN mitocondrial. Así mismo, ver si existe relación entre estas características y el posible sitio geográfico de origen de dicho individuo. Todo con el fin de que el catalogo incluya la mayor información posible sobre cada uno de los individuos.

MATERIALES Y METODOS

Sitio de estudio.

La toma de muestras y de fotografías se realizó en el Parque Nacional Natural (PNN) Gorgona; una isla que pertenece al sistema de parques protegidos según Resolución Ejecutiva No. 141 de julio de 1984 (INDERENA), ubicado entre las coordenadas 2°55, 3°00'N y 78°09', 78°14'W, a una distancia de 56 km de la costa continental del departamento del Cauca. El parque tiene una extensión de 616.8 km², incluyendo la porción emergente de la isla con 13.7 km². Política y administrativamente hace parte del municipio de Guapi, departamento de Cauca. El PNN Gorgona posee una vegetación típica de selva neotropical inferior, con una temperatura ambiente de 27°C en promedio y una precipitación anual que oscila entre los 4.164 y 8. 176 mm (Garcés y De la Zerda, 1994; Díaz et al., 2001).

Toma de muestras.

La toma de muestras de las tortugas *Chelonia mydas* para el estudio se llevo a cabo la segunda semana de julio del año 2013. Las tortugas fueron capturadas por medio de careteo nocturno para facilitar el encuentro y la manipulación de los individuos en reposo. El esfuerzo de muestreo tomó entre 2 y 3 horas según el número individuos capturados por noche. Se tuvieron en cuenta 3 sitios de muestreo en los arrecifes de coral ubicados en los alrededores de la isla (Arrecifes La Zufrada , Playa Blanca y Piedra redonda). Se lograron en total 10 muestras de tejido de nuca en un periodo de 4 noches de las cuales se registraron medidas del individuo para la identificación de sexo, tamaño y edad. A las tortugas se les aplicó Isodine® en solución en la herida para evitar cualquier tipo de infección. Las muestras fueron transportadas en una nevera

portátil cuidando una cadena de frío para evitar el daño en el ADN. Los mismos individuos muestreados para genética fueron fotografiados.

Protocolo de toma de fotografías

Se utilizó una cámara digital (Canon G9) para registrar los individuos. Para llevar a cabo el catálogo morfo genotípico deseado era necesario estandarizar un método de toma de fotografía en el cual se pudieran observar claramente las diferencias entre los patrones de coloración en los caparazones de la tortugas. Se registró el caparazón, las escamas laterales de la cabeza y las escamas superiores de la cabeza. Debido a las limitaciones de luz natural en el horario de las capturas cuando era posible se guardaron los individuos hasta el siguiente día para tomar las fotografías con buena luz. Para estos casos las fotografías eran tomadas entre 8:00 am y 10:00 am siempre en el mismo lugar. A pesar de esto para algunos individuos fue necesario tomar las fotografías en la noche con la ayuda de luz artificial (flash).

Las fotografías del caparazón fueron tomadas aproximadamente a 75cm de la parte superior del individuo y ubicando la cámara justo en el centro del individuo y a 90° de la superficie donde estaba ubicados, para esto se utilizó un trípode común. Por otro lado las fotografías laterales de la cabeza fueron tomadas aproximadamente a 15 cm del individuo intentando que el ángulo de la toma fuera paralelo al de la superficie en la cual estaba ubicado el individuo.

Análisis de color

Para poder cuantificar la coloración de los caparazones de las tortugas se utilizó el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Este programa muestra los datos del brillo de los colores rojo (R), verde (G) y azul (B). A partir de esto las fotografías fueron analizadas utilizando el protocolo de análisis de color empleado por Ramos (2004) en el cual se tomaron los valores de RGB que se midieron con el programa. Estos valores fueron convertidos en dos variables LM y B las cuales constituyen los ejes del espacio para una gráfica que muestra la composición del color de una imagen, para que así sean utilizadas como coordenadas útiles en la cuantificación de color de las zonas medidas en las fotografías. Para todas las fotografías se midió el color de la zona más clara o conspicua del caparazón para evaluar si estas partes varían en los distintos individuos. Adicionalmente se midieron algunas zonas de la parte del caparazón en las que la coloración era más oscura para evaluar si esta zona también es polimórfica. Se tomaron 5 medidas de área conspicua y 5 medidas de área oscura para cada uno de los individuos. Los datos utilizados en los análisis estadísticos fueron los promedios de las medidas. (Fig.1)

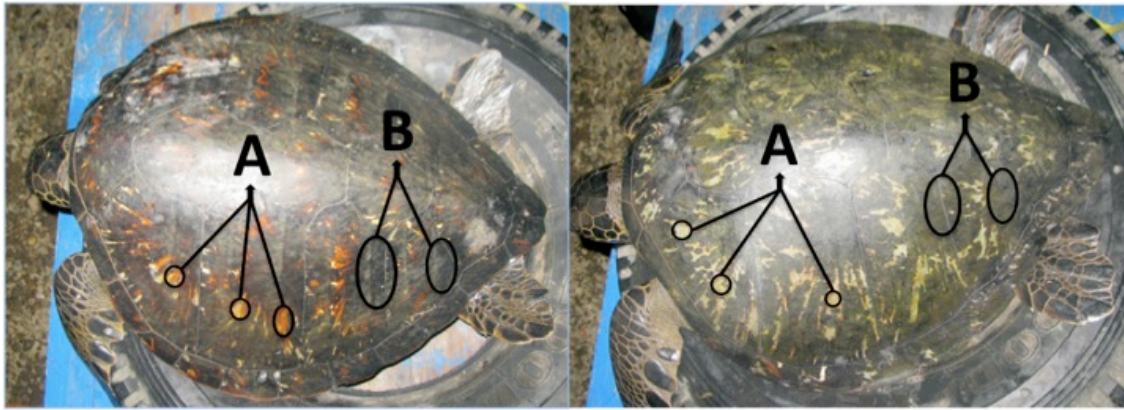


Figura 1. En esta grafica se muestra un ejemplo de algunas zonas en las cuales fueron tomadas las medidas RGB para cada uno de los individuos. **A)** Muestra el lugar de medición para las zonas de coloración más conspicua. **B)** Muestra el lugar de medición para las zonas más oscuras del caparazón.

Análisis estadísticos

Utilizando el programa R se llevó a cabo un análisis discriminante para observar las diferencias en las medidas de la coloración tomadas en cada uno de los individuos. Además se realizó un análisis de cluster para observar que individuos eran los más diferentes entre sí. Lo anterior se realizó tanto como para los datos de las zonas coloridas como para las zonas oscuras. Para finalizar se realizó una descripción de los resultados.

Extracción de ADN, amplificación, purificación y secuenciación.

El ADN total fue extraído con el Ultra Clean© Tissue & Cells DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) Posteriormente el ADN extraído fue cuantificado por medio de NanoDrop (NanoDrop2000, Thermo Scientific). Posteriormente se amplificó un fragmento de mtDNA región control de aproximadamente 940 pares de bases usando los primers LCM15382 y H950 (Abreu et al, 2006) Cabe resaltar que para algunas muestras en las que no amplificó correctamente se uso como alternativa en primer LTEi90 (Abreu et al, 2006). Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se usaron 2 ul muestra, 19.6 ul de H₂O, 3 ul de Buffer, 2 ul de BSA, 3 ul de MgCl₂, 0.3 ul dNTP's, 1 ul de cada primer y 0.1 ul de Taq polimerasa (valores calculados para una muestra). El perfil del PCR constó de una fase de denaturación a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos que consistían de 60 segundos a 94°C, 90 segundos a 53°C y 60 segundos a 72°C cada uno de los ciclos y para finalizar un periodo de extensión de 5 minutos a 72°C.

Al finalizar la amplificación el resultado fue verificado en un gel de agarosa al 1% y el producto del PCR fue purificado usando el GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Al terminar la purificación el DNA fue cuantificado por NanoDrop (NanoDrop2000, Thermo Scientific) y para terminar se llevó a secuenciación automática usando los protocolos de BigDye en un secuenciador ABI 3100 en la Universidad de los Andes.

Análisis de haplotipos

Las secuencias fueron editadas y ensambladas usando el programa GENEIOUS (Copyright © 2005-2013 Biomatters Limited). Las secuencias obtenidas en este estudio fueron alineadas y comparadas con el programa McClade (Copyright © 2011 by David R. Maddison and Wayne P. Maddison) con los haplotipos encontrados por Amorocho (2012) en la zona de Gorgona.

Generación del catalogo

El catalogo debe tener la información completa de cada individuo, para esto debe incluir: El número de identificación en el catalogo, el código del haplotipo registrado en GenBank, el sexo y edad del individuo (juvenil o adulto), el número de la etiqueta artificial de la aleta, número de la etiqueta satelital, fotografías en blanco y negro de las escamas laterales de la cabeza (izquierda y derecha) y fotografía del caparazón.

RESULTADOS

Haplotipos detectados en Gorgona

Se reportaron en total 3 haplotipos diferentes para los 10 individuos muestreados; CMP4/GPC1, CMP49 y CMP96.1. El haplotipo CMP4/GPC1 (AY382323.1 cód. GenBank) es el mismo encontrado por Amorocho (2012) y que había sido registrado anteriormente por Chasin-noria y colaboradores siendo el más común para varias regiones del pacífico (2004), este también es el haplotipo más común en la zona de Gorgona teniendo el 80% de ocurrencia.

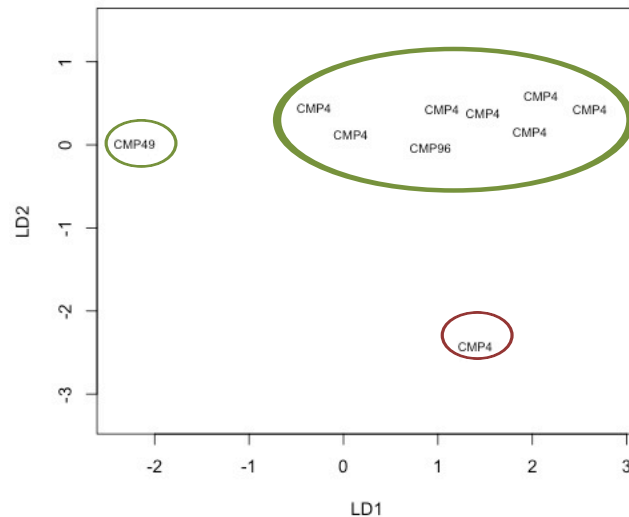
El haplotipo CMP49 (AB819808.1 cód. GenBank) no se había registrado anteriormente en la zona de Gorgona y según los resultados del BLAST fue registrado en GenBank por Hamabata (2009) en las colonias de las costas de Japón. Este haplotipo es el mismo C3 el cual es común en Australia y el sureste de Asia (Dethmers et al. 2006; Cheng et al., 2008; Nishizawa, 2013)

El haplotipo CMP96.1 con identidad del 99% (FJ917197.1 cód. GenBank) fue registrado en GenBank por Dutton y colaboradores como un haplotipo presente predominantemente en la zona del Pacífico central y oriental (Datos no publicados). Aún así se sugiere que puede ser un nuevo haplotipo pues difiere en un nucleótido con la secuencia. Para rectificar esto habría que secuenciar una mayor longitud para obtener una comparación más larga de la cual se obtenga la mayor información posible.

Análisis de color y resultados estadísticos

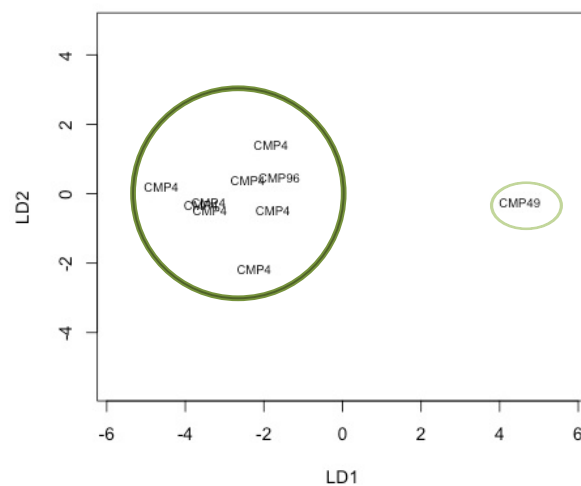
Los resultados para la zona más coloreada y conspicua de los 10 individuos indican que existen diferencias en la coloración del caparazón de las tortugas. Los resultados arrojados por el análisis discriminante indican que los colores de las partes más

conspicuas del caparazón para los haplotipos registrados en la zona del Pacífico oriental, es decir del Pacífico Colombiano, no son del todo similares entre si, pero que esta coloración en general sí es diferente al haplotipo registrado en Australasia. Lo anterior se puede observar en la gráfica 1.



Gráfica 1. Se observa la distribución de los haplotipos según la coloración de su caparazón.

Los resultados del análisis discriminante para las mediciones del color de la zona más oscura del caparazón indicaron que la coloración del haplotipo CMP49 es diferente de la del resto de los haplotipos.



Gráfica 2. Se observa la distribución de haplotipos según la coloración de la zona oscura del caparazón.

DISCUSIÓN

La especie *Chelonia mydas* tiene una baja diversidad haplotípica en la zona de Gorgona debido a la alta ocurrencia del haplotipo CMP4 el cual se encuentra en el 80% del total de las tortugas muestreadas, lo anterior concuerda y es soportado por otros estudios (Amorocho, 2012; Correa, no publicado). Además Gorgona es una zona en la que se da

reclutamiento de tortugas de otras partes del pacífico debido a que es una importante zona de alimentación (Agorocho, 2007, Agorocho, 2008). Según el mismo autor la diversidad nucleotídica puede indicar que Gorgona es una zona de gran importancia en la que las tortugas pueden mantener su variabilidad genética en el Pacífico Oriental (Agorocho, 2012).

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se puede observar que la coloración en el caparazón si puede estar relacionada con el haplotipo de la región control de ADN mitocondrial y a su vez con el lugar de origen, pues las tortugas que se encuentran principalmente en la zona del Pacífico Oriental parecen tener una coloración diferente a la encontrada de la región de Australasia. Al igual que en el estudio realizado por Agorocho las tortugas de Australasia difieren en coloración con las del Pacífico Oriental (2012).

A pesar de esto se puede observar que existe un individuo con haplotipo CMP4 diferente en la coloración del caparazón lo cual puede sugerir por un lado que la variación intraespecifica también puede darse en el mismo lugar de origen sobretodo si en este existe alta diversidad nucleotídica y alto flujo genético como indica Agorocho (2012). Por otro lado este haplotipo reforzaría la idea de la diferencia en coloración según el lugar de origen si se lograra demostrar que este individuo no tiene origen en la zona de Gorgona sino que es un individuo de cualquier otro lugar del Pacífico oriental donde también esta presente y es común el haplotipo CMP4 (Chasinoria, 2004; Agorocho 2012), pero para esto habría que comparar la secuencia con los datos del Servicio Nacional de Pesquerías Marinas – Centro de pesquerías (NMFS-SWFSC por sus siglas en inglés) al cual no hay acceso libre.

Continuando con la generación del catalogo se concluye que es importante incluir dentro del mismo la información de la coloración del caparazón con su respectivo haplotipo y a su vez su lugar de origen. Para que el catalogo cumpla su función de la mejor manera posible éste incluye: el número de identificación en el catalogo, el código del haplotipo registrado en GenBank, el sexo y edad del individuo (juvenil o adulto), el número de la etiqueta artificial de la aleta, número de la etiqueta satelital si existe, fotografías en blanco y negro de las escamas laterales de la cabeza (izquierda y derecha) y fotografía del caparazón.

A futuro se plantea la ampliación de este estudio con un mayor esfuerzo de muestreo para ampliar la base de datos del catalogo, habiéndose logrado esto el ideal es divulgar y distribuir el catalogo para que se utilice como herramienta en futuros estudios realizados en el Pacífico Oriental Colombiano.

Para finalizar es importante resaltar lo importante que es el PNNG como zona de alimentación y reproducción de la tortuga verde y de muchas otras especies. Con la realización de este catalogo se contribuye a la facilitación del estudio de esta tortuga para conocer mejor su historia de vida y sus patrones de migración para que de esta forma se extiendan los esfuerzos de conservación tal y como plantean Agorocho y colaboradores (2012) acerca de los planes de maneja en el Pacífico y el resto del mundo donde pueda habitar esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi directora de Tesis Susana Caballero y mi Codirector Diego Amorocho por su apoyo y guía durante el proceso de realización de este estudio. También ofrezco mi gratitud a mis padres quienes me apoyaron en todo y me brindaron su confianza incondicional sin dejar de resaltar que financiaron mi salida de campo haciendo dándome el primer impulso para realizar este trabajo.

Además agradezco al equipo del Parque Nacional Natural Gorgona por su colaboración por su magnífica ayuda en la salida de campo, en la captura y toma de muestras. Asimismo gracias a Oscar Ramos por su colaboración en el análisis de color y el análisis estadístico de todos los datos. Para finalizar gracias al laboratorio LEMVA por permitirme trabajar y aceptarme como un miembro más.

REFERENCIAS

→ Abreu-Grobois FA, Horrocks JA, Formia A et al (2006) New mtDNA dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution capacity of mixed stock analyses. Poster presented at the 26th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, Crete, Greece, 2-8 April 2006. Available from <http://www.iucn-mtsg.org/genetics/meth/primers/abreu_grobois_et_al_new_dloop_primers.pdf>

→ Ackerman, R. A. (1997). The nest environment and the embryonic development of sea turtles. *The biology of sea turtles*, 1, 83-106.

→ Amorocho, D. F., & Reina, R. D. (2007). Feeding ecology of the East Pacific green sea turtle *Chelonia mydas agassizii* at Gorgona National Park, Colombia. *Endangered Species Research*, 3(1), 43-51.

→ Amorocho DF, Reina RD (2008) Intake passage time, digesta composition, and digestibility in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*) at Gorgona National Park, Colombian Pacific. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 360: 117–124.

→ Amorocho DF, Abreu-Grobois FA, Dutton PH, Reina RD (2012) Multiple Distant Origins for Green Sea Turtles Aggregating off Gorgona Island in the Colombian Eastern Pacific. *PLoS ONE* 7(2): e31486. doi:10.1371/journal.pone.0031486

→ Balazs, G. H. (1982). Factors affecting the retention of metal tags on sea turtles. *Marine Turtle Newsletter*, 20, 11-14.

→ Barrio-Amorós, C. L., & Narbaiza, I. (2008). Turtles of the Venezuelan Estado Amazonas. *Radiata*, 17(1), 2-19.

→ Bennett P, Keuper-Bennett U, Balazs GH (2000) Photographic evidence for the regression of fibropapilloma afflicting green turtles at Honokawai, Maui, in the

Hawaiian Islands. In: Kalb H, Wibbels T (eds) Proc 19th Annu Symp Sea Turtle Biol Cons NOAA Tech Memo NMFS-SEFSC- 443:37 – 39

→Bocourt, M. (1868). Description de quelques cheloniens nouveaux appartenant a la faune Mexicaine.

→ Bookstein, F. L. (1996, June). Landmark methods for forms without landmarks: localizing group differences in outline shape. In *Mathematical Methods in Biomedical Image Analysis, 1996., Proceedings of the Workshop on* (pp. 279-289). IEEE.

→ Bowen, B.W., A.B. Meylan, J.P. Ross, C.J. Limpus, G.H. Balazs & C.J. Avise, 1992. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46: 865–881

→Bjorndal, K. A., Bolten, A. B., Lagueux, C. J., & Chaves, A. (1996). Probability of tag loss in green turtles nesting at Tortuguero, Costa Rica. *Journal of Herpetology*, 30(4), 566-571.

→ Cadrin, S. X., & Friedland, K. D. (1999). The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fisheries Research*, 43(1), 129-139.

→Casey, R. N., Quackenbush, S. L., Work, T. M., Balazs, G. H., Bowser, P. R., & Casey, J. W. (1997). Evidence for retrovirus infections in green turtles *Chelonia mydas* from the Hawaiian Islands. *Dis. Aquat. Org*, 31, 1-7.

→Ceballos-Fonseca, C., Martínez, L., & Quiroga, D. (2003). Distribución, amenazas y esfuerzos de conservación de las tortugas marinas en el Pacífico colombiano. *Informe final, INVEMAR, Santa Marta*.

→ Cheng, I. J., Dutton, P. H., Chen, C. L., Chen, H. C., Chen, Y. H., & Shea, J. W. (2008). Comparison of the genetics and nesting ecology of two green turtle rookeries. *Journal of Zoology*, 276(4), 375-384.

→ Chassin-Noria, O., 2002. Estructura genetica y sistematica molecular de la tortuga negra *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) del estado de Michoacan Mexico. MSc Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

→ Chassin-Noria, O., Abreu-Grobois, A., Dutton, P. H., & Oyama, K. (2004). Conservation genetics of the east Pacific green turtle (*Chelonia mydas*) in Michoacan, Mexico. *Genetica*, 121(2), 195-206.

→Christianen, M.J.A., et al., *Marine megaherbivore grazing may increase seagrass tolerance to high nutrient loads*. *Journal of Ecology*, 2012. **100**(2): p. 546-560.

→ Da Silva, C., Zeh, J., Madigan, D., Rugh, D., Baraff, L., Koski, W., ... & Zeh, J. (2000). Capture-recapture estimation of bowhead whale population size using photo-identification data.

- De Angelis, D., Sala, R., Cantatore, A., Grandi, M., & Cattaneo, C. (2009). A new computer-assisted technique to aid personal identification. *International journal of legal medicine*, 123(4), 351-356.
- Dethmers, K. E., Broderick, D., Moritz, C., Fitzsimmons, N. N., Limpus, C. J., Lavery, S., ... & Kennett, R. O. D. (2006). The genetic structure of Australasian green turtles (*Chelonia mydas*): exploring the geographical scale of genetic exchange. *Molecular Ecology*, 15(13), 3931-3946.
- Dethmers, K.E.M., et al., *Migration of green turtles (Chelonia mydas) from Australasian feeding grounds inferred from genetic analyses*. Marine and Freshwater Research, 2010. 61(12): p. 1376-1387.
- Díaz, J. M., L. M. Barrios, M. H. Cendales, J. Garzón-Ferreira, J. Geister, M. López-Victoria, G. H. Ospina, F. Parra-Velandia, J. Pinzón, B. Vargas-Ángel, F. A. Zapata y S. Zea. 2000. Áreas Coralinas de Colombia. Serie de Publicaciones Especiales de INVEMAR No. 5, Santa Marta, 176 p.
- 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. *Molecular phylogenetics and evolution*, 5(3), 511-521.
- Dutton, D. L., Dutton, P. H., Chaloupka, M., & Boulon, R. H. (2005). Increase of a Caribbean leatherback turtle *Dermochelys coriacea* nesting population linked to long-term nest protection. *Biological Conservation*, 126(2), 186-194.
- Eckert, Karen L. y Jennifer Beggs. 2006. Mercado de Tortugas Marinas. Un Manual de Métodos Recomendados. Red de Conservación de Tortugas Marinas del Gran Caribe (WIDECAS) Informe Técnico No. 2. Edición Revisada. Beaufort, North Carolina USA. 40 pp.
- Encalada, S.E., P.N. Lahanas, K.A. Bjordnal, A.B. Bolten, M.M. Miyamoto & B.W. Bowen, 1996. Phylogeography and population structure of Atlantic and Mediterranean green turtle (*Chelonia mydas*): a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Mol. Ecol.* 5: 473–484.
- Formia, A., Godley, B. J., Dontaine, J. F., & Bruford, M. W. (2006). Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtle (*Chelonia mydas*) populations in Africa. *Conservation Genetics*, 7(3), 353-369.
- Garcés Guerrero, D. M., & Zerda Lerner, S. D. L. (1994). *Gran libro de los parques nacionales de Colombia*. Lerner Ltda.
- Groombridge, B. and Luxmoore, R. 1989. *The Green Turtle and Hawksbill (Reptilia: Cheloniidae): World Status, Exploitation and Trade*. Secretariat of the Convention on

International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Lausanne, Switzerland, 601 pp.

→ Hamabata, T., Nishida, S., Kamezaki, N., & Koike, H. (2009). Genetic structure of populations of the green turtle (*Chelonia mydas*) in Japan using mtDNA control region sequences.

→ Hillman, G. R., Wursig, B., Gailey, G. A., Kehtarnavaz, N., Drobyshevsky, A., Araabi, B. N., ... & Weller, D. W. (2003). Computer-assisted photo-identification of individual marine vertebrates: a multi-species system. *Aquatic Mammals*, 29(1), 117-123.

→ Hirth, H. (1971). Synopsis of biological data on the green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus) 1758.

→ Karl, S. A., & Bowen, B. W. (1999). Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology*, 13(5), 990-999.

→ Koch, V., Brooks, L. B., & Nichols, W. J. (2007). Population ecology of the green/black turtle (*Chelonia mydas*) in Bahía Magdalena, Mexico. *Marine Biology*, 153(1), 35-46.

→ Limpus, C. J. (1992). Estimation of tag loss in marine turtle research. *Wildlife Research*, 19(4), 457-469.

→ Marquez, R.J., 1990. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO Fisheries Synopsis, No. 125, Vol. 11, Rome, FAO.

→ McDonald, D. L., & Dutton, P. H. (1996). Use of PIT Tags and Photoidentification to Revise Remigration Estimates of Leatherback Turtles (*Dermochelys coriacea*) Nesting in St. Croix, U. S. Virgin Islands, 1979-1995. *Chelonian Conservation and Biology*, 2(2), 148-152.

→ Meylan, A.B., Bowen, B.W. & J.C. Avise, 1990. A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Science* 248: 724-727

→ Ministerio del Medio Ambiente de Colombia. (2002). Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales de Colombia.

→ Naro-Maciel, E., et al., *Testing Dispersal Hypotheses in Foraging Green Sea Turtles*

(*Chelonia mydas*) of Brazil. *Journal of Heredity*, 2007. 98(1): p. 29-39.

→ Nishizawa, H., Naito, Y., Suganuma, H., Abe, O., Okuyama, J., Hirate, K., ... & Arai, N. Composition of green turtle feeding aggregations along the Japanese archipelago: implications for changes in composition with current flow. *Marine Biology*, 1-15.

→ Ogden, J. C., Robinson, L., Whitlock, K., Daganhardt, H., & Cebula, R. (1983). Diel foraging patterns in juvenile green turtles (*Chelonia mydas* L.) in St. Croix United States virgin islands. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 66(3), 199-205.

→ Rangelova, E., Huiskes, M., & Pauwels, E. J. (2004, October). Towards computer-assisted photo-identification of humpback whales. In *Image Processing, 2004. ICIP'04. 2004 International Conference on* (Vol. 3, pp. 1727-1730). IEEE.

→ Reisser, J. W., Proietti, M., Kinas, P. G., & Sazima, I. (2008). Photographic identification of sea turtles: method description and validation, with an estimation of tag loss.

→ Sánchez Fabián Andrés & Duván D. Quiroga. 2001. Determinación de hábitos y comportamiento alimenticio de la tortuga marina negra (*Chelonia mydas agassizii*) en el Parque Nacional Natural Gorgona-Pacífico Colombiano. Trabajo de grado para optar al Título de Ecólogo. Fundación Universitaria de Popayán. Facultad de Ciencias Naturales, Programa de Ecología

→ Sazima, C., Grossman, A., & Sazima, I. (2010). Turtle cleaners: reef fishes foraging on epibionts of sea turtles in the tropical Southwestern Atlantic, with a summary of this association type. *Neotropical Ichthyology*, 8(1), 187-192.

→ Schofield, G., Katselidis, K. A., Dimopoulos, P., & Pantis, J. D. (2008). Investigating the viability of photo-identification as an objective tool to study endangered sea turtle populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 360(2), 103-108.

→ Seminoff, J.A. (Southwest Fisheries Science Center, U.S.) 2004. *Chelonia mydas*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org>.

→ Seminoff JA, Schroeder B, McPherson S, Possardt E, Bibb K (2007) Green sea turtle (*Chelonia mydas*) 5- year review: Summary and evaluation: National Marine Fisheries Service and US Fish and Wildlife Service Report 130. 150 p.

→ Senko, J., López-Castro, M. C., Koch, V., & Nichols, W. J. (2010). Immature East Pacific Green Turtles (*Chelonia mydas*) Use Multiple Foraging Areas off the Pacific Coast of Baja California Sur, Mexico: First Evidence from Mark-Recapture Data 1. *Pacific Science*, 64(1), 125-130.

→ Sibly, R.M., Barker, D., Denham, M.C., Hone, J., Page, M., 2005. On the regulation of populations of mammals, birds, fish, and insects. *Science* 309, 607–610.

- Speed, C. W., Meekan, M. G., & Bradshaw, C. J. (2007). Spot the match—wildlife photo-identification using information theory. *Frontiers in zoology*, 4(2), 1-11.
- Volker K, Brooks LB, Nichols WJ (2007) Population ecology of the green/black turtle(*Cheloniemydas*)inBahíaMagdalena,Mexico.*MarineBiology*153:35–46.
- Wells, G. L., & Turtle, J. W. (1986). Eyewitness identification: The importance of lineup models. *Psychological Bulletin*, 99(3), 320.
- Zárata, P., & Carrión, J. (2007). Evaluación de las áreas de alimentación de las tortugas marinas en las Islas Galápagos. *Fundación Charles Darwin (FCD)*.