



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
BIOLÓGICAS**

CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA MARINA

**“Nuevos haplotipos de la Región Control del ADNmt de la
tortuga verde *Chelonia mydas* proveniente de las costas norte
y centro del Perú”**

Tesis para optar el título profesional de:

BIÓLOGA MARINA

Presentado por:

Jackeline Ruiz Mendoza (0000-0002-2627-8540)

Asesor:

Giovanna Elizabeth Sotil Caycho (0000-0002-1583-8821)

Lima – Perú

2021

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 23 de septiembre de 2020.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Dra. BASLAVI MARISBEL CÓNDOR LUJÁN

Miembro: Dr. ROGER IZIGA GOICOCHEA

Miembro: Dr. WILBERT SERRANO HUIÑO CANA

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

“New mtDNA Control Region haplotypes of the green turtle *Chelonia mydas* from north and central Peruvian coasts”

Presentada por la/el estudiante/bachiller:

- Jackeline Ruiz Mendoza

Para optar el Título Profesional de Bióloga Marina

Asesorada por: Mg. Giovanna Elizabeth Sotil Caycho

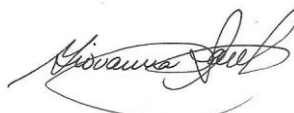
Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de la estudiante de la carrera de Biología Marina en la sustentación, concluyen de manera unánime (X) por mayoría simple () calificar a:

| | | | |
|--|----------------------------|----------------------------------|-----------------|
| Tesisista: Jackeline Ruiz Mendoza | | Nota (en letras): 18 (dieciocho) | |
| Aprobado () | Aprobado - Muy buena (X) | Aprobado - Sobresaliente () | Desaprobado () |

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Dra. BÁSLAVI MARISBEL CÓNDOR LUJÁN
Presidente



Mg. GIOVANNA ELIZABETH SOTIL CAYCHO
Asesora



Dr. ROGER IZIGA GOICOCHEA
Miembro 1



Dr. WILBERT SERRANO HUIÑO CANA
Miembro 2

Índice

| | |
|--|-----------|
| CARÁTULA..... | 1 |
| Acta de sustentación..... | 4 |
| RESUMEN..... | 5 |
| ABSTRACT..... | 6 |
| | |
| CONTENIDO EN ESPAÑOL..... | 7 |
| Introducción..... | 8 |
| Materiales y Métodos..... | 11 |
| Resultados..... | 13 |
| Discusiones / Conclusión..... | 15 |
| | |
| CONTENIDO EN INGLÉS..... | 24 |
| Introduction..... | 25 |
| Materials and Methods..... | 26 |
| Results..... | 27 |
| Discussion / Conclusion..... | 31 |
| | |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 41 |

Resumen

La tortuga verde *Chelonia mydas* figura en la Lista Roja de la UICN como una especie en peligro de extinción y el éxito de las estrategias para su conservación depende en parte de las contribuciones al conocimiento sobre su biología. En este estudio se utilizó secuencias de la región control del ADN mitocondrial para evaluar la composición de haplotipos e inferir el origen natal de 196 tortugas verdes muestreadas en el estuario de Virrilá (VE) y en la bahía de Paracas (PB) ubicadas en Perú, durante los años 2015 y 2016. Se encontró un total de veinte haplotipos, de los cuales doce estuvieron vinculados a las principales colonias de anidación del Pacífico oriental, cinco fueron considerados huérfanos y tres fueron nuevos. Los haplotipos más frecuentes fueron CmP4.6, CmP4.1 y CmP4.7. CmP4.6 se ha descrito previamente como el más común de la unidad de manejo (UM) de Galápagos, mientras que CmP4.1 se ha reportado como un haplotipo común de las UMs del Pacífico oriental. CmP4.7 ha sido descrito como endémico de la UM de Galápagos. Los tres nuevos haplotipos (CmP246.1, CmP4.18 y CmP4.21) se identificaron en individuos de VE con una baja frecuencia (0,7%) y la red de haplotipos mostró que estos estuvieron estrechamente relacionados a CmP4.6 y CmP4.7, sugiriendo que su origen natal estaría en el Pacífico oriental. Además, se observó una alta diversidad haplotípica en VE (0,74) y PB (0,83), comparable a varias zonas de alimentación tanto del Océano Pacífico como del Atlántico. La presencia de nuevos haplotipos en zonas de alimentación destaca la importancia de continuar los estudios en zonas de anidación, para registrar completamente los haplotipos regionales. La alta diversidad haplotípica junto al múltiple origen de los haplotipos encontrados en este estudio proporciona evidencia genética de la conexión de las costas peruanas con varias colonias de anidación de la región, particularmente con la UM de Galápagos.

Abstract

The green turtle *Chelonia mydas* is an endangered species according to the IUCN Red List, so knowledge about its biology contributes to the conservation strategies success. Using mitochondrial DNA control region sequences, we evaluated the haplotype composition and infer the natal origin of 196 green turtles sampled in Virrila estuary (VE) and Paracas bay (PB), from Peruvian coasts, during 2015 and 2016. A total of twenty haplotypes were found, of which twelve were tracked to the main eastern Pacific populations, five were considered orphans and three were new. The most frequent haplotypes were CmP4.6, CmP4.1 and CmP4.7. Haplotype CmP4.6 has been previously described as a the most common to Galapagos management unit (MU), whereas CmP4.1 has been reported as common to the eastern Pacific MUs. CmP4.7 have been considered as endemic to Galapagos MU. The three new haplotypes (CmP246.1, CmP4.18 and CmP4.21) were identified in individuals from VE, with a low frequency (0.7%). Parsimony statistical network showed new haplotypes were closely related to CmP4.6 and CmP4.7, suggesting their natal origin may be located within the eastern Pacific. High haplotype diversity was observed in VE (0.74) and PB (0.83), comparable to several foraging zones from both Pacific and Atlantic Ocean. The presence of new haplotypes in foraging zones highlights the importance of continuing with genetic surveys in nesting grounds in order to completely record regional haplotypes. High haplotype diversity and multiple origin haplotypes found in this study provide a genetic evidence for Peruvian inshore habitats connection, with several nesting colonies from the region, particularly for the Galapagos MU.

Nuevos haplotipos de la Región Control del ADNmt de la tortuga verde *Chelonia mydas* proveniente de las costas norte y centro del Perú

Jackeline Ruiz¹ y Giovanna Sotil².

¹Universidad Científica del Sur, Carrera de Biología Marina, Lima, Perú

²Instituto del Mar del Perú, Laboratorio de Genética Molecular, Lima, Perú

Correo electrónico del autor correspondiente: mendoza_jackie@hotmail.com

Resumen

La tortuga verde *Chelonia mydas* figura en la Lista Roja de la UICN como una especie en peligro de extinción y el éxito de las estrategias para su conservación depende en parte de las contribuciones al conocimiento sobre su biología. En este estudio se utilizaron secuencias de la región control del ADN mitocondrial para evaluar la composición de haplotipos e inferir el origen natal de 196 tortugas verdes muestreadas en el estuario de Virrilá (VE) y en la bahía de Paracas (PB) ubicadas en Perú, durante los años 2015 y 2016. Se encontró un total de veinte haplotipos, de los cuales doce estuvieron vinculados a las principales colonias de anidación del Pacífico oriental, cinco fueron considerados huérfanos y tres fueron nuevos. Los haplotipos más frecuentes fueron CmP4.6, CmP4.1 y CmP4.7. CmP4.6 se ha descrito previamente como el más común de la unidad de manejo (UM) de Galápagos, mientras que CmP4.1 se ha reportado como un haplotipo común de las UMs del Pacífico oriental. CmP4.7 ha sido descrito como endémico de la UM de Galápagos. Los tres nuevos haplotipos (CmP246.1, CmP4.18 y CmP4.21) se identificaron en individuos de VE con una baja frecuencia (0,7%) y la red de haplotipos mostró que estos estuvieron estrechamente relacionados a CmP4.6 y CmP4.7, sugiriendo que su origen natal estaría en el Pacífico oriental. Además, se observó una alta diversidad haplotípica en VE (0,74) y PB (0,83), comparable a varias zonas de alimentación tanto del Océano Pacífico como del Atlántico. La presencia de nuevos haplotipos en zonas de alimentación destaca la importancia de continuar los estudios en zonas de anidación. La alta diversidad haplotípica junto al múltiple origen de los haplotipos encontrados en este estudio proporciona evidencia genética de la conexión de las costas peruanas con varias colonias de anidación de la región, particularmente con la UM de Galápagos.

Introducción

La tortuga verde *Chelonia mydas* se distribuye globalmente a lo largo de aguas tropicales y subtropicales de los océanos Pacífico, Índico y Atlántico (Hasbun et al. 1998). Su ciclo de vida incluye períodos de residencia en áreas de anidación, alimentación y desarrollo. Después de la eclosión, las tortugas regresan al mar y permanecen en hábitats pelágicos donde son llevados a través de las corrientes. Este período del ciclo de vida se le conoce como "los años perdidos" ya que no existe información sobre sus patrones migratorios dada la dificultad de rastrear a los individuos (Dethmers et al. 2006). Cuando las tortugas aumentan de tamaño y por ende se vuelven menos susceptibles a los depredadores, se trasladan a áreas neríticas y permanecen en estas zonas conocidas por ser áreas de alimentación. Cuando tanto machos como hembras alcanzan la madurez sexual, regresan a su colonia natal para reproducirse. Este comportamiento en adultos reproductores es conocido como filopatría y es una de las razones por las que existen colonias genéticamente aisladas, debido a que el genético restringido es restringido (Allard et al. 1994; Lohmann et al. 2013).

Se han realizado varios estudios basados en el análisis de secuencias del ADN mitocondrial (ADNmt) en tortugas verdes provenientes de zonas de anidación. De acuerdo con el análisis de secuencias de la región control (RC) del ADNmt de *C. mydas*, se establecieron unidades de manejo (UM) bien delimitadas en el Océano Pacífico central oriental (Dutton et al. 2014; Chaves et al. 2017). Dutton et al. (2014) estudiaron individuos de ocho colonias de anidación (n = 545) y encontraron diferencias genéticas significativas entre colonias geográficamente distantes, lo que resultó en cinco unidades genéticas distinguibles (Islas del Noroeste de Hawái, Revillagigedo, Michoacán, Costa Rica y Galápagos). Del mismo modo, Chaves et al. (2017) analizaron 133 especímenes de dos colonias ecuatorianas (Isla Galápagos y Parque Nacional Machalilla) y concluyeron que, aunque ambas localidades están separadas por aproximadamente 1000 km, componen una sola unidad genética (la UM Galápagos). Por otro lado, los estudios genéticos en las zonas de alimentación se han realizado en menor medida (Bjorndal 1999), y estas son importantes de considerar porque proporcionan información sobre las rutas migratorias para la conservación de la especie (Bowen 1995).

Además, estudios genéticos de tortugas verdes en áreas de alimentación del océano Pacífico (Read et al.2015; Ng et al.2017; Jones et al.2018; Piovano et al.2019) y Atlántico (Luke et al. 2004; Bass et al. 2006; Costa et al.2017; Hancock et al.2019), se han realizado basándose en el análisis de la RC del ADNmt. Estos estudios muestran una alta diversidad haplotípica con haplotipos de origen múltiple, debido a la agregación de individuos de diferentes cohortes y colonias (Bass et al. 2006). Asimismo, en el Pacífico sureste, se ha observado que las tortugas verdes de provenientes de Galápagos, una de las principales poblaciones regionales de anidación, utilizan en su mayoría hábitats costeros de América del Sur como áreas de alimentación, incluidas las costas de Chile, Ecuador y Colombia (Amorocho et al. 2012; Veliz et al. 2014 Alvarez-Varas et al.2017; Chaves et al.2017). Por lo anteriormente mencionado, podríamos esperar que las agregaciones de *C. mydas* de la costa peruana presenten haplotipos que pueden ser rastreados a diferentes orígenes natales y mostrar una alta diversidad haplotípica.

En particular, los hábitats neríticos peruanos se consideran importantes áreas de alimentación para las tortugas verdes adultas y juveniles (Vélez-Zuazo et al. 2014). Se han realizado estudios en Perú con enfoques en ecología trófica y demografía mediante captura incidental o captura dirigida (Santillán 2008; Rosales et al. 2010; Quiñones et al. 2015). Por el contrario, el enfoque genético ha sido aplicado en menor medida. Recientes observaciones han indicado que se podrían encontrar diferentes linajes de ADNmt en Perú (Álvarez-Varas et al. 2020), pero un muestreo más exhaustivo es necesario. Además, se ha sugerido que dos localidades albergan importantes agregaciones de *C. mydas* debido a que se han encontrado tiempos de residencia considerables y la presencia de individuos sanos (Vélez-Zuazo et al. 2014; Paredes 2017). Uno de estos lugares es el único estuario peruano reconocido ubicado en la costa norte (estuario de Virrilá, EV), y el otro es una de las áreas naturales protegidas más importantes del centro sur del país (bahía de Paracas, BP).

En este sentido, en este estudio se evaluó la composición genética y el origen natal de *C. mydas* de EV y BP, recolectadas en 2015 y 2016, basándonos en el análisis de las secuencias del extremo 5' de la RC, establecidas para los estudios genéticos de la tortuga verde.

Materiales y métodos

Colección de muestras

Los individuos de tortugas verdes juveniles y adultas, fueron capturados con ayuda de redes de pesca en el norte (EV, 05°48' S, 80°51' W) y centro sur (BP, 13 ° 49' S 76 ° 16' W) de la costa peruana (Fig. 1), entre los años 2015 y 2016. Aproximadamente 2-3 mm³ de tejido muscular fue recolectado del cuello o los hombros de cada espécimen y se almacenaron en tubos de 2 ml conteniendo sal o solución de dimetilsulfóxido (DMSO) saturada con NaCl. En total, se recolectaron 196 muestras, 135 del EV y 61 de BP.

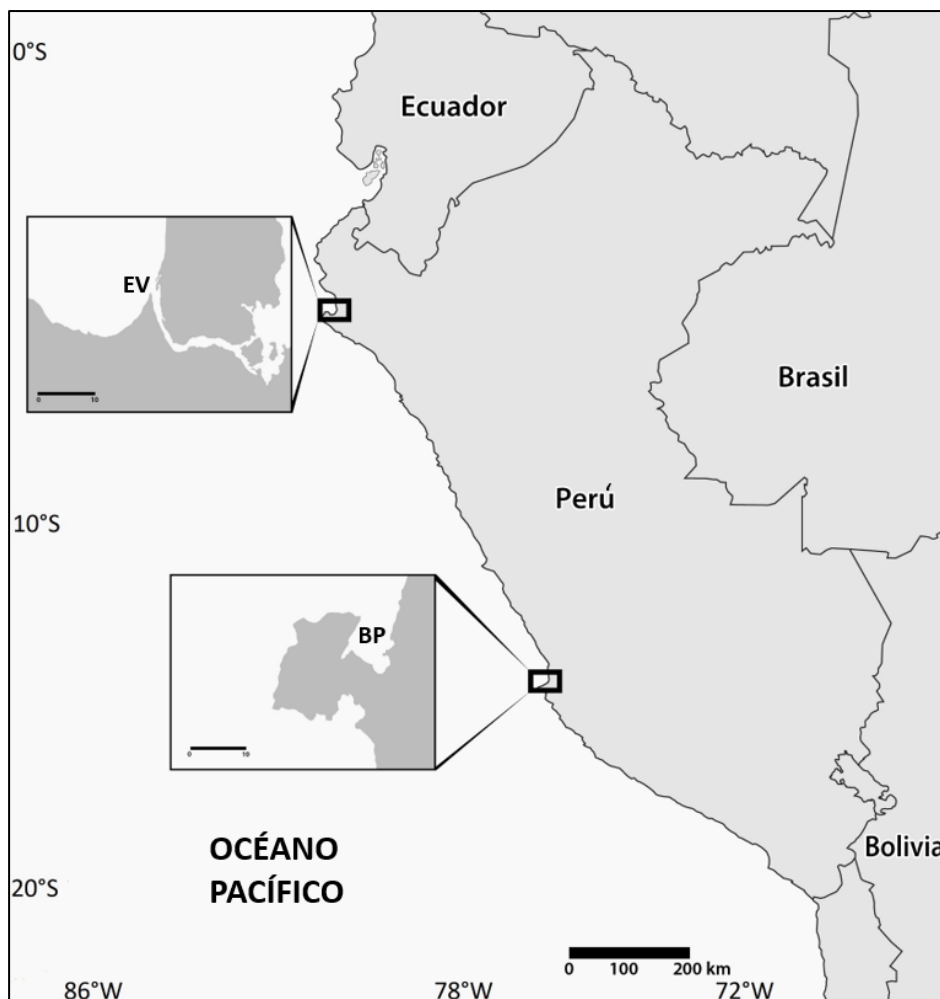


Fig. 1 Lugares de muestreo. Estuario de Virrilá (EV) y Bahía de Paracas (BP). Ambos sitios se encuentran alejados por unos 1200 km aproximadamente

Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

El ADN total fue extraído utilizando el método CTAB (Sambrook et al. 1989), el ADN se precipitó con etanol y se resuspendió en agua purificada. Todas las extracciones de ADN se evaluaron cuantitativa y cualitativamente utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) y una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñida con GelRed, respectivamente. Los fragmentos de la RC se amplificaron utilizando los cebadores LCM-15382 (5' GCTTAACCCTAAAGCATTGG 3') y H950g (5' GTCTCGGATTTAGGGGTTTG 3') (Abreu-Grobois et al. 2006). La PCR se realizó en un volumen total de 10 µl, considerando una concentración final 1X de la de solución de mezcla maestra de PCR (Qiagen), 0,3 µM de cebadores y 10 ng / µl de ADN molde. Productos amplificados de aproximadamente 800 pares de bases (pb) del segmento del extremo 5' de la RG se realizaron en un termociclador Proflex (Applied Biosystems), comenzando con una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 40 s, hibridación a 51 °C durante 40 s, extensión a 72 °C durante 1 min y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos de la PCR se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%; los que tenían el tamaño esperado se purificaron utilizando el kit Accuprep, con una concentración final de 20 ng/µl. Ambas hebras de ADN de los productos de PCR se secuenciaron usando un analizador genético ABI 3500.

Análisis de datos

Los electroferogramas se editaron mediante el programa FinchTV1.4.0 (Geospiza Research Team) y se obtuvieron secuencias consenso de cada espécimen. Todas las secuencias obtenidas se alinearon y cortaron a 770pb con ayuda del algoritmo CLUSTAL W implementado en BioEdit 7.2.6 (Hall 1999). Los datos de haplotipos se generaron utilizando DnaSP (Librado y Rozas 2009).

Para identificar los haplotipos, se utilizó la herramienta blast y la base de datos GenBank del NCBI. Cuando se identificó un nuevo haplotipo, todo el proceso se repitió dos veces para cada muestra, desde la extracción de ADN hasta la secuenciación para corroborar el resultado. Finalmente, se reportaron las nuevas secuencias a la base de datos de la NOAA y luego se

consultó en una biblioteca de referencia local para la asignación de códigos de los haplotipos encontrados en ambos lugares.

La diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) fueron calculadas asumiendo el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei 1993) utilizando el software Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer 2010). Para poder representar las genealogías de los haplotipos se utilizó el programa TCS v.1 2.1 (Clement et al. 2000), el cual aplica el algoritmo de parsimonia estadística para construir una red de haplotipos (Templeton et al. 1992)

Resultados

En total se identificaron 20 haplotipos, de estos 17 habían sido previamente reportados. EV y BP estaban compuestos por 16 y 13 haplotipos respectivamente. Se encontraron tres nuevos haplotipos en EV. El haplotipo CmP4.6 mostró la mayor frecuencia en ambas localidades (39.3% en EV y 32.8% en BP) seguido por CmP4.1 (24.4% en EV y 21.3% en BP) y CmP4.7 (21.5% en EV y 14.8% en BP). Los haplotipos CmP4.8 (1.6%) CmP4.9 (6.6%) CmP4.17 (1.6%) y CmP5.1 (1.6%) solo se encontraron en BP, mientras que los haplotipos CmP24.1 (1.5%), CmP8.3 (0,7%), CmP15,1 (1,5%) y CmP4,12 (0,7%) eran exclusivos de EV. Por otro lado, los haplotipos de menor frecuencia (0,7%) fueron CmP4.12, CmP8.1, CmP8.3, CmP17.1, CmP92.1, CmP97.1 y los tres nuevos haplotipos (CmP246.1, CmP4 .18 y CmP4.21) para EV, mientras que CmP4.8, CmP4.17, CmP5.1, CmP92.1 y CmP93.2 presentaron la frecuencia más baja (1.6%) para BP. En la Tabla 1 se proporciona una lista detallada de los haplotipos.

De los 20 haplotipos encontrados en las 196 muestras, se identificaron 61 sitios polimórficos, de los cuales 44 fueron transiciones y dos transversiones. Además, se observaron mutaciones de tipo indel en tres haplotipos; CmP93.2 y CmP246.1 presentaron una inserción de ocho bases, mientras que CmP97.1 mostró una delección de cuatro bases (Tabla 2). La diversidad haplotípica fue 0,7430 y 0,8262, mientras que la diversidad nucleotídica fue 0,0014 y 0,0025 para EV y BP respectivamente (Tabla 3).

La red de haplotipos mostró una estructura en forma de estrella con tres haplotipos centrales dominantes (CmP4.6, CmP4.1 y CmP4.7) rodeados por varios haplotipos que mostraron bajas frecuencias. La mayoría de los haplotipos estaban estrechamente vinculados entre sí mediante uno o dos pasos mutacionales; excepto CmP93.2 que difería en ocho pasos mutacionales de

CmP4.6 y CmP97.1 que mostró 36 pasos mutacionales de CmP4.1. Los haplotipos exclusivos de BP (CmP4.9 y CmP4.17) y EV (CmP24.1, CmP4.12 y CmP15.1) estaban estrechamente relacionados con CmP4.6 mediante un solo paso mutacional. Asimismo, el haplotipo CmP4.8 único de Paracas se vinculó a CmP4.1. Por otro lado, el haplotipo exclusivo de EV CmP8.3 y el haplotipo único de PB CmP5.1 se vincularon con CmP4.1 a través de uno y dos haplotipos hipotéticos, respectivamente. Los haplotipos nuevos CmP4.18 y CmP4.21 estaban estrechamente relacionados con CmP4.9 y CmP4.7 respectivamente, difiriendo en un solo paso mutacional; mientras que el nuevo haplotipo CmP246.1 difería en nueve pasos mutacionales de CmP4.6 (Fig. 2).

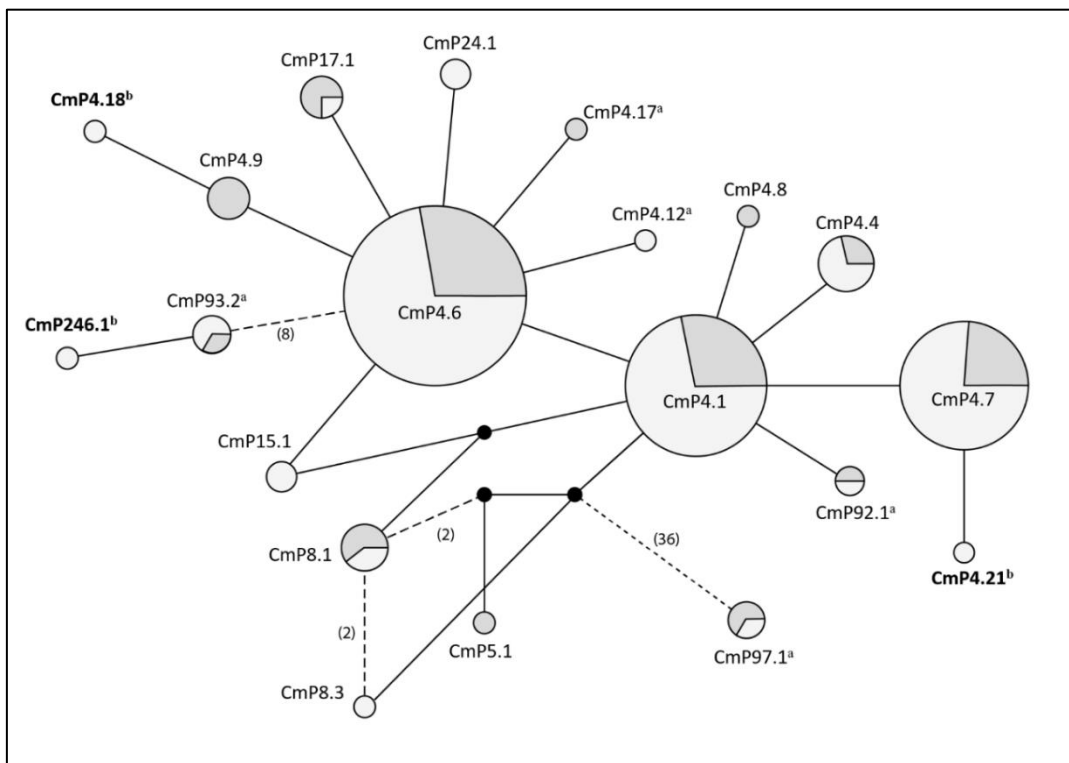


Fig. 2 Red de haplotipos. Los diferentes colores indican los lugares de muestreo: estuario de Virrila (gris claro) y bahía de Paracas (gris oscuro). El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Las líneas representan mutación de un par de bases; las excepciones se especifican entre paréntesis. Los círculos negros representan haplotipos hipotéticos. ^ahaplotipo huérfano; ^bNuevo haplotipo (negrita).

Discusión / Conclusión

Diversidad genética

Se observó una alta diversidad haplotípica tanto en EV (0,74) como en BP (0,83), comparable a varias zonas de alimentación tanto del Pacífico como del Atlántico (Luke et al. 2004; Bass et al. 2006; Naro-Maciel et al. 2007; Nishizawa et al. 2010; Joseph et al. 2016; Chaves et al. 2017; Jones et al. 2018) e incluso superior a algunas localidades (Bass y Witzell 2000; Luke et al. 2004; Naro-Maciel et al. 2007; Dutton et al. 2008; Amorocho et al. 2012; Jones et al. 2018). Una alta diversidad haplotípica parece ser común en áreas de alimentación donde convergen individuos provenientes de diferentes cohortes y poblaciones de anidación (Bass y Witzell 2000; Bass et al. 2006). Por el contrario, se ha encontrado una baja diversidad haplotípica en las zonas de alimentación utilizadas por una sola población, como las áreas de forrajeo de Hawái (Dutton et al. 2008). Por otro lado, la diversidad nucleotídica estimada en este estudio (EV: 0.002 y BP: 0.004) fue similar a las colonias del Pacífico (Dutton et al. 2014) y otras zonas de alimentación (Nishizawa et al. 2010; Joseph et al. 2016; Chaves et al. 2017), a excepción de algunas agregaciones de *C. mydas* reportadas en Australia, Ecuador y Colombia (Amorocho et al. 2012; Jones et al. 2018; Chaves et al. 2017). En el caso de Colombia, que fue el único estudio que interpretó estos hallazgos, se atribuyó una alta diversidad nucleotídica a la presencia de haplotipos originados en un amplio rango geográfico (Amorocho et al. 2012).

Origen natal

Tanto VE como PB mostraron haplotipos endémicos de tres de las cuatro UM del Pacífico oriental (Galápagos, Costa Rica, Michoacán y Revillagigedo). Los haplotipos CmP4.4, CmP4.7, CmP4.9, CmP15.1, CmP17.1 y CmP24.1 han sido descritos como endémicos de Galápagos, siendo CmP4.7 el más común para esta MU (Chaves et al. 2017; Dutton et al. 2014). El haplotipo CmP8.3 se ha reportado exclusivamente en Costa Rica; mientras que CmP5.1 y CmP4.8 han sido descritas como endémicas de Michoacán. También observamos haplotipos compartidos por más de una colonia que incluían haplotipos el dominantes y comunes (CmP4.6 y CmP4.1) y el haplotipo de baja frecuencia CmP8.1 (Dutton et al. 2014; Chaves et al. 2017). El haplotipo CmP4.1 ha sido observado con alta frecuencia en Michoacán y en menor grado en

Galápagos y Revillagigedo, mientras que en Costa Rica esta presente en baja frecuencia. Por otro lado, CmP4.6 ha sido descrito como dominante en la UM de Galápagos y también se ha observado con menor frecuencia en Costa Rica y Michoacán; mientras que en Revillagigedo no existen registros de este haplotipo. El haplotipo CmP8.1 ha sido previamente reportado en colonias de Michoacán y Costa Rica (Dutton et al. 2014; Chaves et al. 2017).

En este estudio, dos de los tres haplotipos predominantes (CmP4.6 y CmP4.7) estaban estrechamente relacionados la UM de Galápagos. CmP4.7 ha sido reportado como endémico, y CmP4.6 ocurre en alta frecuencia en esta UM (Dutton et al. 2014; Chaves et al. 2017). Las zonas de alimentación de América del Sur, incluidos los hábitats neríticos peruanos, parecen tener una mayor contribución de la UM de Galápagos que de otras colonias del Pacífico oriental. Por ejemplo, esto se ha observado en zonas de alimentación chilenas, ecuatorianas y colombianas ya sea por Mixed Stock Analysis (MSA) o por inferencias (Amarocho et al. 2012; Chaves et al. 2017; Álvarez-Varas et al. 2017; Veliz et al. 2014). Adicionalmente, no se observó ningún haplotipo proveniente de las colonias de Hawái en ninguna de las zonas estudiadas. No se han observado haplotipos hawaianos en las áreas de alimentación del Pacífico oriental, excepto en Revillagigedo (Amarocho et al. 2012; Chaves et al. 2017; Álvarez et al. 2017). Se han propuesto el aislamiento geográfico y las barreras oceanográficas como las posibles causantes de una dispersión restringida de los haplotipos hawaianos (Dutton et al. 2008).

No fue posible inferir la colonia natal de cinco haplotipos (CmP97.1, CmP4.17, CmP92.1, CmP93.2 y CmP4.12), debido a que no se encontraron registros de ellos en ninguna colonia de anidación estudiada hasta la fecha. Estos haplotipos se consideran huérfanos y todos ellos excluyendo a CmP4.12, han sido reportados previamente en zonas de alimentación del atolón Palmyra (Pacífico central), San Diego (EE. UU.), Gorgona (Colombia), Islas Galápagos y Machalilla (Ecuador continental) (Naro-Maciel et al. 2014; Chaves et al. 2017; Dutton et al. 2019). El haplotipo CmP4.12 solo se encontró reportado en la base de datos del GenBank. Bass et al. (2006) y Chaves et al. (2017) sugirieron que los haplotipos huérfanos podrían indicar que hay colonias no identificadas o que los tamaños de muestreo en las áreas de anidación estudiadas no han sido suficientes para detectar haplotipos raros. Es posible que tres de los haplotipos huérfanos (CmP4.17, CmP4.12 y CmP92.1) reportados en este estudio,

tengan su origen natal en los alrededores del Pacífico oriental porque estaban estrechamente relacionados con los principales haplotipos regionales (Cmp4.6 y Cmp4.1). Aunque Cmp93.2 mostró más pasos mutacionales con respecto a los haplotipos predominantes del Pacífico oriental, estaba estrechamente relacionado con Cmp93.1, que ha sido descrito como endémico de Galápagos (Chaves et al. 2017). De manera similar, sugerimos que los nuevos haplotipos huérfanos reportados en EV (Cmp246.1, Cmp4.18 y Cmp4.21) podrían estar proviniendo de colonias del Pacífico oriental ya que difieren en algunos pasos mutacionales de Cmp4.6 y Cmp4.7, que han sido descrito dentro de los clados genéticos del Pacífico oriental (Dutton et al. 2014). La presencia de nuevos haplotipos en las zonas de forrajeo resalta la importancia de continuar con los estudios genéticos tanto en áreas de anidación nuevas como previamente estudiadas para poder registrar por completo los haplotipos regionales. Por otro lado, nuestra red mostró que el haplotipo huérfano Cmp97.1 difiere en varios pasos mutacionales de Cmp4.6 y Cmp4.1, lo que puede indicar que su origen natal estaría ubicado en regiones más distantes que los otros haplotipos nuevos y huérfanos, ya que se espera una mayor divergencia de secuencia entre poblaciones geográficamente distantes (Amarocho et al. 2012). Además, Álvarez-Varas et al. (2020) incluyó al haplotipo Cmp97.1 dentro del linaje genético centro-sur / oeste del Pacífico.

Se ha sugerido que las costas peruanas son importantes lugares de alimentación para *C. mydas*, debido a las altas tasas de captura incidental (Alfaro-Shigueto et al. 2011) y los largos tiempos de residencia (Vélez-Zuazo et al. 2014). Las condiciones ambientales óptimas podrían ser una de las razones de la presencia de tales agregaciones en los hábitats peruanos, ya que se han reportado altas tasas de crecimiento e índice de condición corporal (Vélez-Zuazo et al. 2014; Paredes 2017) y también debido a una alta variedad de recursos alimenticios que son explotadas por las tortugas verdes (Santillán 2008; Jiménez et al. 2017). Así como los estudios demográficos y de ecología trófica, pero desde una perspectiva genética, respaldamos que la costa peruana es un componente relevante de la red de hábitats de especies en el Pacífico oriental, debido a un alto número de haplotipos compartidos y endémicos de las UM regionales (Galápagos, Costa Rica, Michoacán y Revillagigedo). Estos hallazgos estarían indicando una conexión entre los hábitats costeros peruanos y varias colonias. Definir las áreas de alimentación utilizadas por las poblaciones de anidación, tiene indudable utilidad en la

conservación, ya que permite cubrir hechos que ocurren lejos de los sitios de anidación, pero que influyen en la dinámica poblacional (Seminoff et al. 2008 y Jones et al. 2018). En este sentido, es importante que los estudios futuros establezcan la contribución de las UM a la agregación de poblaciones mixtas que ocurren en el Perú, con el fin de determinar un vínculo más específico y eventualmente evaluar cómo las condiciones naturales y antropogénicas en la costa peruana podrían estar afectando a las UM regionales.

El presente estudio estaría contribuyendo al conocimiento de la especie mediante la obtención de data de haplotipos para la costa peruana. Tanto EV como BP se caracterizaron por una alta diversidad haplotípica y haplotipos de origen múltiple, proporcionando una evidencia genética de la conexión de hábitats costeros peruanos, con varias colonias de anidación de la región, particularmente con la UM de Galápagos. Los tres nuevos haplotipos identificados estaban estrechamente relacionados con haplotipos comunes de las poblaciones del Pacífico oriental y endémicos de la UM de Galápagos, lo que estaría indicando que su origen natal estaría ubicado en los alrededores del Pacífico oriental.

Declaraciones

Financiamiento

Instituto del Mar del Perú (IMARPE)

Estándares Éticos

Se siguieron todas las pautas internacionales, nacionales y/o institucionales aplicables para el cuidado y uso de animales.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

Queremos agradecer las valiosas contribuciones de Depredadores Superiores del Instituto del mar del Perú (IMARPE) por su ayuda en la recolección de muestras.

Tablas

Tabla 1. Frecuencias de haplotipos de tortuga verde de la bahía de Paracas y el estuario de Virrilá. Número de individuos (N). Se indican los números de acceso registrados en el GenBank.

| Haplotipo | Lugar de muestreo | | | | Código de accesión del GenBank | Referencia |
|-----------------------------|-------------------|------|---------|------|--------------------------------------|--|
| | Paracas | | Virrilá | | | |
| | N | % | N | % | | |
| <i>CmP4.1</i> | 13 | 21.3 | 33 | 24.4 | KC306666 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP4.4</i> | 2 | 3.3 | 5 | 3.7 | KC306665 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP4.6</i> | 20 | 32.8 | 53 | 39.3 | KC306647 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP4.7</i> | 9 | 14.8 | 29 | 21.5 | KC306660 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP4.8</i> | 1 | 1.6 | - | 0 | KC306663 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP4.9</i> | 4 | 6.6 | - | 0 | KC306643 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP4.12^a</i> | - | 0 | 1 | 0.7 | KX499512 | <i>Heidemeyer et al. (data no publicada)</i> |
| <i>CmP4.17^a</i> | 1 | 1.6 | - | 0 | MK111422 | <i>Dutton et al. 2018</i> |
| <i>CmP5.1</i> | 1 | 1.6 | - | 0 | KC306651 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP8.1</i> | 3 | 4.9 | 1 | 0.7 | KC306659 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP8.3</i> | - | 0 | 1 | 0.7 | KC771270 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP15.1</i> | - | 0 | 2 | 1.5 | KC306649 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP17.1</i> | 3 | 4.9 | 1 | 0.7 | KC306648 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP24.1</i> | - | 0 | 2 | 1.5 | KC306646 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| <i>CmP92.1^a</i> | 1 | 1.6 | 1 | 0.7 | FJ917195 | <i>Dutton et al. (data no publicada)</i> |
| <i>CmP93.2^a</i> | 1 | 1.6 | 2 | 1.5 | KY350180 | <i>Chaves et al. 2017</i> |
| <i>CmP97.1^a</i> | 2 | 3.3 | 1 | 0.7 | FJ917198 | <i>Dutton et al. (data no publicada)</i> |
| <i>CmP246.1^b</i> | - | 0 | 1 | 0.7 | | Este estudio |
| <i>CmP4.18^b</i> | - | 0 | 1 | 0.7 | | Este estudio |
| <i>CmP4.21^b</i> | - | 0 | 1 | 0.7 | | Este estudio |
| <i>Total</i> | 61 | 100 | 135 | 100 | | |

^aHaplotipos huérfanos ^bHaplotipos nuevos

Tabla 3. Estimaciones mensuales y totales de la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) para las agregaciones de tortugas verdes de Virrilá y Paracas. Número de muestras (n), número de haplotipos (H), desviación estándar (DE).

| | Virrilá | | | | | Total | Paracas |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 2015 | | | 2016 | | | |
| | Marzo | Julio | Octubre | Abril | Agosto | | |
| n | 29 | 30 | 30 | 19 | 27 | 135 | 61 |
| H | 6 | 8 | 7 | 4 | 6 | 16 | 13 |
| h | 0.7783 | 0.8161 | 0.7517 | 0.6895 | 0.6809 | 0.7430 | 0.8262 |
| SD | 0.0400 | 0.0385 | 0.0487 | 0.0596 | 0.0753 | 0.0223 | 0.0310 |
| π | 0.025464 | 0.025539 | 0.026694 | 0.018629 | 0.076224 | 0.002069 | 0.004451 |
| SD | 0.018352 | 0.017673 | 0.018975 | 0.014937 | 0.043729 | 0.001360 | 0.002548 |
| H único | 2 | 2 | 3 | 0 | 3 | 7 | 4 |
| H nuevo | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 |

Material Complementario

Material complementario 1. Composición de haplotipos para el estuario de Virrilá y la bahía de Paracas, comparada con las colonias del Pacífico oriental y central. Parque Nacional Machalilla (MNP) (Chaves et al. 2017); Galápagos, Costa Rica, Michoacán y Revillagigedo (Dutton et al. 2014).

| <i>Haplotipos</i> | <i>Colonias</i> | | | | <i>Zonas de alimentación en Perú</i> | |
|-----------------------------|-----------------|------------|-----------|---------------|--------------------------------------|---------|
| | Galápagos | Costa Rica | Michoacán | Revillagigedo | Virrilá | Paracas |
| <i>CmP4.1</i> | 26 | 2 | 58 | 13 | 33 | 13 |
| <i>CmP4.4</i> | 6 | - | - | - | 5 | 2 |
| <i>CmP4.6</i> | 51 | 7 | 7 | - | 53 | 20 |
| <i>CmP4.7</i> | 31 | - | - | - | 29 | 9 |
| <i>CmP4.8</i> | - | - | 5 | - | - | 1 |
| <i>CmP4.9</i> | 1 | - | - | - | - | 4 |
| <i>CmP5.1</i> | - | - | 43 | - | - | 1 |
| <i>CmP8.1</i> | - | 3 | 1 | - | 1 | 3 |
| <i>CmP8.3</i> | - | 5 | - | - | 1 | - |
| <i>CmP15.1</i> | 3 | - | - | - | 2 | 1 |
| <i>CmP17.1</i> | 4 | - | - | - | 1 | 3 |
| <i>CmP24.1</i> | 1 | - | - | - | 2 | - |
| <i>CmP4.12^a</i> | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>CmP4.17^a</i> | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>CmP92.1^a</i> | - | - | - | - | 1 | 1 |
| <i>CmP93.2^a</i> | - | - | - | - | 2 | 1 |
| <i>CmP97.1^a</i> | - | - | - | - | 1 | 2 |
| <i>CmP246.1^b</i> | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>CmP4.18^b</i> | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>CmP4.21^b</i> | - | - | - | - | 1 | - |

^aHaplotipos huérfanos ^bhaplotipos nuevos

Material complementario 2. Número de individuos (N) por haplotipo de las agregaciones de tortuga verde de Virrilá y Paracas. Número de haplotipos (H).

| Haplotipo | Virrilá | | | | | Paracas | |
|-----------------|---------|-------|---------|-------|--------|---------|----|
| | 2015 | | | 2016 | | | |
| | Marzo | Julio | Octubre | Abril | Agosto | | |
| <i>CmP4.1</i> | 7 | 7 | 7 | 8 | 4 | 33 | 13 |
| <i>CmP4.4</i> | 3 | 2 | - | - | - | 5 | 2 |
| <i>CmP4.6</i> | 10 | 9 | 12 | 8 | 14 | 53 | 20 |
| <i>CmP4.7</i> | 7 | 7 | 7 | 2 | 6 | 29 | 9 |
| <i>CmP4.8</i> | - | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>CmP4.9</i> | - | - | - | - | - | - | 4 |
| <i>CmP4.12</i> | 1 | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>CmP4.17</i> | - | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>CmP5.1</i> | - | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>CmP8.1</i> | - | - | - | - | 1 | 1 | 3 |
| <i>CmP8.3</i> | - | - | - | - | 1 | 1 | - |
| <i>CmP15.1</i> | - | 1 | 1 | - | - | 2 | - |
| <i>CmP17.1</i> | 1 | - | - | - | - | 1 | 3 |
| <i>CmP24.1</i> | - | 1 | - | 1 | - | 2 | - |
| <i>CmP92.1</i> | - | - | 1 | - | - | 1 | 1 |
| <i>CmP93.2</i> | - | 2 | - | - | - | 2 | 1 |
| <i>CmP97.1</i> | - | - | - | - | 1 | 1 | 2 |
| <i>CmP246.1</i> | - | 1 | - | - | - | 1 | . |
| <i>CmP4.18</i> | - | - | 1 | - | - | 1 | . |
| <i>CmP4.21</i> | - | - | 1 | - | - | 1 | . |
| <i>N</i> | 29 | 30 | 30 | 19 | 27 | 135 | 61 |
| <i>H</i> | 6 | 8 | 7 | 4 | 6 | 16 | 13 |

Material complementario 3. Comparación de la diversidad genética entre las agregaciones de alimentación peruanas y otras zonas de alimentación del Pacífico y el Atlántico. Número de haplotipos (H), diversidad de haplotipos (h) y nucleótidos (π), desviación estándar (DE), número de muestras (N) y tamaño del marcador en par de bases (pb).

| <i>Localities</i> | H | $h \pm SD$ | $\pi \pm SD$ | N | <i>bp</i> | <i>Reference</i> |
|-----------------------------|----|-------------------|-------------------|-----|-----------|------------------------------|
| <i>Atlantic</i> | | | | | | |
| North Carolina, USA | 8 | 0.68 ± 0.031 | 0.005 ± 0.003 | 106 | 510 | Bass et al. 2006 |
| Florida, USA | 6 | 0.49 ± 0.067 | 0.003 ± 0.002 | 62 | 510 | Bass and Witzell 2000 |
| Bahamas, Caribbean | 6 | 0.61 ± 0.002 | 0.006 ± 0.003 | 79 | 480 | Lahanas et al. 1998 |
| Barbados, Caribbean | 8 | 0.77 ± 0.028 | 0.010 ± 0.006 | 60 | 488 | Luke et al. 2004 |
| Santa Marta, Colombia | 3 | 0.73 ± 0.096 | 0.004 ± 0.002 | 13 | 781 | Vasquez-Carrillo et al. 2020 |
| La Guajira, Colombia | 7 | 0.75 ± 0.070 | 0.007 ± 0.001 | 30 | 781 | Vasquez-Carrillo et al. 2020 |
| Sao Tome and Principe | 7 | 0.55 ± 0.080 | 0.002 ± 0.003 | 43 | 490 | Hancock et al. 2019 |
| Noronha, Brazil | 6 | 0.73 ± 0.030 | 0.002 ± 0.002 | 32 | 480 | Bjorndal et al. 2006 |
| Almofala, Brazil | 13 | 0.72 ± 0.030 | 0.007 ± 0.004 | 117 | 486 | Naro-Maciel et al. 2007 |
| Ubatuba, Brazil | 10 | 0.45 ± 0.056 | 0.002 ± 0.002 | 113 | 486 | Naro-Maciel et al. 2007 |
| Arvoredo Island, Brazil | 8 | 0.56 ± 0.070 | 0.003 ± 0.001 | 49 | 490 | Proietti et al. 2009 |
| <i>Western Pacific</i> | | | | | | |
| Yaeyama Islands, Japan | 24 | 0.84 ± 0.0220 | 0.033 ± 0.018 | 142 | 380 | Nishizawa et al. 2013 |
| Palmyra Atoll, USA | 19 | 0.62 ± 0.0230 | 0.009 ± 0.005 | 349 | 384 | Naro-Maciel et al. 2014 |
| Brunei Bay, Malaysia | 12 | 0.84 ± 0.040 | 0.009 ± 0.005 | 42 | 770 | Joseph et al. 2016 |
| Cockle Bay, Australia | 10 | 0.46 ± 0.069 | 0.014 ± 0.007 | 74 | 770 | Jones et al. 2018 |
| Green Island, Australia | 12 | 0.55 ± 0.077 | 0.012 ± 0.006 | 57 | 770 | Jones et al. 2018 |
| Low Isles, Australia | 26 | 0.70 ± 0.040 | 0.019 ± 0.010 | 147 | 770 | Jones et al. 2018 |
| <i>Eastern Pacific</i> | | | | | | |
| Hawaii, USA | 6 | 0.46 ± 0.018 | 0.003 ± 0.002 | 788 | 384 | Dutton et al. 2008 |
| Baja California Sur, Mexico | 8 | 0.73 ± 0.043 | 0.002 ± 0.001 | 52 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| Matapalito, Costa Rica | 11 | 0.80 ± 0.053 | 0.003 ± 0.002 | 32 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| Gorgona, Colombia | 23 | 0.79 ± 0.012 | 0.007 ± 0.003 | 176 | 770 | Correa-Cárdenas et al. 2013 |
| Gorgona, Colombia | 7 | 0.30 ± 0.080 | 0.011 ± 0.006 | 55 | 384 | Amorocho et al. 2012 |
| Machalilla, Ecuador | 8 | 0.73 ± 0.051 | 0.002 ± 0.002 | 41 | 770 | Chaves et al. 2017 |
| Machalilla, Ecuador | 10 | 0.75 ± 0.051 | 0.004 ± 0.003 | 43 | 770 | Chaves et al. 2017 |
| Galapagos, Ecuador | 11 | 0.83 ± 0.023 | 0.013 ± 0.007 | 61 | 770 | Chaves et al. 2017 |
| Galapagos, Ecuador | 9 | 0.77 ± 0.031 | 0.002 ± 0.001 | 49 | 770 | Chaves et al. 2017 |
| Galapagos, Ecuador | 10 | 0.78 ± 0.032 | 0.002 ± 0.001 | 54 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| San Jose, Perú | 3 | 0.66 ± 0.072 | 0.001 ± 0.001 | 14 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| Virrilá, Perú | 16 | 0.74 ± 0.022 | 0.002 ± 0.001 | 135 | 770 | Este estudio |
| Paracas, Perú | 13 | 0.83 ± 0.031 | 0.004 ± 0.003 | 61 | 770 | Este estudio |
| Arica, Chile | 9 | 0.86 ± 0.040 | 0.003 ± 0.002 | 27 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| Bahia Salado, Chile | 6 | 0.82 ± 0.06 | 0.001 ± 0.001 | 15 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| Bahia Salado, Chile | 4 | 0.81 ± 0.13 | 0.002 ± 0.002 | 7 | 770 | Alvarez-Varas et al 2017 |

New mtDNA Control Region haplotypes of the green turtle *Chelonia mydas* from north and central Peruvian coasts

Jackeline Ruiz¹ y Giovanna Sotil².

¹Universidad Científica del Sur, Carrera de Biología Marina, Lima, Perú

²Instituto del Mar del Perú, Laboratorio de Genética Molecular, Lima, Perú

Corresponding author email: mendoza_jackie@hotmail.com

Abstract

The green turtle *Chelonia mydas* is an endangered species according to the IUCN Red List, so knowledge about its biology contributes to the conservation strategies success. Using mitochondrial DNA control region sequences, we evaluated the haplotype composition and infer the natal origin of 196 green turtles sampled in Virrila estuary (VE) and Paracas bay (PB), from Peruvian coasts, during 2015 and 2016. A total of twenty haplotypes were found, of which twelve were tracked to the main eastern Pacific populations, five were considered orphans and three were new. The most frequent haplotypes were CmP4.6, CmP4.1 and CmP4.7. Haplotype CmP4.6 has been previously described as a the most common to Galapagos management unit (MU), whereas CmP4.1 has been reported as common to the eastern Pacific MUs. CmP4.7 have been considered as endemic to Galapagos MU. The three new haplotypes (CmP246.1, CmP4.18 and CmP4.21) were identified in individuals from VE, with a low frequency (0.7%). Parsimony statistical network showed new haplotypes were closely related to CmP4.6 and CmP4.7, suggesting their natal origin may be located within the eastern Pacific. High haplotype diversity was observed in VE (0.74) and PB (0.83), comparable to several foraging zones from both Pacific and Atlantic Ocean. The presence of new haplotypes in foraging zones highlights the importance of continuing with genetic surveys in nesting grounds in order to completely record regional haplotypes. High haplotype diversity and multiple origin haplotypes found in this study provide a genetic evidence for Peruvian inshore habitats connection, with several nesting colonies from the region, particularly for the Galapagos MU.

Introduction

The green turtle *Chelonia mydas* is worldwide distributed along tropical and subtropical waters among Pacific, Indian and Atlantic Oceans (Hasbun et al. 1998). Its life cycle includes periods of residency in nesting, foraging and development areas. After hatching, turtles return to the sea and remain in pelagic habitats where they drift through the currents. This life cycle period is known as "the lost years" since there is no migration patterns information given the difficulty to track individuals (Dethmers et al. 2006). When turtles increase in size, they get less susceptible to predators and move to neritic areas and stay in these foraging grounds. By the time males and females reach sexual maturity, they return to their natal rookery (the nesting colony where they hatched) to breed; this behavior in breeding adults, named philopatry (also referred as natal homing), is one of the reasons of genetically isolated rookeries, due to a restricted genetic flow (Allard et al. 1994; Lohmann et al. 2013).

Several studies based on mitochondrial DNA (mtDNA) sequences analysis have been carried out in green turtles from nesting sites. According to the mtDNA Control Region (CR) sequences analysis, well-delimited *C. mydas* management units (MUs) were established in the central eastern Pacific Ocean (Dutton et al. 2014; Chaves et al. 2017). Dutton et al. (2014) studied individuals from eight nesting colonies (n=545) and found significant genetic differences between geographically distant rookeries, resulting in five distinguishable genetic stocks (Northwestern Hawaiian Islands, Revillagigedo, Michoacan, Costa Rica and Galapagos). Similarly, Chaves et al. (2017) analyzed 133 specimens from two Ecuadorian rookeries (Galapagos Island and Machalilla National Park) and concluded that, although both localities are separated by roughly 1000 km, they compose a single genetic unit (the Galapagos MU). On the other hand, less effort has been given on genetic studies in foraging grounds (Bjorndal 1999), which are important to consider because they provide insights of migration routes for conservation purposes (Bowen 1995).

Also, genetic studies of green turtles from foraging areas in the Pacific (Read et al. 2015; Ng et al. 2017; Jones et al. 2018; Piovano et al. 2019) and Atlantic Oceans (Luke et al. 2004; Bass et al. 2006; Costa et al. 2017; Hancock et al. 2019), have being done based on CR analysis. They commonly show a high haplotype diversity with multiple haplotype origins, due to the

individual's aggregation from different cohorts and rookeries (Bass et al. 2006). Furthermore, in the southeast Pacific, have being noted that green turtles from Galapagos, one of the main regional nesting population, use considerably inshore habitats of South America as their feeding areas, including Chilean, Ecuadorian, and Colombian coasts (Amorocho et al. 2012; Veliz et al. 2014 Alvarez-Varas et al. 2017; Chaves et al. 2017). Therefore, we could expect that *C. mydas* aggregations from Peruvian coast could also present haplotypes that can be tracked to different natal origins and show high haplotype diversities.

In particular, the Peruvian neritic habitats are considered important foraging grounds for adult and juvenile green turtles (Velez-Zuazo et al. 2014). Studies in Peru have been carried out with feeding ecology and demography approaches through bycatch or directed capture (Santillan 2008; Rosales et al. 2010; Quiñones et al. 2015). Conversely, genetic approach has been applied to a lesser extent. Recent observations indicated that different mtDNA lineages could be found in Peru (Álvarez-Varas et al. 2020), but a more exhaustive sampling is required.

Moreover, two localities have been suggested to host important *C. mydas* aggregations based on considerable residency times and healthy individuals (Velez-Zuazo et al. 2014; Paredes 2017). One of these sites is the only recognized Peruvian estuary located in the north coast (Virrila estuary, VE), and the other is one of the most important natural protected areas from the central south of the country (Paracas bay, PB).

In this sense, we evaluated the genetic composition and natal origin of *C. mydas* from VE and PB, collected in 2015 and 2016, based on the analysis of the standard 5-end CR sequences established for the green turtle genetic studies.

Materials and methods

Sample collection

Juvenile and adult green turtles were captured with fishing nets, in the north (VE, 05°48`S, 80°51`W) and central south (PB, 13°49`S 76°16`W) of the Peruvian coast (Fig. 1), in 2015 and 2016. Approximately 2-3 mm³ of skin and muscle tissues were collected from neck or shoulders of each specimen and stored in 2 mL tubes contained salt or dimethyl sulfoxide (DMSO) solution saturated with NaCl. In total, 196 samples were collected, 135 from VE and 61 from PB.

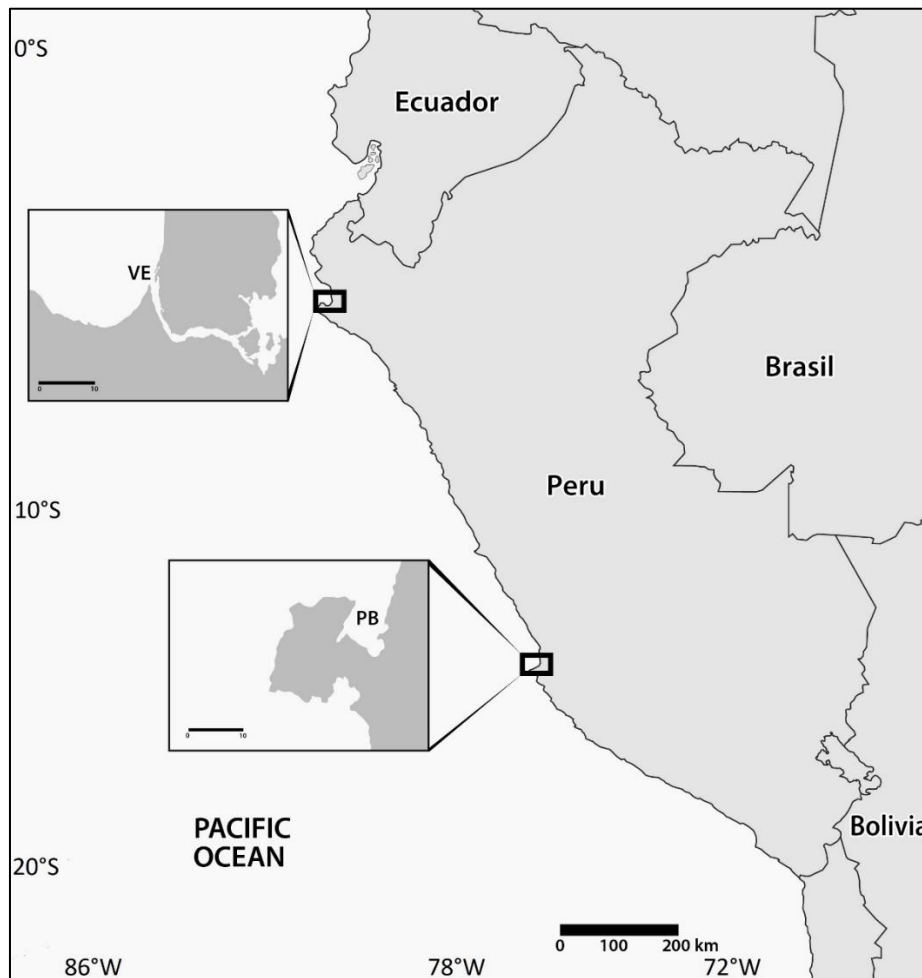


Fig. 1 Sampling locations. Virrila estuary (VE) and Paracas bay (PB). Both sites are separated by about 1200 km

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Total DNA was extracted using the CTAB method (Sambrook et al. 1989), DNA was precipitated with ethanol and resuspended in purified water. All DNA extractions were evaluated quantitatively and qualitatively using NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), and electrophoresis in 1% agarose gel stained with GelRed, respectively. The CR segment was amplified using primers LCM-15382 (5' GCTTAACCCTAAAGCATTGG 3') and H950g (5' GTCTCGGATTTAGGGGTTTG 3') (Abreu-Grobois et al. 2006). PCR reaction was done in 10 μ l total volume, considering a final concentration of 1X PCR master mix solution (Qiagen), 0.3 μ M of primers, and 10 ng/ μ l of DNA template. Amplifications of approximately 800 base pair (bp) segment of the 5-end CR, were done in a thermocycler Proflex (Applied Biosystems), starting

with an initial denaturation of 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 51°C for 40 s, extension at 72°C for 1 min, and a final extension step of 7 min at 72°C. Amplified products were evaluated in 1% agarose electrophoresis gels, and those with the expected size were purified using Accuprep kit with final concentration of 20 ng/μl. Both strands of DNA products were sequenced using a Genetic Analyzer ABI 3500.

Data analysis

Electropherograms were edited using the program FinchTV1.4.0 (Geospiza Research Team) and consensus sequences were obtained of each specimen. All sequences obtained were aligned and trimmed to 770bp with the CLUSTAL W algorithm implemented in BioEdit 7.2.6 (Hall 1999). Haplotype data was generated using DnaSP (Librado and Rozas 2009).

In order to identify haplotypes, they were blasted in GenBank database. When a new haplotype was identified, all the process was repeated twice for each sample from DNA extraction to sequencing. Finally, new sequences were reported to NOAA database and then we consulted to a local reference library for haplotype code assignation.

Haplotype (h) and nucleotide (π) diversity were calculated assuming Tamura-Nei model (Tamura and Nei 1993) using the software Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier and Lischer 2010). In order to represent the haplotypes genealogies, the program TCS v.1.21 (Clement et al. 2000) was used, which applies statistical parsimony algorithm to construct a minimum spanning network (Templeton et al. 1992)

Results

In total 20 haplotypes were identified, of these 17 were previously reported. VE and PB were composed by 16 and 13 haplotypes respectively. Three new haplotypes were found in VE. Haplotype CmP4.6 showed the highest frequency in both localities (39.3% in VE and 32.8% in PB) followed by CmP4.1 (24.4% in VE and 21.3% in PB) and CmP4.7 (21.5% in VE and 14.8% in PB). Haplotypes CmP4.8 (1.6%) CmP4.9 (6.6%) CmP4.17 (1.6%) and CmP5.1 (1.6%) were only founded in PB, while haplotypes CmP24.1 (1.5%), CmP8.3 (0.7%), CmP15.1 (1.5%) and CmP4.12 (0.7%) were private to VE. On the other hand, the lowest frequency (0.7%) haplotypes for VE were CmP4.12, CmP8.1, CmP8.3, CmP17.1, CmP92.1, CmP97.1 and the

three new haplotypes (CmP246.1, CmP4.18 and CmP4.21), whereas CmP4.8, CmP4.17, CmP5.1, CmP92.1 and CmP93.2 presented the lowest frequency (1.6%) for PB. A detailed haplotypes list is provided in Table 1.

Of the 20 haplotypes found over 196 samples, 61 polymorphic sites were identified, which 44 were transitions and two transversions. Moreover, indel mutations were observed in three haplotypes; CmP93.2 and CmP246.1 presented an eight-base insertion, while CmP97.1 showed a four-base deletion (Table 2). Haplotype diversity was 0.7430 and 0.8262, while nucleotide diversity was 0.0014 and 0.0025 for VE and PB respectively (Table 3).

The network showed a star-like structure with three dominating central haplotypes (CmP4.6, CmP4.1 and CmP4.7) surrounding by several haplotypes showing low frequencies. Most of the haplotypes were closely linked to each other by one or two mutational steps; except for CmP93.2 which differed on eight mutational steps from CmP4.6 and CmP97.1 that displayed 36 mutational steps from CmP4.1. Private haplotypes of PB (CmP4.9 and CmP4.17) and VE (CmP24.1, CmP4.12 and CmP15.1) were closely related to CmP4.6 by a single mutational step. Likewise, Paracas unique haplotype CmP4.8 was linked to CmP4.1. On the other hand, VE private haplotype CmP8.3 and PB private haplotype CmP5.1 were related to CmP4.1 through one and two hypothetical haplotypes respectively. The new haplotypes CmP4.18 and CmP4.21 were closely related to CmP4.9 and CmP4.7 respectively, differing in only one mutational step; whereas the new haplotype CmP246.1 differed in nine steps from CmP4.6 (Fig. 2).

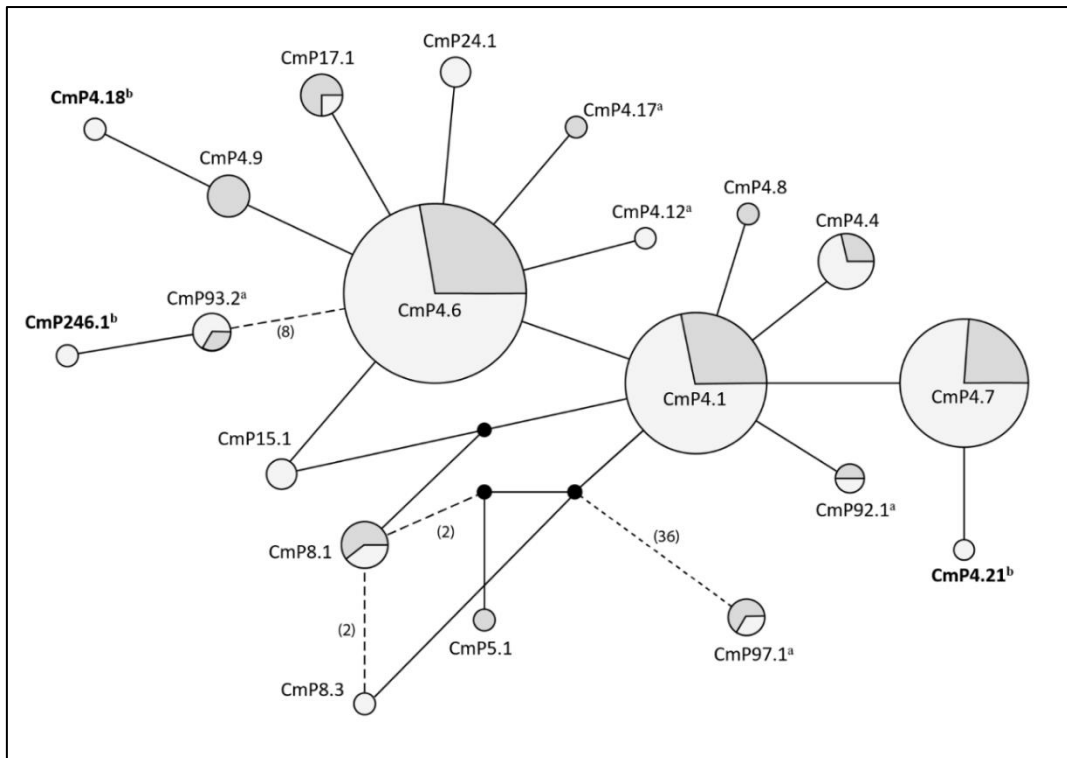


Fig. 2 Minimum-spanning haplotype network. Different colors indicate sampling locations: Virrila estuary (light grey) and Paracas bay (dark grey). Circle size is proportional to haplotype frequency. Lines represents one base pair mutation; exceptions are specified in parentheses. Black circles show hypothetical haplotype. ^aOrphan haplotype; ^bNew haplotype (bold).

Discussion / Conclusion

Genetic diversity

High haplotype diversity was observed in VE (0.74) and PB (0.83), comparable to several foraging zones from both Pacific and Atlantic Ocean (Luke et al. 2004; Bass et al. 2006; Naro-Maciel et al. 2007; Nishizawa et al. 2010; Joseph et al. 2016; Chaves et al. 2017; Jones et al. 2018) and even superior to some localities (Bass and Witzell 2000; Luke et al. 2004; Naro-Maciel et al. 2007; Dutton et al. 2008; Amorocho et al. 2012; Jones et al. 2018). A high haplotype diversity seems to be common in foraging areas where individuals from different cohorts and nesting populations converge (Bass and Witzell 2000; Bass et al. 2006). Conversely, a low haplotype diversity has been found in foraging grounds that are used by a single population, such as Hawaiian feeding zones (Dutton et al. 2008). On the other hand, nucleotide diversity estimated here (VE: 0.002 and PB: 0.004) was similar to Pacific rookeries

(Dutton et al. 2014) and other foraging grounds (Nishizawa et al. 2010; Joseph et al. 2016; Chaves et al. 2017), except for some *C. mydas* aggregations reported in Australia, Ecuador and Colombia (Amarocho et al. 2012; Jones et al. 2018; Chaves et al. 2017). In the case of Colombia, which was the only study that interpreted these findings, a high nucleotide diversity was attributed to haplotypes originated from a broad geographic range (Amarocho et al. 2012).

Natal origin

Both VE and PB showed endemic haplotypes from three of the four eastern Pacific MUs (Galapagos, Costa Rica, Michoacan and Revillagigedo). Haplotypes CmP4.4, CmP4.7, CmP4.9, CmP15.1, CmP17.1 and CmP24.1 have been described as endemic to Galapagos, being CmP4.7 the most common for this MU (Chaves et al. 2017; Dutton et al. 2014). Haplotype CmP8.3 have been reported exclusively in Costa Rica; while CmP5.1 and CmP4.8 have been described as endemic to Michoacán. We also observed rookery-shared haplotypes that included the widespread and dominant CmP4.6 and Cmp4.1, and the low-frequency haplotype CmP8.1 (Dutton et al. 2014; Chaves et al. 2017). Haplotype Cmp4.1 has been observed at high frequency in Michoacan and to a lesser extent in Galapagos and Revillagigedo, whereas in Costa Rica occurred at low frequency. On the other hand, CmP4.6 has been described as dominant in Galapagos MU and it has also been observed at less frequency in Costa Rica and Michoacan; whereas no record exist in Revillagigedo. Haplotype CmP8.1 has been reported in Michoacán and Costa Rica rookeries (Dutton et al. 2014; Chaves et al. 2017).

In this study, two of the three predominates haplotypes (CmP4.6 and CmP4.7) were closely linked to Galapagos MU. Cmp4.7 have been reported as endemic, and CmP4.6 occurs at high frequency in this MU (Dutton et al. 2014; Chaves et al. 2017). South America foraging grounds, including Peruvian neritic habitats, seems to have a greater contribution from Galapagos MU than other eastern Pacific rookeries. For example this have been observed for Chilean, Ecuadorian and Columbian foraging grounds either by Mixed Stock Analysis (MSA) or inferences (Amarocho et al. 2012; Chaves et al. 2017; Alvarez-Varas et al. 2017; Veliz et al. 2014). Additionally, no haplotype from Hawaii rookeries was observed in VE or PB. Hawaiian haplotypes have not been observed in eastern Pacific foraging areas, except for Revillagigedo (Amarocho et al. 2012; Chaves et al. 2017; Álvarez et al. 2017). Geographical isolation and

oceanographic barriers have been proposed as the possible causes to the restricted dispersal of Hawaiian haplotypes (Dutton et al. 2008).

The natal rookery of five haplotypes (CmP97.1, CmP4.17, CmP92.1, CmP93.2 and CmP4.12) were not possible to infer, due to no records of them were found at any nesting colony studied so far. These orphan haplotypes, excluding CmP4.12, have been previously observed in foraging grounds of Palmyra atoll (Central Pacific), San Diego (USA), Gorgona (Colombia), Galapagos Islands and Machalilla (mainland Ecuador) (Naro-Maciel et al. 2014; Chaves et al. 2017; Dutton et al. 2019). CmP4.12 record was only found in the GenBank database. Bass et al. (2006) and Chaves et al. (2017) suggested that orphan haplotypes could indicate there are unidentified rookeries or that sample sizes in the studied nesting areas were not enough to detect rare haplotypes. It is possible that three of the orphan haplotypes (CmP4.17, CmP4.12 and CmP92.1) reported here, have their natal origin in the eastern Pacific surroundings because they were closely related to the main regional haplotypes (Cmp4.6 and Cmp4.1). Even though CmP93.2 showed more mutational steps from predominant eastern Pacific haplotypes, it was closely related to CmP93.1 which have been described as endemic to Galapagos, (Chaves et al. 2017). Similarly, we suggest that the new orphan haplotypes reported in VE (CmP246.1, CmP4.18 and CmP4.21) may come from eastern Pacific rookeries since they differ in few mutational steps from CmP4.6 and CmP4.7, which have been described within the eastern Pacific genetic clades (Dutton et al. 2014). The presence of new haplotypes in foraging zones highlights the importance of continuing with genetic surveys in new and previously surveyed nesting grounds in order to completely record regional haplotypes. On the other hand, our network showed that the orphan haplotype CmP97.1 differs in several mutational steps from CmP4.6 and Cmp4.1 which may indicate that their natal origin would be located in more distant regions than the others new and orphan haplotypes, since a higher sequence divergence is expected between geographically distant populations (Amarocho et al. 2012). Furthermore, Alvarez-Varas et al. (2020) included haplotype CmP97.1 within south-central/western Pacific genetic lineage.

Peruvian coasts have been suggested to be important foraging grounds for *C. mydas*, based on high bycatch rates (Alfaro-Shigueto et al. 2011) and long residency times (Velez-Zuazo et al.

2014). Optimal environmental conditions could be one of the reasons of such aggregations in Peruvian habitats, since a high growth rates and body condition index have been reported (Velez-Zuazo et al. 2014; Paredes 2017) and also due to a high variety of food resources which are exploited by green turtles (Santillan 2008; Jimenez et al. 2017). Likewise demographic and feeding ecology studies, but from a genetic perspective, we support that Peruvian coast is a relevant component of the species habitats network in the eastern Pacific, due to a high number of shared and endemic haplotypes from the regional MUs (Galapagos, Costa Rica, Michoacan and Revillagigedo) were found. These findings indicate a connection between Peruvian coastal habitats and several rookeries. Defining foraging areas used by nesting populations, has undoubted utility in conservation, because it allows to cover factors occurring far from nesting sites, but influencing population dynamic (Seminoff et al. 2008 and Jones et al. 2018). In this sense, it will be important that future studies establish MUs contribution to the mixed stock aggregation occurring in Peru, in order to determine a more specific link, and eventually assess how natural and anthropogenic conditions in Peruvian coast, could affect related MUs.

The present study contributed to the species knowledge by generating haplotype data for Peruvian coast. Both VE and PB were characterized by high haplotype diversity and multiple origin haplotypes, providing a genetic evidence for Peruvian inshore habitats connection, with several nesting colonies from the region, particularly for the Galapagos MU. The three new haplotypes identified were closely related to common haplotypes from the eastern Pacific populations and endemics to the Galapagos MU, indicating that their natal origin would be located in the eastern Pacific surroundings.

Declarations

Funding

Instituto del Mar del Perú (IMARPE)

Ethical Standards

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Acknowledgments

We would like to thank the valuable contributions of Depredadores Superiores from Instituto del mar del Perú (IMARPE) for their help in sample collection.

Tables

Table 1. Green turtle haplotype frequencies from Paracas bay and Virrila estuary. Number of individuals (N). The accession numbers registered in the GenBank are indicated.

| Haplotype | Location | | | | GenBank Accession Number | Reference |
|-----------------------|----------|------|---------|------|--------------------------------|---|
| | Paracas | | Virrila | | | |
| | N | % | N | % | | |
| CmP4.1 | 13 | 21.3 | 33 | 24.4 | KC306666 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP4.4 | 2 | 3.3 | 5 | 3.7 | KC306665 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP4.6 | 20 | 32.8 | 53 | 39.3 | KC306647 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP4.7 | 9 | 14.8 | 29 | 21.5 | KC306660 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP4.8 | 1 | 1.6 | - | 0 | KC306663 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP4.9 | 4 | 6.6 | - | 0 | KC306643 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP4.12 ^a | - | 0 | 1 | 0.7 | KX499512 | <i>Heidemeyer et al. (unpublished data)</i> |
| CmP4.17 ^a | 1 | 1.6 | - | 0 | MK111422 | <i>Dutton et al. 2018</i> |
| CmP5.1 | 1 | 1.6 | - | 0 | KC306651 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP8.1 | 3 | 4.9 | 1 | 0.7 | KC306659 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP8.3 | - | 0 | 1 | 0.7 | KC771270 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP15.1 | - | 0 | 2 | 1.5 | KC306649 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP17.1 | 3 | 4.9 | 1 | 0.7 | KC306648 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP24.1 | - | 0 | 2 | 1.5 | KC306646 | <i>Dutton et al. 2014</i> |
| CmP92.1 ^a | 1 | 1.6 | 1 | 0.7 | FJ917195 | <i>Dutton et al. (unpublished data)</i> |
| CmP93.2 ^a | 1 | 1.6 | 2 | 1.5 | KY350180 | <i>Chaves et al 2017</i> |
| CmP97.1 ^a | 2 | 3.3 | 1 | 0.7 | FJ917198 | <i>Dutton et al. (unpublished data)</i> |
| CmP246.1 ^b | - | 0 | 1 | 0.7 | | This study |
| CmP4.18 ^b | - | 0 | 1 | 0.7 | | This study |
| CmP4.21 ^b | - | 0 | 1 | 0.7 | | This study |
| Total | 61 | 100 | 135 | 100 | | |

^aOrphan haplotypes ^bNew haplotypes

Table 3. Monthly and total estimates of haplotype (h) and nucleotide (π) diversity for Virrila and Paracas green turtle aggregations. Number of samples (n), number of haplotypes (H), standard deviation (SD).

| | Virrila | | | | | Total | Paracas |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 2015 | | | 2016 | | | |
| | March | July | October | April | August | | |
| n | 29 | 30 | 30 | 19 | 27 | 135 | 61 |
| H | 6 | 8 | 7 | 4 | 6 | 16 | 13 |
| h | 0.7783 | 0.8161 | 0.7517 | 0.6895 | 0.6809 | 0.7430 | 0.8262 |
| SD | 0.0400 | 0.0385 | 0.0487 | 0.0596 | 0.0753 | 0.0223 | 0.0310 |
| π | 0.02546 | 0.02553 | 0.02669 | 0.01862 | 0.07622 | 0.00206 | 0.00445 |
| | 4 | 9 | 4 | 9 | 4 | 9 | 1 |
| SD | 0.01835 | 0.01767 | 0.01897 | 0.01493 | 0.04372 | 0.00136 | 0.00254 |
| | 2 | 3 | 5 | 7 | 9 | 0 | 8 |
| Unique H | 2 | 2 | 3 | 0 | 3 | 7 | 4 |
| New H | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 |

Supplementary material

Online Resource Table 1. Haplotype composition for Virrila estuary and Paracas bay, compare with rookeries among eastern and central Pacific. Machalilla National Park (MNP) (Chaves et al. 2017); Galapagos, Costa Rica, Michoacan and Revillagigedo (Dutton et al. 2014).

| Haplotypes | Rookeries | | | | Foraging grounds in Peru | |
|-----------------------|-----------|------------|-----------|---------------|--------------------------|---------|
| | Galapagos | Costa Rica | Michoacán | Revillagigedo | Virrila | Paracas |
| CmP4.1 | 26 | 2 | 58 | 13 | 33 | 13 |
| CmP4.4 | 6 | - | - | - | 5 | 2 |
| CmP4.6 | 51 | 7 | 7 | - | 53 | 20 |
| CmP4.7 | 31 | - | - | - | 29 | 9 |
| CmP4.8 | - | - | 5 | - | - | 1 |
| CmP4.9 | 1 | - | - | - | - | 4 |
| CmP5.1 | - | - | 43 | - | - | 1 |
| CmP8.1 | - | 3 | 1 | - | 1 | 3 |
| CmP8.3 | - | 5 | - | - | 1 | - |
| CmP15.1 | 3 | - | - | - | 2 | 1 |
| CmP17.1 | 4 | - | - | - | 1 | 3 |
| CmP24.1 | 1 | - | - | - | 2 | - |
| CmP4.12 ^a | - | - | - | - | 1 | - |
| CmP4.17 ^a | - | - | - | - | - | 1 |
| CmP92.1 ^a | - | - | - | - | 1 | 1 |
| CmP93.2 ^a | - | - | - | - | 2 | 1 |
| CmP97.1 ^a | - | - | - | - | 1 | 2 |
| CmP246.1 ^b | - | - | - | - | 1 | - |
| CmP4.18 ^b | - | - | - | - | 1 | - |
| CmP4.21 ^b | - | - | - | - | 1 | - |

^aOrphan haplotypes ^bNew haplotypes

Online Resource Table 2. Number of individuals (N) per haplotype of Virrila and Paracas green turtle aggregations. Number of haplotypes (H).

| Haplotype | Virrila | | | | | | Paracas |
|-----------|---------|------|---------|-------|--------|-----|---------|
| | 2015 | | | 2016 | | | |
| | March | July | October | April | August | | |
| CmP4.1 | 7 | 7 | 7 | 8 | 4 | 33 | 13 |
| CmP4.4 | 3 | 2 | - | - | - | 5 | 2 |
| CmP4.6 | 10 | 9 | 12 | 8 | 14 | 53 | 20 |
| CmP4.7 | 7 | 7 | 7 | 2 | 6 | 29 | 9 |
| CmP4.8 | - | - | - | - | - | - | 1 |
| CmP4.9 | - | - | - | - | - | - | 4 |
| CmP4.12 | 1 | - | - | - | - | 1 | - |
| CmP4.17 | - | - | - | - | - | - | 1 |
| CmP5.1 | - | - | - | - | - | - | 1 |
| CmP8.1 | - | - | - | - | 1 | 1 | 3 |
| CmP8.3 | - | - | - | - | 1 | 1 | - |
| CmP15.1 | - | 1 | 1 | - | - | 2 | - |
| CmP17.1 | 1 | - | - | - | - | 1 | 3 |
| CmP24.1 | - | 1 | - | 1 | - | 2 | - |
| CmP92.1 | - | - | 1 | - | - | 1 | 1 |
| CmP93.2 | - | 2 | - | - | - | 2 | 1 |
| CmP97.1 | - | - | - | - | 1 | 1 | 2 |
| CmP246.1 | - | 1 | - | - | - | 1 | . |
| CmP4.18 | - | - | 1 | - | - | 1 | . |
| CmP4.21 | - | - | 1 | - | - | 1 | . |
| N | 29 | 30 | 30 | 19 | 27 | 135 | 61 |
| H | 6 | 8 | 7 | 4 | 6 | 16 | 13 |

Online Resource Table 3. Comparison of genetic diversity between Peruvian foraging aggregations and others Pacific and Atlantic foraging grounds. Number of haplotypes (H), haplotype (h) and nucleotide (π) diversity, standard deviation (SD), number of samples (N) and marker size in base pair (bp).

| <i>Localities</i> | H | $h \pm SD$ | $\pi \pm SD$ | N | bp | <i>Reference</i> |
|-----------------------------|----|-------------------|-------------------|-----|-----|------------------------------|
| <i>Atlantic</i> | | | | | | |
| North Carolina, USA | 8 | 0.68 ± 0.031 | 0.005 ± 0.003 | 106 | 510 | Bass et al. 2006 |
| Florida, USA | 6 | 0.49 ± 0.067 | 0.003 ± 0.002 | 62 | 510 | Bass and Witzell 2000 |
| Bahamas, Caribbean | 6 | 0.61 ± 0.002 | 0.006 ± 0.003 | 79 | 480 | Lahanas et al. 1998 |
| Barbados, Caribbean | 8 | 0.77 ± 0.028 | 0.010 ± 0.006 | 60 | 488 | Luke et al. 2004 |
| Santa Marta, Colombia | 3 | 0.73 ± 0.096 | 0.004 ± 0.002 | 13 | 781 | Vasquez-Carrillo et al. 2020 |
| La Guajira, Colombia | 7 | 0.75 ± 0.070 | 0.007 ± 0.001 | 30 | 781 | Vasquez-Carrillo et al. 2020 |
| Sao Tome and Principe | 7 | 0.55 ± 0.080 | 0.002 ± 0.003 | 43 | 490 | Hancock et al. 2019 |
| Noronha, Brazil | 6 | 0.73 ± 0.030 | 0.002 ± 0.002 | 32 | 480 | Bjorndal et al. 2006 |
| Almofala, Brazil | 13 | 0.72 ± 0.030 | 0.007 ± 0.004 | 117 | 486 | Naro-Maciel et al. 2007 |
| Ubatuba, Brazil | 10 | 0.45 ± 0.056 | 0.002 ± 0.002 | 113 | 486 | Naro-Maciel et al. 2007 |
| Arvoredo Island, Brazil | 8 | 0.56 ± 0.070 | 0.003 ± 0.001 | 49 | 490 | Proietti et al. 2009 |
| <i>Western Pacific</i> | | | | | | |
| Yaeyama Islands, Japan | 24 | 0.84 ± 0.0220 | 0.033 ± 0.018 | 142 | 380 | Nishizawa et al. 2013 |
| Palmyra Atoll, USA | 19 | 0.62 ± 0.0230 | 0.009 ± 0.005 | 349 | 384 | Naro-Maciel et al. 2014 |
| Brunei Bay, Malaysia | 12 | 0.84 ± 0.040 | 0.009 ± 0.005 | 42 | 770 | Joseph et al. 2016 |
| Cockle Bay, Australia | 10 | 0.46 ± 0.069 | 0.014 ± 0.007 | 74 | 770 | Jones et al. 2018 |
| Green Island, Australia | 12 | 0.55 ± 0.077 | 0.012 ± 0.006 | 57 | 770 | Jones et al. 2018 |
| Low Isles, Australia | 26 | 0.70 ± 0.040 | 0.019 ± 0.010 | 147 | 770 | Jones et al. 2018 |
| <i>Eastern Pacific</i> | | | | | | |
| Hawaii, USA | 6 | 0.46 ± 0.018 | 0.003 ± 0.002 | 788 | 384 | Dutton et al. 2008 |
| Baja California Sur, Mexico | 8 | 0.73 ± 0.043 | 0.002 ± 0.001 | 52 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| Matapalito, Costa Rica | 11 | 0.80 ± 0.053 | 0.003 ± 0.002 | 32 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| Gorgona, Colombia | 23 | 0.79 ± 0.012 | 0.007 ± 0.003 | 176 | 770 | Correa-Cárdenas et al. 2013 |
| Gorgona, Colombia | 7 | 0.30 ± 0.080 | 0.011 ± 0.006 | 55 | 384 | Amorochio et al. 2012 |
| Machalilla, Ecuador | 8 | 0.73 ± 0.051 | 0.002 ± 0.002 | 41 | 770 | Chaves et al. 2017 |
| Machalilla, Ecuador | 10 | 0.75 ± 0.051 | 0.004 ± 0.003 | 43 | 770 | Chaves et al. 2017 |
| Galapagos, Ecuador | 11 | 0.83 ± 0.023 | 0.013 ± 0.007 | 61 | 770 | Chaves et al. 2017 |
| Galapagos, Ecuador | 9 | 0.77 ± 0.031 | 0.002 ± 0.001 | 49 | 770 | Chaves et al. 2017 |
| Galapagos, Ecuador | 10 | 0.78 ± 0.032 | 0.002 ± 0.001 | 54 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| San Jose, Peru | 3 | 0.66 ± 0.072 | 0.001 ± 0.001 | 14 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| Virriala, Peru | 16 | 0.74 ± 0.022 | 0.002 ± 0.001 | 135 | 770 | This study |
| Paracas, Peru | 13 | 0.83 ± 0.031 | 0.004 ± 0.003 | 61 | 770 | This study |
| Arica, Chile | 9 | 0.86 ± 0.040 | 0.003 ± 0.002 | 27 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| Bahia Salado, Chile | 6 | 0.82 ± 0.06 | 0.001 ± 0.001 | 15 | 765 | Álvarez-Varas et al. 2020 |
| Bahia Salado, Chile | 4 | 0.81 ± 0.13 | 0.002 ± 0.002 | 7 | 770 | Alvarez-Varas et al 2017 |

Referencias Bibliográficas

- Abreu-Grobois FA, Horrocks JA, Formia A, Dutton PH, LeRoux RA, Velez-Zuazo X, Soares L, Meylan AB (2006) New mtDNA D-loop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution of mixed stock analysis. In: Frick M, Panagopoulous A, Rees AF, Williams K (eds) Proceedings of the 26th annual symposium on sea turtle biology. International Sea Turtle Society, Athens, Greece, p 179
- Alfaro-Shigueto J, Mangel JC, Bernedo F, Dutton PH, Seminoff JA, Godley BJ (2011) Small-scale fisheries of Peru: a major sink for marine turtles in the Pacific. *J Appl Ecol* 48(6): 1432 - 1440. doi: 10.1111/j.1365-2664.2011.02040.x
- Allard MW, Miyamoto MM, Bjorndal KA, Bolten AB, Bowen BW (1994) Support for natal homing in green turtles from mitochondrial DNA sequences. *Copeia* 1994: 34-41. doi: 10.2307/1446668
- Álvarez-Varas R, Contardo J, Heidemeyer M et al (2017) Ecology, health and genetic characterization of the southernmost green turtle (*Chelonia mydas*) aggregation in the Eastern Pacific: implications for local conservation strategies. *Lat Am J Aquat Res* 45(3): 540-554. doi: 10.3856/vol45-issue3-fulltext-4
- Álvarez-Varas R, Heidemeyer M, Riginos C et al (2020) Integrating morphological and genetic data at different spatial scales in a cosmopolitan marine turtle species: challenges for management and conservation. *Zool J Linn Soc-lond*. doi: 10.1093/zoolinnean/zlaa066
- Amoroch 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
- Bass AL, Witzell WN (2000) Demographic Composition of Immature Green Turtles (*Chelonia mydas*) from the East Central Florida Coast: Evidence from mtDNA Markers. *Herpetologica* 56(3): 357–367. doi: 10.2307/3893412
- Bass AL, Epperly SP, Braun-McNeill J (2006) Green Turtle (*Chelonia mydas*) Foraging and Nesting Aggregations in the Caribbean and Atlantic: Impact of Currents and Behavior on Dispersal. *J Hered* 97(4): 346–354. doi: 10.1093/jhered/esl004

- Bjorndal KA (1999) Priorities for research in foraging habitats. In: Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois FA, Donnelly M (eds.) Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles, No 4. Blanchard, Pennsylvania, pp 12–18
- Bjorndal KA, Bolten AB, Moreira L, Bellini C, Marcovaldi MÂ (2006) Population structure and diversity of Brazilian green turtle rookeries based on mitochondrial DNA sequences. *Chelonian Conserv Biol*, 5: 262-268. doi: 10.2744/1071-8443(2006)5[262:psadob]2.0.co;2
- Bowen BW (1995) Tracking marine turtles with genetic markers. *Bioscience* 45(8): 528-534. doi: 10.2307/1312697
- Chaves J, Heidemeyer M, Vallejo F (2017) Connectivity, population structure, and conservation of Ecuadorian green sea turtles. *Endanger Species Res* 32: 251–264. doi: 10.3354/esr00809
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9(10): 1657-1660. doi: 10.1046/j.1365294x.2000.01020.x
- Costa J, Bondioli ACV, Almeida-Toledo LF et al (2017) Mixed-stock analysis in green turtles *Chelonia mydas*: MtDNA decipher current connections among west Atlantic populations. *Mitochondrial DNA A* 28(2): 197–207. doi: 10.3109/19401736.2015.1115843
- Correa-Cárdenas CA (2012) Spatial-temporal analyses of Eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas/Chelonia agassizii*) foraging as mixed stock in Gorgona NNP, Colombian Pacific Ocean (Master's thesis, Bogotá-Uniandes).
- Dethmers KEM, Broderick D, Moritz C, Fitzsimmons NN, Limpus CJ, Lavery S, Kennett R (2006) The genetic structure of Australasian green turtles (*Chelonia mydas*): Exploring the geographical scale of genetic exchange. *Mol Ecol* 15(13): 3931–3946. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03070.x
- Dutton PH, Balazs GH, LeRoux RA, Murakawa SK, Zarate P, Martínez LS (2008) Composition of Hawaiian green turtle foraging aggregations: mtDNA evidence for a distinct regional population. *Endanger Species Res* 5(1): 37-44. doi: 10.3354/esr00101

Dutton PH, Jensen MP, Frey A et al (2014) Population structure and phylogeography reveal pathways of colonization by a migratory marine reptile (*Chelonia mydas*) in the central and eastern Pacific. *Ecol Evol* 4(22): 4317–4331. doi: 10.1002/ece3.1269

Dutton PH, LeRoux R, LaCasella E, Jeffrey A, Seminoff, Tomoharu E (2019) Genetic analysis and satellite tracking reveal origin of the green turtles in San Diego Bay. *Mar Biol* 166(1): 3. doi: 10.1007/s00227-018-3446-4

Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite vs 3.5: A new series of 489 programs to perform population genetics analyses under Linux and 490 Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564-567.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT (Version 7.2.5.0).

Hasbun CR, Lawrence AJ, Naldo J, Samour JH, Al-Ghais SM (1998) Normal blood chemistry of free-living green sea turtles, *Chelonia mydas*, from the United Arab Emirates. *Comp Haematol Int* 8(3): 174-177. doi: 10.1007/BF02642510

Hancock JM, Vieira S, Taraveira L et al (2019) Genetic characterization of green turtles (*Chelonia mydas*) from São Tomé and Príncipe: Insights on species recruitment and dispersal in the Gulf of Guinea. *J Exp Mar Biol Ecol* 518: 151181. doi: 10.1016/j.jembe.2019.151181

Jimenez A, Pingo S, Alfaro J, Mangel J, Hooker Y (2017) Feeding ecology of the green turtle *Chelonia mydas* in northern Peru. *Lat Am J Aquat Res* 45(3): 585–596. doi: 10.3856/vol45-issue3-fulltext-8

Jones K, Jensen M, Burgess G et al (2018) Closing the gap: mixed stock analysis of three foraging populations of green turtles (*Chelonia mydas*) on the Great Barrier Reef. *PeerJ* 6: e5651. doi: 10.7717/peerj.5651

Joseph J, Nishizawa H, Arshaad WM et al (2016) Genetic stock compositions and natal origin of green turtle (*Chelonia mydas*) foraging at Brunei Bay. *Glob Ecol Conserv* 6: 16-24. doi: 10.1016/j.gecco.2016.01.003

Lahanas PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Encalada SE, Miyamoto MM, Valverde RA, Bowen BW (1998) Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Mar Biol* 130(3): 345-352. doi: 10.1007/s002270050254

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *J Bioinform* 25(11): 1451-1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187

Lohmann KJ, Lohmann CM, Brothers JR, Putman NF (2013) Natal homing and imprinting in sea turtles. In: Wyneken J, Lohmann KJ, Musick JA (eds) *The biology of sea turtles*. Boca Raton, Florida pp 59-77.

Luke K, Horrocks JA, LeRoux RA, Dutton PH (2004) Origins of green turtle (*Chelonia mydas*) feeding aggregations around Barbados, West Indies. *Mar Biol* 144(4): 799–805. doi: 10.1007/s00227-003-1241-2

Naro-Maciel E, Becker JH, Lima EHSM, Marcovaldi M, DeSalle R (2007) Testing Dispersal Hypotheses in Foraging Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *J Hered* 98(1): 29–39. doi: 10.1093/jhered/esl050

Naro-Maciel E, Stephen J, Gaughran N, Putman G, Felicity A, Dutton PH (2014) Predicting connectivity of green turtles at Palmyra Atoll, central Pacific: a focus on mtDNA and dispersal modelling. *J R Soc Interface* 11(93). doi: 10.1098/rsif.2013.0888

Ng CKY, Dutton PH, Gu HX et al (2017). Regional conservation implications of green turtle (*Chelonia mydas*) genetic stock composition in China. *Chelonian Conserv Biol* 16(2): 139-150. doi: 10.2744/CCB-1253.1

Nishizawa H, Okuyama J, Kobayashi M, Abe O, Arai N (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. *Zool Sci* 27(1): 14–18. doi: 10.2108/zsj.27.14

Nishizawa H, Naito Y, Suganuma H et al (2013) Composition of green turtle feeding aggregations along the Japanese archipelago: implications for changes in composition with current flow. *Mar Biol* 160(10): 2671-2685. doi: 10.1007/s00227-013-2261-1

Paredes E (2017) Ecology of the East Pacific green turtle (*Chelonia mydas*) at Virrila Estuary, northern coast of Peru: conservation and management implications. Master's thesis, Lima Perú.

Piovano S, Batibasaga A, Ciriayawa A, LaCasella EL, Dutton PH (2019) Mixed stock analysis of juvenile green turtles aggregating at two foraging grounds in Fiji reveals major contribution from the American Samoa Management Unit. *Sci Rep* 9(1): 1-7. doi: 10.1038/s41598-019-39475-w

Proietti MC, Lara-Ruiz P, Reisser JW, Pinto LDS, Dellagostin OA, Marins LF (2009) Green turtles (*Chelonia mydas*) foraging at Arvoredo Island in Southern Brazil: Genetic characterization and mixed stock analysis through mtDNA control region haplotypes. *Genet Mol Biol* 32(3): 613-618. doi: 10.1590/S1415-47572009000300027

Quiñones J, García-Godos I, Llapapasca M, Van Ordt F, Paredes E (2015) The Black Sea turtle (*Chelonia mydas agassizii*) at Lobos de Tierra Island, Northern Peru: high densities in small areas. *S Am J Herpetol* 10(3):178-186. doi: 10.2994/SAJH-D-14-00040.1

Read TC, FitzSimmons NN, Wantiez L et al (2015) Mixed stock analysis of a resident green turtle, *Chelonia mydas*, population in New Caledonia links rookeries in the South Pacific. *Wildlife Res* 42(6): 488-499. doi: 10.1071/WR15064

Rosales CA, Vera M, Llanos J (2010) Varamientos y captura incidental de tortugas marinas en el litoral de Tumbes, Perú. *Rev Peru Biol* 17(3): 293-302.

Santillán L (2008) Análisis de la dieta de *Chelonia mydas agassizii* "tortuga verde del Pacífico" en la Bahía de Sechura, Piura-Perú. Master's thesis, Universidad Agraria La Molina, Lima, 70 pp.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p 1626

Seminoff JA, Zárata P, Coyne M, Foley DG, Parker D, Lyon BN, Dutton PH (2008) Post-nesting migrations of Galápagos green turtles *Chelonia mydas* in relation to oceanographic conditions: integrating satellite telemetry with remotely sensed ocean data. *Endanger Species Res* 4(1-2): 57-72. doi: 10.3354/esr00066

Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512–526. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132(2): 619-633.

Vásquez-Carrillo C, Noriega-Hoyos CL, Hernandez-Rivera L, Jáuregui-Romero GA, Sullivan Sealey K (2020) Genetic Diversity and Demographic Connectivity of Atlantic Green Sea Turtles at Foraging Grounds in Northeastern Colombia, Caribbean Sea. *Front Mar Sci* 7: 96. doi: 10.3389/fmars.2020.00096

Velez-Zuazo X, Quiñones J, Pacheco AS, Klinge L, Paredes E, Quispe S, Kelez S (2014) Fast growing, healthy and resident green turtles (*Chelonia mydas*) at two neritic sites in the central and northern coast of Peru: implications for conservation. *PLoS One* 9(11): e113068. doi: 10.1371/journal.pone.0113068

Veliz D, Salinas P, Sielfeld W, Contreras D, Azocar C, Tobar M, Gallardo J (2014) Estudio poblacional y genético de la tortuga *Chelonia mydas agassizii* (Sauria: Cheloniidae) en la Playa Chinchorro, Arica, Chile. *Rev Biol Mar Oceanogr* 49(3): 589-593. doi: 10.4067/S0718-19572014000300015