



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Problemas de conservación de la tortuga boba (*Caretta caretta*) en el Mediterráneo

Carlos Carreras Huergo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Problemas de conservación de la tortuga boba (*Caretta caretta*) en el Mediterráneo

"La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante".

Ernest Rutherford (1871-1937); físico neozelandés



REGISTRE GENERAL
Facultat de Biologia Secretaria d'Estudiants i Docència
Data: 28-3-2007
Entrada: 8957

Departamento de Biología Animal
Programa de Zoología, bienio 2001-2002

Problemas de conservación de la tortuga boba (*Caretta caretta*) en el Mediterráneo

Doctorando
Carlos Carreras Huergo

Director de la Tesis
Alejandro Aguilar Vila

Director de la Tesis
Lluís Cardona Pascual

"Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa".

Mahatma Gandhi (1869-1948); político y pensador indio.

3

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA

0701298042

Agradecimientos

"El ejemplo es una lección que todos los hombres pueden leer".

Morris West (1916-1999); escritor australiano.

A pesar de que únicamente una persona aparece como autora de una tesis doctoral, y únicamente esta persona la defiende ante un tribunal, es innegable que cualquier tesis sólo es posible por la intervención de multitud de personas. Por eso, considero este apartado una gran oportunidad para agradecer debidamente a todos aquellos que han hecho que este camino sea más sencillo, ya sea contribuyendo como experimentados científicos a la calidad del resultado o apoyándome (o mejor dicho, aguantándome) durante el proceso, especialmente en los momentos de crisis que ella ha conllevado. A todos ellos les quiero dedicar la tesis además de agradecersele enormemente.

En primer lugar quisiera expresar mi enorme gratitud a mis directores de tesis, el Dr. Alex Aguilar y el Dr. Lluís Cardona. Su calidad como investigadores es muy alta y ambos han sido un ejemplo a seguir proporcionándome consejos, ayuda, ideas y todos los medios que he podido necesitar. Sus extensos conocimientos y experiencia han ido corrigiendo mi rumbo hasta llegar a este resultado final. Sin embargo, y una vez que la tesis ha acabado (o casi!) desearía destacar su calidad humana, que me ha hecho sentir arropado a lo largo del proceso y que ha hecho que, además de directores, sean entrañables amigos. ¡¡Gracias a los dos!!

Si hay una persona que se ha portado como una tercera directora de tesis, ésa ha sido la Dra. Marta Pascual. Ella me ha iniciado en el mundo de las pipetas y la PCR y me ha enseñado a descifrar los innumerables programas y tipos de análisis, cada uno de ellos con un archivo de entrada diferente y catorce interpretaciones posibles de los resultados. Siempre que le presentaba un artículo que creía acabado temblaba, pues sabía que me iba a sugerir un tipo de análisis nuevo a añadir (o varios!), lo que supondría semanas de nueva pelea con los datos, lo que a su vez me llevaría a

proponerme a mí mismo a hacer un par adicional de análisis más, con su consiguiente par de semanas extras. A pesar de mis refunfuños sé que todo ello ha sido para bien y que el resultado final se ha visto siempre enormemente mejorado. Compañera y amiga para siempre...¡no cambies nunca!

No me podía olvidar del Dr. Jacint Nadal. Ya cuando lo tuve como profesor de la asignatura de Cordados me proporcionó valiosos consejos acerca de cómo empezar las andadas en eso que llaman “tesis doctoral”. Recuerdo con cariño cuando me planté en su despacho recién licenciado y le dije que quería hacer una tesis doctoral. Él me preguntó de qué la quería hacer y yo, sorprendido (¡ah! ¿se puede escoger?), le dije que con un vertebrado marino. Quince minutos después estaba en el despacho del Dr. Alex Aguilar balbuceando cosas sobre una tesis.

Numerosos son los compañeros del Grupo de Biología de Conservación que me han apoyado durante mi estancia en la Universidad de Barcelona. Muchas gracias, Xon, fuente inagotable de ánimos, de optimismo y de buenos consejos. Gracias Manel, por tus colaboraciones en los primeros trabajos y tu simpatía innata. No me podría olvidar de Mar, Victoria, Joan y Silvia, por el apoyo prestado y el compañerismo que han mostrado día a día. Y, por supuesto, gracias al “Grupo Tortuguero”, famoso por no parar de hablar de trabajo ni durante el desayuno: Mónica e Irene, compañeras de campañas de pesca y de encuestas, y amigas entrañables, así como a los muchos voluntarios que han pasado por el grupo. ¡Muchas gracias a todos!

Muchas gracias también a todos los compañeros del Departamento de Genética de la UB, donde he pasado muchas horas entre PCRs y geles de agarosa. Gracias al Dr. Lluís Serra, al Dr. Francesc Mestres y al Dr. Joan Balanyá por sus consejos, su apoyo y sus tertulias sobre el Barça. Gracias también a los compañeros del lab: Pep, Andrea, Josiane, Pedro, Ferran, Cintia e Isaac por la compañía, por los protocolos alternativos, por los artículos que se escapan a nuestra búsqueda y por vuestra amistad.

No me podría olvidar de todos los miembros de la Sea Turtle Society que he conocido, formen parte o no del afamado “Party Commitee” con el que he tenido tantas “reuniones” de trabajo. En cada Congreso de la STS he ido conociendo gente nueva que

me ha apoyado, me ha dado ideas nuevas y me ha proporcionado contactos para obtener muestras. ¡¡Thank you very much!!

Muchas gracias a la gente de la Estación Biológica de Doñana, mi “segunda casa” donde he aprendido muchísimo mientras acababa la tesis. Al Dr. Adolfo Marco, por su apoyo para que acabara la tesis de una puñetera vez y por sus innumerables consejos para prosperar en el mundo de la ciencia. Gracias por esas muestras procedentes de Andalucía que han acabado de redondear la tesis, y por apoyar las becas y contratos que me han dado de comer en estos últimos tiempos. Por esos intensos debates sobre de dónde vienen las tortugas y adónde van (y no es una metáfora), entre otros interesantísimos temas. Gracias al Dr. Ciro Rico y a Inés, ejemplos de científicos eficaces y humanos donde los haya, por sus ánimos, consejos, conocimientos y apoyo. A los compañeros del “Grupo Tortuguero”: Juan, Lili, Guada, Elena, Caty, Paula y Cynthia, por vuestro apoyo y colaboración día a día y por aguantar a un doctorando cascarrabias en plena crisis de “fin de tesis”. A toda la gente del LEM por los consejos de laboratorio, por las comidas en el parque de María Luisa, por esos protocolos alternativos, por estar ahí...

Por toda la gente que ha colaborado en el trabajo obteniendo muestras o datos. Muchas gracias a la gente del CREMA, a Gloria Fernández, a Manu SanFélix, a Jesús Tomás, a Dimitris Margaritoulis, a Alan Rees, a Ogüz Turkozan, a Yaniv Levi, a Avital Gasith, a Monica Aureggi y a Mona Khalil por esos trocitos de tortuga en etanol. Gracias a Sara Pont, a Ferran Alegre, a Aina Barceló, a Flegra Bentivegna y a Fulvio Maffucci por esos datos de mitocondrial de Cataluña e Italia. Gracias a Raquel Goñi, a Txema Brotons, a Enric Massutí y a Aina Carbonell por los datos de embarques. Gracias a Manu San Félix y a su equipo por capturar tortugas salvajes con tremenda eficiencia para equiparlas con transmisores. ¡Sólo el verte cazar una tortuga ya merece el viaje!

Mi agradecimiento también a los pescadores. Por contestar amablemente a las encuestas, enriqueciendo mi conocimiento sobre las tortugas marinas con datos que no salen en los artículos científicos. Por acogerme a bordo de sus barcas de pesca, compartiendo conmigo la experiencia de su trabajo cotidiano y por su amabilidad, que

les lleva a que te inviten a comer o a tomar alguna cosa sencillamente porque les apetece.

¡¡Por supuesto muchísimas gracias a toda la familia!! Por animarme a seguir con esa locura de querer ser Biólogo desde que tengo uso de razón, ya que es un vicio que viene de pequeño, sin importar si las perspectivas de trabajo eran buenas o no. Un agradecimiento especial a padres y hermanos (4 y 8 respectivamente), así como cuñado y sobrinas que se han ido alternando en la agotadora tarea de aguantar a un doctorando, tanto en Barcelona como en Mallorca. No me cabe la menor duda de que sin vosotros no habría llegado hasta aquí.

Y en último lugar, pero no por ello menos importante, muchas gracias a las tortugas. Por no morderme demasiado a menudo (a pesar de que alguna cicatriz me ha quedado), por dejarse pescar, medir, tomar muestras etc etc...sin quejarse demasiado. La cara de paciencia que tienen es bien merecida y hay que tener en cuenta que sin ellas esta tesis no tendría demasiado sentido. A ver si el pequeño grano de arena al conocimiento sobre las tortugas que pretende ser esta memoria contribuye a que todos nosotros, y las generaciones venideras, podamos seguir disfrutando de estos maravillosos animales.

Esta tesis va por todos vosotros. ¡Muchísimas gracias!

"Nuestro conocimiento es necesariamente finito,
mientras que nuestra ignorancia es necesariamente infinita".

Karl Raimund Popper (1902-1994); filósofo austríaco

Contenido

“Haríamos muchas más cosas si creyéramos
que son muchas menos las imposibles”.

Guillaume de Lamoignon de Malesherbes (1721-1794); político francés

<i>Agradecimientos</i>	5
<i>Contenido</i>	9
<i>Lista de Tablas y Figuras</i>	11
<i>Introducción general</i>	15
<i>Objetivos</i>	27
<i>Material y Métodos</i>	29
1.- Análisis genéticos	30
2.- Estudio de interacción con pesca	41
3.- Movimientos y distribución	49
<i>Resultados</i>	57
1.- Análisis Genéticos	57
2.- Estudio de Interacción con pesca	70
3.- Movimientos y distribución	75
<i>Discusión</i>	83
<i>Conclusiones</i>	97
<i>Bibliografía</i>	101
<i>Publicaciones</i>	113
Artículo 1: The genetic structure of the Mediterranean loggerhead sea turtle (<i>Caretta caretta</i>) as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications	115
Artículo 2: DNA microsatellites reveal genetic isolation of the Mediterranean loggerhead sea turtles (<i>Caretta caretta</i>)	119

Artículo 3: Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (<i>Caretta caretta</i>) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns	123
Artículo 4: Using mtDNA and microsatellites for origin assessment in marine turtles feeding grounds	127
Artículo 5: Western Mediterranean Immature loggerhead turtles: habitat use in spring and summer assessed through Satellite tracking and aerial surveys.	131
Artículo 6: Incidental catch of the loggerhead turtle <i>Caretta caretta</i> off the Balearic Islands (western Mediterranean)	135
ANEXO 1:	139

Lista de Tablas y Figuras

"A los hombres les encanta maravillarse.

Esto es la semilla de la ciencia."

Ralph Waldo Emerson (1803-1882); filósofo y escritor estadounidense.

Tablas

Tabla 1 (p. 28): Relación de muestras para estudios genéticos empleadas en la presente tesis, indicando si se trata de una zona de alimentación o de nidificación, el número de muestras (n), el tipo de análisis realizados y la referencia de donde se obtuvieron los datos. Entre paréntesis se indica la abreviatura usada en cada caso a lo largo de la tesis.

Tabla 2 (p. 57): Distancias genéticas entre pares de poblaciones usando mtDNA (debajo de la diagonal) y nDNA (encima de la diagonal). (-) indica que no hay datos de microsatélites de ETU. Para comparaciones de mitocondrial entre Atlántico y Mediterráneo ver Encalada *et al.* 1998. Las abreviaturas están definidas en la Tabla 1: ATL: muestras atlánticas; GRE: Grecia; CRE: Creta; WTU: Turquía occidental; ETU: Turquía oriental; CYP: Chipre; ISR: Israel; LEB: El Líbano.

Tabla 3 (p. 61): Distancias genéticas entre pares de zonas de alimentación usando mtDNA (debajo de la diagonal) y nDNA (encima de la diagonal). (-) indica que no hay datos de microsatélites de AZO, MAD, NES, WIT, EIT y LAM. Las abreviaturas están definidas en la Tabla 1: AZO: Azores; MAD: Madeira; SWS: SW España (Andalucía Occidental); SES: SE España (Andalucía Oriental); MES: Mid E España (Comunidad Valenciana); NES: NE España (Cataluña); GIM: Gimnesias (Mallorca y Menorca); PIT: Pitiüses (Ibiza y Formentera); WIT: W Italia; EIT: E Italia; LAM: Lampedusa.

Tabla 4 (p. 64): Contribución estimada de cada zona de nidificación (filas) a cada zona de alimentación (columnas) basada en mtDNA. La contribución mostrada corresponde al modelo BM2, donde se pondera la contribución de las zonas de nidificación según su tamaño poblacional. Entre paréntesis se muestra el error estándar.

Tabla 5 (p. 66): Resultados de las asignaciones individuales de las tortugas que no presentan el haplotipo CC-A1 (Otros). Cada individuo tiene una probabilidad de ser de origen Atlántico o Mediterráneo. Las categorías se han establecido según los siguientes criterios: Origen Atlántico con una probabilidad mayor del 90%, Origen Atlántico con una probabilidad de entre el 70% y el 90%, Origen desconocido, Origen Mediterráneo con una probabilidad de entre el 70% y el 90%, Origen Mediterráneo con una probabilidad mayor del 90%.

Tabla 6 (p. 66): P-valores resultantes de las comparaciones del test post hoc de Neuman-Keulis para detectar diferencias entre las tallas medias (SCL) entre zonas de alimentación. Valor de la talla media con desviación estándar (DS) y el rango de tallas.

Tabla 7 (p. 67): Número de embarcaciones registradas que emplean los distintos tipos de artes de pesca, número de pescadores entrevistados en cada caso y cobertura de las encuestas.

Tabla 8 (p. 68): Distribución del esfuerzo pesquero (E_{za}) en el Archipiélago Balear durante el año 2001, expresado como meses en los que una barca usa este arte.

Tabla 9 (p. 69): Capturas realizadas mensualmente por los pescadores de cada arte (CPUE) y número de capturas totales (C_{za}) realizadas por la flota Balear.

Tabla 10 (p. 69): Número medio de tortugas capturadas mensualmente por embarcación en las zonas de pesca (CPUE) validadas según la respuestas de los pescadores en las encuestas y según los datos obtenidos en los embarques en las mismas zonas de pesca. También se muestran los valores de la prueba de Mann-Withney (p-valor).

Tabla 11 (p. 70): Capturas de tortugas declaradas por los pescadores en cada isla (o), capturas esperadas en cada isla asumiendo que es proporcional al esfuerzo pesquero realizado en cada isla (e) tal y como se muestra en la tabla 8 y resultados del test de Chi-cuadrado (p-valor). Los valores de las zonas de pesca en cada isla se han juntado en la tabla, pero los análisis estadísticos se realizaron con los datos originales.

Tabla 12 (p. 71): Mortalidad inmediata causada por diferentes artes de pesca. n: tamaño muestral, (-) no hay datos de este arte.

Tabla 13 (p. 74): Disponibilidad de hábitat en la sección cubierta de la plataforma continental del Archipiélago Balear y distribución de los avistamientos de tortuga boba.

Tabla 14 (p. 74): Rendimiento del seguimiento de las cinco tortugas marcadas. (n): número de posiciones.

Tabla 15 (p. 76): Ángulo de natación y ángulo de giro medios de las cinco tortugas marcadas con el test de Rayleigh para determinar si dichos ángulos se distribuyen al azar.

Tabla 16 (p. 77): Uso del hábitat de las cinco tortugas indicando el Índice de electividad de Ivlev. La disponibilidad del hábitat fue el siguiente: oceánico 307,574.4 km², talud 94,972.1 km² y plataforma continental 66,741.2 km²

Tabla 17 (p. 78): Velocidad media de viaje y media del coseno del ángulo de giro (ψ) de los cinco animales marcados en los tres tipos de hábitat.

Figuras

Figura 1 (p. 30): Localización de las zonas de alimentación consideradas en los estudios genéticos. Las abreviaturas están definidas en la Tabla 1: AZO: Azores; MAD: Madeira; SWS: SW España (Andalucía Occidental); SES: SE España (Andalucía Oriental); MES: Mid E España (Comunidad Valenciana); NES: NE España (Cataluña); GIM: Gimnesias (Mallorca y Menorca); PIT: Pitiüses (Ibiza y Formentera); WIT: W Italia; EIT: E Italia; LAM: Lampedusa.

Figura 2 (p. 30): Localización de las zonas de nidificación consideradas en los estudios genéticos.

Figura 3 (p. 40): Zonas de pesca de las Islas Baleares definidas en las encuestas a los pescadores.

Figura 4 (p. 48): Transectos realizados con avioneta en la campaña de marzo del 2002 y septiembre del 2002

Figura 5 (p. 49): Cálculo de la distancia perpendicular (d) del avistamiento (según Keith y Hoggard 1999).

Figura 6 (p. 58): Tasa de migración (M) entre cada par de poblaciones calculado mediante métodos de coalescencia por el programa MIGRATE. La anchura de cada flecha es proporcional al número de migrantes.

Figura 7 (p. 59): Resumen de los resultados de clustering obtenidos mediante el programa STRUCTURE. Cada barra muestra la probabilidad estimada que tiene un individuo de pertenecer a uno de los clúster definidos por el programa. A cada número de individuo le sigue el número de población de origen entre paréntesis: (1) individuos Atlánticos (desde el individuo 1 al individuo 53), (2) individuos Mediterráneos (desde el individuo 54 al individuo 165).

Figura 8 (p. 61): *Neighbour-joining unrooted tree* basado en mtDNA, donde se muestran las relaciones genéticas entre las zonas de alimentación.

Figura 9 (p. 65): Proporción de individuos provenientes del Atlántico (ATL) o del Mediterráneo (MED) para cada zona de alimentación usando el *Mixed Stock Analysis* bajo el modelo BM2. (A) Usando mtDNA; (B) Usando microsatélites.

Figura 10 (p. 70): Vulnerabilidad de la tortuga boba al trasmallo de langosta en las diferentes zonas de pesca de las islas Baleares, tal y como indica el índice de electividad de Ivlev. Las líneas verticales muestran los intervalos de confianza (95%)

Figura 11 (p. 72): Percepción de avistamientos (A) y capturas (B) a lo largo del año. El eje de ordenadas se corresponde con la escala de percepción del pescador, que va desde “ninguna tortuga” (0) a “muchas tortugas” (3).

Figura 12 (p. 75): Rastros de las tortugas (paneles de la A a la E) y las corrientes predominantes en el Mediterráneo occidental de acuerdo con Millot (1986) (panel F). La línea gris clara corresponde a la isóbata de los 200 m, mientras que la línea negra corresponde a la isóbata de los 1.400 m.

Introducción general

"Los grandes conocimientos engendran las grandes dudas".

Aristóteles (384 AC-322 AC); filósofo griego.

La tortuga boba (*Caretta caretta*) es la única especie de tortuga marina de las cinco presentes en el Mediterráneo que se puede encontrar con relativa frecuencia en este mar (Pritchard y Mortimer 2000), ya que la otra especie nidificante, la tortuga verde (*Chelonia mydas*), se restringe al Mediterráneo oriental y su abundancia es mucho menor (Broderick *et al.* 2002). Las otras tres especies son muy poco habituales y cabe calificarlas de accidentales, pues no existe nidificación conocida en el Mediterráneo (Pritchard y Mortimer 2000).

La tortuga boba pertenece a la familia de los quelonídeos, de los que sólo existen actualmente seis especies (Pritchard 1997), aunque algunos autores elevan a nivel específico las poblaciones de tortuga negra (*Chelonia mydas agassizi*) del Pacífico americano (Bowen *et al.* 1997; Pritchard 1997, 1999). La tortuga boba es una de las especies más grandes de su familia, pudiendo alcanzar una talla de 105 cm de longitud recta del caparazón (LRC) (Pritchard y Mortimer *et al.* 2000). Sin embargo, las tortugas adultas mediterráneas son de menor tamaño que las atlánticas, y rara vez sobrepasan los 90 cm de LRC (Margaritoulis *et al.* 2003). A diferencia de los restantes quelonídeos, eminentemente tropicales, la tortuga boba tiene una distribución antitropical. Esto provoca, por una parte, que su área de distribución se fragmente en sectores aislados entre sí y, por otra parte, que sea la especie sujeta a amenazas más intensas por parte del hombre dado su coincidencia con las áreas más fuertemente industrializadas y urbanizadas de los países más desarrollados (Pritchard 1997).

Como el resto de tortugas marinas, la tortuga boba pasa la mayor parte de su vida en el medio marino aunque, al menos para realizar la puesta de huevos, debe acceder al medio terrestre (Schroeder *et al.* 2003). Tras el apareamiento, que se produce en el mar, las hembras de las tortugas marinas realizan el desove en playas de diversas

regiones tropicales y subtropicales del mundo. Las hembras de tortuga boba suelen poner unos 112 huevos por nido de media y llegan a realizar unos 2-4 nidos por temporada en intervalos mínimos de dos semanas (Miller *et al.* 2003). Una vez finalizada la última puesta de la temporada, las hembras regresan a las zonas de alimentación hasta la próxima temporada de nidificación (Schroeder *et al.* 2003), que no tendrá lugar hasta unos 2-3 años más tarde. Estudios de marcaje y recaptura han confirmado que las hembras presentan una gran fidelidad a las playas de puesta que han usado con anterioridad (Miller 1977). Además, estudios genéticos mediante marcadores de herencia materna (mtDNA) han demostrado que esa fidelidad no sólo se corresponde con el lugar de la primera puesta, sino con aquel donde esas hembras nacieron, fruto de una intensa filopatría (Bowen 2003), similar a la observada previamente en otras especies de tortugas marinas (Meilan *et al.* 1990). Sin embargo, estudios con marcadores de transmisión biparental, como los microsatélites, han demostrado que este comportamiento no es tan acentuado en los machos, ya que estos generalmente se aparean con hembras de diferentes zonas de puesta, generando así un intenso flujo génico entre poblaciones (Bowen *et al.* 2005, FritzSimmons *et al.* 1997b).

Al cabo de un período de incubación que dura unas 13 semanas, se produce la eclosión de los huevos (Miller *et al.* 2003). Cuando las condiciones son favorables, las crías excavan simultáneamente la parte superior del nido, con el fin de emerger en masa y así minimizar el efecto de los depredadores. Las crías se orientan rápidamente hacia el agua, donde entran en un estado de gran actividad que las lleva a alejarse de la costa. En estas dos primeras etapas de la vida la mortalidad es muy elevada, pues numerosos depredadores aprovechan la gran fuente de alimento que suponen las jóvenes tortugas. Entre los depredadores terrestres se incluyen tanto invertebrados (por ejemplo, hormigas o cangrejos) como vertebrados (por ejemplo, varanos, mapaches, perros, gatos, zorros, osos o ratas), ya sean domésticos o salvajes (Miller *et al.* 2003). Una vez llegan al mar, otros depredadores les esperan (diversas especies de tiburones y peces). Las crías entran en un estado de natación muy activa conocida como “frenesí de natación” o “swim frenzy” (Wyneken y Salmon 1992) que dura unos días hasta que llegan a alta mar, donde se piensa que entran en contacto con las grandes corrientes oceánicas. Durante esta fase se orientan primero por la dirección de las olas y después por el campo magnético (Lohmann y Lohmann 2003) y se alimentan de las reservas del saco vitelino.

Poco se sabe del período que comprende entre el fin de esta etapa, inmediatamente posterior a la emergencia, y la fase juvenil, todavía pelágica, en que las tortugas miden unos 15 cm de LRC. Por eso, a la primera etapa de la vida de las tortugas bobas ha sido denominada como la de “los años perdidos” (Bolten y Balazs 1995, Carr 1986; Bolten 2003). Por ejemplo, se han encontrado individuos muy pequeños de tortuga boba asociados a frentes convergentes y en el Mar de los Sargazos (Fletmeyer 1978, Smith 1968), por lo que se especula que podrían aprovechar este tipo de sistemas, donde se acumulan algas y maderas flotantes tanto como fuente de alimento como de cobijo frente a depredadores (Witherington 1994). A pesar del gran desconocimiento de esta etapa de la vida de las tortugas, se sabe que las crías emprenden grandes migraciones de desarrollo durante los años de vida juvenil. Así, las tortugas bobas nacidas en el Atlántico occidental, seguirían la corriente del Golfo hasta el Atlántico oriental, llegando a Europa y África (Bolten 2003). Por otro lado, en el Pacífico, las tortugas bobas nacidas en Japón migran hasta las zonas de alimentación de la costa americana antes de regresar a las zonas de puesta (Bowen et al. 1995). A pesar de que se supone que los movimientos durante esta etapa son esencialmente pasivos, ya que las tortugas se desplazan a merced de la deriva de las corrientes, se ha visto que las crías son capaces de realizar ciertos movimientos activos orientándose por campos magnéticos (Lohman y Lohmann 2003) que les ayudarían a permanecer en las corrientes que bordean los giros oceánicos tropicales e incrementar así las posibilidades de completar su recorrido con éxito. En cualquier caso, el recorrido de estas migraciones no ha podido ser desvelado hasta la introducción de los análisis genéticos (ej Bolten *et al.* 1998), ya que la elevada mortalidad de las crías y la dificultad de marcarlas hacen que sea arduo conseguir resultados con un programa de marcaje y recaptura.

Lo que sí se sabe con certeza es que juveniles con tallas superiores a los 15 cm se concentran en diversas zonas de alimentación, algunas de ellas alejadas miles de kilómetros de las playas de anidación más cercanas. Uno de los ejemplos más conocido es el de las zonas de alimentación de juveniles en el Mediterráneo occidental, donde estudios genéticos han demostrado la confluencia de ejemplares procedentes de dos grandes zonas de nidificación tan alejadas como el Mediterráneo oriental y el Atlántico occidental (Laurent *et al.* 1993, Laurent *et al.* 1998, Casale *et al.* 2002). Una vez los individuos alcanzan la edad adulta, el elevado grado de filopatría de las hembras sugiere

que, al menos éstas, volverán a reproducirse a las playas donde nacieron, completando así su ciclo. Luego utilizarán zonas de alimentación costeras próximas a las playas de puesta, no regresando jamás a las zonas de alimentación juveniles.

En la actualidad, prácticamente todas las fases de la vida de estos animales se ven influidas negativamente por la actividad humana (Lutcavage *et al.* 1997). En las playas de nidificación, las hembras adultas son capturadas por su carne y por su caparazón, ya que en tierra estos animales son torpes y, por lo tanto, vulnerables (Lutcavage *et al.* 1997). Los nidos son excavados para el consumo de huevos y los depredadores introducidos por el hombre, como perros y gatos, incrementan notablemente la presión de los depredadores naturales sobre los huevos (Lutcavage *et al.* 1997). La ocupación costera, intensificada por el turismo, así como la alteración de las playas por actividades como la extracción de áridos, provoca una considerable reducción del hábitat disponible para efectuar la puesta (Lutcavage *et al.* 1997). Este efecto se ve agravado por la extrema filopatría que presenta la especie, hasta el punto de documentarse nidos de una misma hembra excavados en años diferentes a pocos metros de distancia los unos de los otros (Miller 1997). Además, la urbanización de la línea costera genera una contaminación lumínica que desorienta tanto a crías como a adultos, provocando, por ejemplo, que las crías se dirijan tierra adentro y la consiguiente pérdida de nidos enteros (Lutcavage *et al.* 1997). La constatación de un notable descenso del número de hembras nidificantes en muchas especies (NRC 1990) ha hecho que los esfuerzos por proteger las zonas de puesta de las tortugas se hayan intensificado en todo el mundo.

Si a todo esto sumamos el hecho de que la investigación y las acciones de protección en el mar son difíciles de ejecutar, es fácil entender que, hasta hace relativamente poco tiempo, los esfuerzos de conservación y de estudio de las tortugas marinas se hayan concentrado en las playas de puesta. El resultado ha sido un elevado grado de conocimiento sobre la fase terrestre de su ciclo biológico y las amenazas que allí se dan, pero un notable desconocimiento de la fase marina, a pesar de que supone la mayor parte de la vida de estos animales.

Sin embargo, a medida que se ha profundizado en la biología de la tortuga boba, se ha observado que su demografía es mucho más sensible a los impactos que se

producen en los estadios intermedios de su ciclo biológico (inmaduros de entre 30 y 80 cm de LCR y, en segundo término, los adultos) que a los que se producen durante los primeros estadios (huevos, neonatos y juveniles) (Crouse *et al.* 1987). A pesar de que pueda parecer una paradoja, la explicación reside en el tipo de ciclo biológico que presentan las tortugas; se tratan de animales con una elevada producción de huevos, seguida de una elevada mortalidad natural por depredación en los primeros estadios, y una elevada supervivencia en estadios más avanzados debido a que en éstos casi no hay depredadores naturales. Este hecho confiere mucha más elasticidad a la especie en los primeros estadios de su ciclo, y le permite soportar mejor las agresiones en esta fase que en las posteriores. Dicho de otro modo, a estos animales les es más fácil recuperarse de la pérdida de huevos y neonatos que de la desaparición de inmaduros y adultos. Si expresamos esto en términos de conservación, se puede decir que los esfuerzos para proteger las fases marinas es esperable que tengan mucha más repercusión en el conjunto de la población que la protección de nidos, sin que esto último deje de ser importante. En los estadios intermedios, las principales amenazas son aquellas relacionadas con la pesca, la colisión con embarcaciones, la oclusión intestinal provocada por la ingestión de residuos flotantes (por ej. alquitrán o plásticos) y la contaminación (Lutcavage *et al.* 1997). De todos estos factores, la pesca es seguramente el más importante, a pesar de que la información sobre el resto es demasiado escasa como para poder hacer una evaluación global de su impacto. Como muestra de la importancia de la pesca, podemos decir que en aquellos lugares del mundo donde se ha observado una recuperación de las poblaciones de tortuga boba (como en el Atlántico occidental y el Golfo de México), ésta se ha producido después de una regulación de las actividades pesqueras más conflictivas (NMFS-SEFSC 2001).

En cualquier caso, la tortuga boba ha visto drásticamente reducido el tamaño de sus poblaciones en todo el mundo (NRC 1990) por lo que está catalogada como especie “en peligro” por la UICN (IUCN 2006) y se encuentra en la mayoría de tratados internacionales para la protección de especies como la Convención del Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna Silvestre (Convención de Washington o CITES, apéndice I), la Convención para la Conservación de Especies Migratorias y Animales Silvestres (Convención de Bonn o CMS, apéndice I), la Convención sobre la Conservación de la Vida Silvestre Europea y sus Hábitats Naturales (Convención de Berna, apéndice II), la Convención para la Protección del Mar Mediterráneo contra la

Contaminación (Convención de Barcelona) y la Directiva Hábitats de la Unión Europea (apéndices II y IV) (Hykle 2000). De entre todas las poblaciones del mundo, las del mar Mediterráneo han sufrido un descenso tan considerable en las últimas décadas que diversos autores han propuesto que sería adecuado otorgar a estas poblaciones el estatus de “en peligro crítico” según los criterios de la UICN (Groombridge 1990).

Se estima que el Mediterráneo fue colonizado por individuos Atlánticos hace unos 18.000-12.000 años cuando, tras la última glaciación, las condiciones de nidificación se hicieron apropiadas (Bowen *et al.* 1993). Esta colonización se produjo mediante la llegada de muy pocos individuos atlánticos, ya que la variabilidad de ADN mitocondrial encontrada en las playas de puesta mediterráneas sugiere la existencia de un cuello de botella y un efecto fundador. A partir de estos pocos individuos, se originarían las poblaciones actuales, en las que aparecerían posteriormente haplotipos propios, dando lugar a la variabilidad actual (Bowen *et al.* 1993, Encalada *et al.* 1998, Laurent *et al.* 1998).

Sin embargo, recientemente se ha producido un declive alarmante del número de hembras nidificantes, especialmente en el Levante Mediterráneo. La captura de adultos fue habitual en todo el Mediterráneo hasta la mitad de los años 60 (Margaritoulis *et al.* 2003) con periodos de gran intensidad. Por ejemplo, se estima que entre la Primera Guerra Mundial y la mitad de los años 30 se capturaron como mínimo 30.000 individuos adultos, tanto de tortuga boba como de tortuga verde en las aguas de lo que es hoy Israel. Una situación similar se debió de dar en el mar de Iskenderun, durante los años 50, donde incluso se conoce la existencia de un matadero de tortugas (Sella *et al.* 1982). A partir de los años 60 se empezó a prohibir la captura de tortugas marinas por todo el Mediterráneo de forma que, en la actualidad, sólo Egipto permite la captura de tortugas para consumo humano, estimándose en varios miles los ejemplares sacrificados anualmente por esta causa en dicho país (Laurent *et al.* 1996). Si a eso le sumamos la reducción o alteración de playas de nidificación por el reciente “boom” turístico en toda la costa Mediterránea, tenemos como resultado que algunas poblaciones, tanto de tortuga boba como de tortuga verde, se hayan visto drásticamente reducidas a pocas decenas de individuos (Margaritoulis *et al.* 2003). Esta reducción se supone que ha desembocado en una reducción de la variabilidad genética de la población del Mediterráneo, aunque ésta sólo se ha constatado mediante el uso de marcadores de

ADN mitocondrial. Además, la existencia de poblaciones extremadamente reducidas dentro del Mediterráneo sugiere que, si estas poblaciones están aisladas del resto, se pueden presentar graves problemas en un futuro próximo al producirse potencialmente un descenso brusco de la variabilidad genética que podría desembocar en problemas de consanguinidad y la consiguiente pérdida de viabilidad poblacional (Franham *et al.* 2002).

En el Mediterráneo, la presión del hombre sobre las poblaciones de tortuga boba no se limita a las playas de nidificación, sino que también tiene lugar en las zonas de alimentación de juveniles del Mediterráneo occidental y central. Las tortugas bobas que podemos encontrar en estas zonas pertenecen a los estadios más sensibles de la población (Crouse *et al.* 1987) con una talla media en torno a los 45-50 cm SCL (Mayol 1988). Un ejemplo son las aguas de las Islas Baleares, que constituyen una zona importante de alimentación de juveniles y subadultos de esta especie (Camiñas y de la Serna 1995). Los individuos del Mediterráneo occidental provienen tanto de las zonas de nidificación del Mediterráneo oriental como de las del Atlántico occidental, si bien la aportación de cada zona no está clara (Laurent *et al.* 1993, 1995 y 1998; Casale *et al.* 2002). A pesar de algunas evidencias de nidificación esporádica en el Mediterráneo occidental (Llorente *et al.* 1992, Tomas *et al.* 2002, Delauguerre y Cesarini 2004), parece ser que no existen zonas habituales de puesta en la región. De esta forma, las consecuencias de los impactos sobre los juveniles y subadultos presentes en estas zonas de alimentación tienen un alcance geográfico que excede en mucho el límite de dichas aguas.

En cualquier caso, la fuerte tradición pesquera del Mediterráneo y una densidad de tortugas aparentemente elevada en el mar favorecen la existencia de conflictos. Por un lado, la sobreexplotación de los recursos pesqueros puede provocar que las tortugas tengan dificultades para alimentarse, ya sea por la reducción de la disponibilidad de presas o por la reducción de las tallas de estas últimas. Esto puede empujar a las tortugas a usar otras fuentes de alimento, como los descartes de los barcos de pesca (Tomás *et al.* 2001) o a la depredación de la captura presente en artes de pesca todavía caladas, como se ha visto que hacen los cetáceos y otros organismos (UB 2002). Éste comportamiento puede conducir a una reacción negativa del pescador y a una persecución que tenga como objetivo el exterminio de la especie. Hasta el momento,

este aspecto ha sido poco evaluado aunque todo parece indicar que, de existir, se produce únicamente de forma local y reducida y, en cualquier caso, se limitaría a agresiones a ejemplares capturados incidentalmente (Margaritoulis *et al.* 2003).

Lo que sí se sabe con certeza es que el problema más importante y más generalizado en la cuenca Mediterránea es la captura accidental de tortugas marinas, que se produce cuando los animales quedan atrapados en los artes de pesca sin que el pescador tenga intención de capturarlas. En este proceso, las tortugas pueden morir inmediatamente por asfixia, o por daños producidos por el arte de pesca. En el caso de que sean liberadas vivas, su supervivencia puede quedar gravemente comprometida por la presencia de anzuelos u otros materiales en el tracto digestivo o por la existencia de lesiones en las aletas u otras partes del cuerpo, así como por tener enredados restos de hilo y redes. Un ejemplo bien estudiado es el de la pesca de deriva en el Mediterráneo que, hasta su prohibición, capturaba de forma accidental un elevado número de tortugas, mamíferos marinos y gran multitud de especies de peces sin interés comercial que eran arrojados al mar muertos o con lesiones severas (Silvani *et al.* 1999). El arrastre también se sabe que causa una gran mortalidad tanto en el Atlántico (Nichols *et al.* 1999) como en el Mediterráneo (Gerosa y Casale 1999). Sin embargo, en la actualidad, el arte de pesca que destaca con diferencia por número de capturas de juveniles es el palangre de superficie, con unas capturas anuales de tortugas bobas estimadas entre 1.950 y 35.000 animales (Aguilar *et al.* 1995; Camiñas y Valeiras 2003, Camiñas 1998). Sin embargo, el efecto real de esta pesquería no está del todo claro, ya que no se conoce con certeza cuál es la mortalidad derivada de dicha actividad, si bien la mortalidad inmediata parece muy baja. Se ha propuesto una estima de mortalidad total (incluyendo la mortalidad inmediata y la mortalidad derivada de los daños de la interacción) de un 24,4%, lo que supondría la muerte de varios miles de tortugas al año (Aguilar *et al.* 1995). Además de estos artes de pesca, algunos autores han apuntado la posible importancia de los llamados artes menores de pesca (trasmallo, palangre de fondo y otros) que, a pesar de que capturan individualmente un número reducido de tortugas, podrían tener una incidencia importante debido al elevado número de embarcaciones que los usan y a la posible elevada tasa mortalidad que tendrían asociada (Lazar y Tvrtkovic 2002). Por todo ello, sería necesario evaluar la incidencia de la pesca de una manera global en vez de, como se ha hecho hasta el presente, centrar los cálculos de mortalidad en un arte concreto.

En cualquier caso, el disponer únicamente de cifras de mortalidad, por precisas que éstas sean, resulta de poca utilidad para evaluar el impacto en la especie, pues se desconoce con exactitud a qué poblaciones dicha mortalidad está afectando. Hasta ahora, se sabe tan solo que los ejemplares que habitan el Mediterráneo occidental provienen tanto de las zonas de nidificación del Atlántico como del Mediterráneo (Laurent et al. 1993, 1998; Casale et al. 2002). Se especula que los individuos provenientes del Atlántico viajarían siguiendo la corriente del Golfo, pasarían por Azores y Madeira y entrarían en el Mediterráneo a través del Estrecho de Gibraltar (Bolten 2003). La ruta seguida por los individuos provenientes de las zonas de nidificación del Mediterráneo es desconocida, pero posiblemente entrarían por el estrecho de Mesina, ya que el régimen de corrientes permitiría el paso de individuos de pequeño tamaño incapaces de nadar contra las corrientes que dominan en el estrecho de Sicilia (Milot 1987, 2001; Pinardi y Masetti 2000). Una vez en el Mediterráneo occidental, se desconoce cómo los individuos de estas poblaciones se mezclan, aunque se sugirió, sin una base sólida, que aproximadamente un 50% de los individuos provendrían de cada zona antes de regresar a las zonas de nidificación a reproducirse (Laurent *et al.* 1993, 1998).

Sin embargo, el Mediterráneo occidental es topográficamente muy heterogéneo, ya que está dividido en varias sub-cuencas que se caracterizan por contener masas de agua muy diferenciadas (Milot 1987, 2001; Pinardi y Masetti 2000). Esto provoca una gran heterogeneidad en la distribución de organismos con poca capacidad de natación activa, como el plancton, en el que la abundancia de especies atlánticas desciende en el sentido antihorario dentro del Mediterráneo occidental (Estrada *et al.* 1985). El efecto de estas corrientes sobre la distribución de las tortugas no se tuvo en cuenta en los primeros estudios que evaluaron el porcentaje de individuos que se hallan presentes en cada zona (Laurent et al. 1993 y 1998). Considerando que los animales del Atlántico y del Mediterráneo oriental entran en el Mediterráneo occidental por sitios distintos, y que las corrientes marinas tienen una fuerte influencia en la dispersión de los juveniles de la tortuga boba (Bolten 2003), es razonable pensar que la distribución de la especie en el Mediterráneo occidental también puede ser heterogénea. Para evaluar correctamente la incidencia de las artes de pesca sobre las poblaciones nidificantes es preciso, por este

motivo, averiguar tanto la naturaleza de los movimientos de las tortugas como su distribución espacial en la cuenca..

Por todo ello, podemos concluir que, si bien se tiene un buen conocimiento de las fuentes que provocan o han provocado los actuales problemas de conservación que afectan las poblaciones de tortuga boba en el Mediterráneo, los efectos que estos problemas provocan sobre las poblaciones nidificantes (descenso de la variabilidad genética) así como las relaciones entre las fuentes de mortalidad y las poblaciones a las que afectan son aún desconocidos. La presente tesis tiene como objetivo global ampliar los conocimientos en este campo para tener una visión comprensiva del problema y poder, así, relacionar las diferentes etapas de la vida de las tortugas con los problemas a los que se enfrentan en cada caso. Así, los seis capítulos que forman esta tesis abordan cada una de estas cuestiones.

En los Capítulos 1 y 2 se evalúan los posibles efectos negativos que han podido sufrir las poblaciones nidificantes del Mediterráneo derivados de la pérdida de zonas de puesta y de la reducción de la población nidificante en el Mediterráneo oriental. Por un lado, la posible fragmentación de las poblaciones del Mediterráneo oriental podría tener efectos catastróficos a corto plazo sobre las reducidas poblaciones del Levante, fruto de la pérdida de variabilidad genética y de una elevada consanguinidad (Capítulo 1). Por otro, la reducción general del número de hembras nidificantes en las playas mediterráneas podría provocar un descenso general de la variabilidad si éstas se hallan aisladas de las playas de nidificación atlánticas, produciendo a largo plazo unos efectos negativos similares (Capítulo 2).

En los Capítulos 3, 4 y 5 se abordan las relaciones entre estas playas de nidificación y las fuentes de mortalidad por pesca que se producen en el Mediterráneo oriental. Mediante la combinación de marcadores genéticos mitocondriales (Capítulo 3) y nucleares (Capítulo 4) con la telemetría por satélite y censos aéreos (Capítulo 5) se pretende evaluar los movimientos de los juveniles dentro del Mediterráneo occidental. De este modo sería posible determinar qué zonas de alimentación son usadas por cada población nidificante (Atlántica y Mediterránea) y de esta forma establecer qué poblaciones sufren la presión pesquera de forma indirecta.

Finalmente, en el Capítulo 6, se hace un estudio global de esta interacción pesquera usando como zona piloto las Islas Baleares, en donde se determina el impacto de cada arte de pesca sobre la población de juveniles de tortuga boba.

Objetivos

"Lo importante en ciencia no es tanto obtener nuevos hechos como descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos".

Albert Szent-Györgyi (1893-1986); bioquímico y biólogo molecular húngaro.

El objetivo principal de la presente tesis consiste en identificar qué segmento de las poblaciones de tortuga boba se ve afectado por la mortalidad causada por las actividades pesqueras en el Mediterráneo occidental y, a partir de esta información, evaluar los efectos de dicha mortalidad sobre la viabilidad genética de las poblaciones. Para responder a estas preguntas ha sido necesario determinar la estructura genética de las poblaciones, conocer cómo se mezclan en las zonas de alimentación los juveniles procedentes de las diferentes zonas de nidificación, y establecer el alcance de la mortalidad de origen antropogénico en las distintas zonas de alimentación. En consecuencia, los objetivos secundarios de la tesis han sido los siguientes:

- 1) Determinar la estructura genética, la intensidad del flujo génico y la presencia de cuellos de botella recientes en las poblaciones nidificantes del Mediterráneo oriental. Con esta información se pretende evaluar qué unidades de manejo deben considerarse para preservar la variabilidad genética del Mediterráneo oriental.
- 2) Determinar el grado de aislamiento de las poblaciones nidificantes del Mediterráneo oriental con respecto a las poblaciones del Atlántico y en qué medida dicho aislamiento, en caso de existir, afecta a la diversidad genética de las poblaciones del Mediterráneo oriental.
- 3) Evaluar la utilidad de diferentes marcadores genéticos para determinar la población de origen de los juveniles de tortuga boba presentes en el Mediterráneo occidental.

4) Identificar qué zonas de alimentación son usadas por los juveniles de cada población mediante el uso de diferentes marcadores genéticos, telemetría por satélite y censos aéreos y relacionarlas con las características hidrográficas de la zona.

5) Establecer los patrones de migración de los juveniles de tortuga boba en el Mediterráneo occidental así como sus preferencias de hábitat para entender por qué ciertos artes de pesca producen un mayor volumen de capturas accidentales de tortugas marinas usando telemetría por satélite y censos aéreos

6) Identificar si existen otros artes de pesca, además del palangre de superficie, que generan un volumen relevante de capturas incidentales en las fases juveniles de la especie.

Material y Métodos

"Cada frase que pronuncio no puede considerarse una afirmación sino una pregunta".

Niels Bohr (1885-1962); físico danés, premio Nobel.

La obtención de muestras de la tortuga boba presenta una serie de problemas logísticos no despreciables. Por un lado son animales esquivos y que se hallan dispersos en grandes extensiones de mar abierto, por lo que se requiere un esfuerzo considerable para conseguir unas pocas muestras. Esta dificultad se atenúa parcialmente en las playas de nidificación, ya que en el momento de la reproducción las hembras de la especie se concentran tanto en el tiempo como en el espacio. Sin embargo, el número de hembras en ciertas zonas de nidificación es tan bajo (Líbano e Israel) que aún en ellas es difícil conseguir un tamaño muestral aceptable. Por otra parte, el hecho de que la tortuga boba sea una especie en peligro de extinción conlleva problemas de muestreo adicionales, tanto para obtener muestras biológicas para análisis de laboratorio como para disponer de ejemplares vivos para el trabajo de campo. Además, las precauciones que se toman para que el muestreo sea lo menos invasivo posible hacen que a veces éste no pueda realizarse de forma óptima. Así, para no alterar el comportamiento de las hembras durante la puesta, o para evitar poner en peligro la supervivencia de las crías, el muestreo de los nidos se realizó tras la emergencia de las crías, cuando se recogen los cadáveres de crías muertas durante la incubación o en el mismo proceso de emergencia. Ello hace que las muestras disponibles se hallen parcialmente degradadas y en ocasiones resulten difíciles de analizar.

Una vez en el mar, los individuos se hallan muy dispersos y se requiere una gran inversión de tiempo y dinero para localizarlos y capturarlos, lo que dificulta el estudio de las zonas de alimentación y los estudios de telemetría. A estas dificultades se le añaden las propias de trabajar en el medio marino, siendo éstas las razones por las que hasta hace relativamente poco tiempo la gran mayoría de estudios de tortugas marinas se centraban en las playas de anidación. Otra opción para trabajar con juveniles en el mar es recurrir a métodos pasivos de recogida de muestras para tener un tamaño

muestral aceptable, como por ejemplo el uso de muestras de animales varados, aún a costa de comprometer la calidad de las muestras.

Finalmente, el hecho de trabajar con una especie protegida presenta una serie de inconvenientes legales. La importación de muestras requiere permisos CITES, emitidos tanto por parte del país exportador como por el receptor, en este caso España. Ello supone largos trámites burocráticos hasta poder disponer de muestras, con el agravante de que en muchos casos los países exportadores limitan el número de muestras que se pueden exportar sin tener en cuenta los requerimientos estadísticos (Duton 1995).

1.- Análisis genéticos

1.1.- Muestreo

En total se han recolectado muestras de 112 nidos procedentes de diferentes zonas de nidificación del Mediterráneo oriental y 388 muestras de individuos procedentes de diversas zonas de alimentación del Mediterráneo occidental. Además, se incorporaron al análisis los datos previamente publicados sobre las frecuencias haplotípicas de ADN mitocondrial de las poblaciones nidificantes de Kyparissia (Encalada *et al.* 1998), Chipre y Turquía oriental (Laurent *et al.* 1998) y de las zonas de alimentación de Azores y Madeira (Bolten *et al.* 1998) y de Lampedusa (Laurent *et al.* 1998) (Figura 1, Figura 2, Tabla 1).

Tabla 1: relación de muestras para estudios genéticos consideradas en la presente tesis, indicando si se trata de una zona de alimentación o de nidificación (Tipo), el número de muestras (n), el tipo de análisis realizado (Análisis) y la referencia de donde se obtuvieron los datos en caso de no ser datos propios (Referencia). Entre paréntesis se indica la abreviatura usada para cada localidad a lo largo de la tesis.

Zona	Tipo	n	Análisis	Referencia
Zakynthos (GRE)	Nidificación	19	mtDNA/nDNA	Presente tesis
Lakonikos (GRE)	Nidificación	20	mtDNA/nDNA	Presente tesis
Kyparissia (GRE)	Nidificación	21	mtDNA	Encalada <i>et al.</i> 1998
Rethimno (CRE)	Nidificación	18	mtDNA/nDNA	Presente tesis
Chipre (CYP)	Nidificación	35	mtDNA	Laurent <i>et al.</i> 1998
Chipre (CYP)	Nidificación	10	mtDNA/nDNA	Presente tesis

Turquía oriental (ETU)	Nidificación	32	mtDNA	Laurent <i>et al.</i> 1998
Turquía occidental (WTU)	Nidificación	16	mtDNA/nDNA	Presente tesis
Israel (ISR)	Nidificación	20	mtDNA/nDNA	Presente tesis
El Líbano (LEB)	Nidificación	9	mtDNA/nDNA	Presente tesis
Azores (AZO)	Alimentación	79	mtDNA	Bolten <i>et al.</i> 1998
Madeira (AZO)	Alimentación	52	mtDNA	Bolten <i>et al.</i> 1998
SW España (Andalucía O) (SWS)	Alimentación	40	mtDNA/nDNA	Presente tesis
SE España (Andalucía E) (SES)	Alimentación	31	mtDNA/nDNA	Presente tesis
E España (C. Valenciana) (MES)	Alimentación	35	mtDNA/nDNA	Presente tesis
NE España (Cataluña) (NES)	Alimentación	112	mtDNA	Presente tesis
Pitiüses (Baleares S) (PIT)	Alimentación	32	mtDNA/nDNA	Presente tesis
Gimnesias (Baleares N) (GIM)	Alimentación	31	mtDNA/nDNA	Presente tesis
E Italia (EIT)	Alimentación	58	mtDNA	Presente tesis
W Italia (WIT)	Alimentación	49	mtDNA	Presente tesis
Lampedusa (LAM)	Alimentación	65	mtDNA	Casale <i>et al.</i> 2002

Las muestras de las playas de puesta se obtuvieron mediante la exhumación de los nidos una vez producida la emergencia, y de cada nido se muestreó un solo embrión. Las hembras se identificaron mediante el uso de marcas corporales para evitar muestrear dos nidos de la misma hembra y evitar así problemas de pseudoreplicación. En los casos en los que esto no fue posible se muestrearon todos los nidos de la localidad en un intervalo no superior a 15 días, pues se sabe que éste es el intervalo mínimo entre dos nidos puestos por una hembra en una misma temporada (Dutton 1995). De cada embrión se obtuvo una muestra de piel. Las muestras procedentes de las zonas de alimentación se obtuvieron de animales procedentes de centros de recuperación, varados en la costa o capturados en el mar. Así, se obtuvieron muestras de sangre o piel de animales vivos, a los que se marcó para no volver a muestrearlos. De los ejemplares varados muertos se les extrajo asimismo una muestra de piel, si bien la calidad de dichas muestras no fue tan buena como las de los animales vivos. Los tejidos recolectados se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o en etanol. El ADN se extrajo en cada caso usando el *QIAamp extraction kit* (QIAGEN®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Figura 1: Localización de las zonas de alimentación consideradas en los estudios genéticos. Las abreviaturas están definidas en la Tabla 1: AZO: Azores; MAD: Madeira; SWS: SW España (Andalucía Occidental); SES: SE España (Andalucía Oriental); MES: Mid E España (Comunidad Valenciana); NES: NE España (Cataluña); GIM: Gimnesias (Mallorca y Menorca); PIT: Pitiüses (Ibiza y Formentera); WIT: W Italia; EIT: E Italia; LAM: Lampedusa.

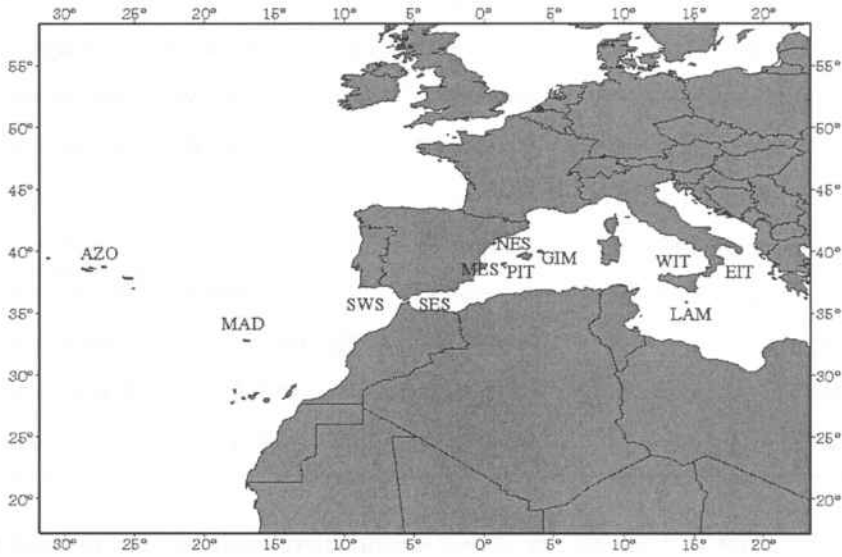
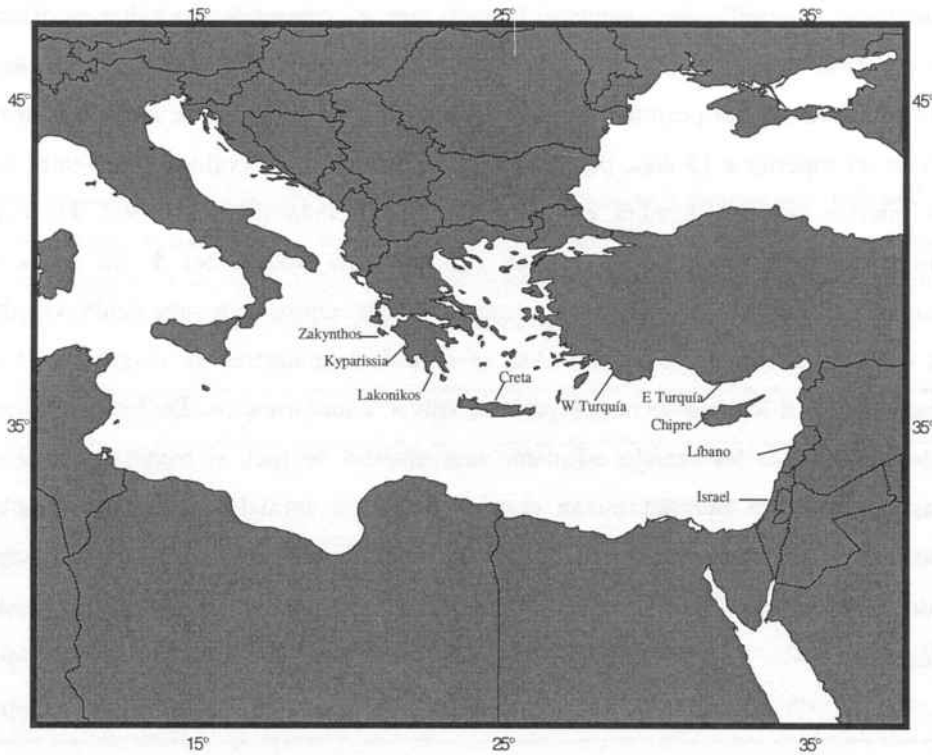


Figura 2: localización de las zonas de nidificación consideradas en los estudios genéticos.



1.2.- Región control del ADN mitocondrial (mtDNA)

Se secuenció un fragmento del *D-loop* de la región control del ADN mitocondrial mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los *primers* TCR-1 y TCR-2, TCR-5 y TCR-6 (Norman et al. 1994) o L71-H599 (Laurent et al. 1998). El protocolo de la PCR fue de 94° C durante cinco minutos, seguido de unos 30-35 ciclos a 94° C durante un minuto, 55° C durante un minuto y 72° C durante un minuto con una extensión final a 72° C durante diez minutos. El resultado de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1% y se purificó con el QIAquick kit (QIAGEN®). El producto purificado se secuenció usando el *BigDye™ Primer Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) o el *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham) y se analizó en un secuenciador automático de ADN ABI 3700 o ABI 373 (Applied Biosystems). Los haplotipos nuevos se secuenciaron en ambas direcciones para su confirmación.

1.3.- Microsatélites (nDNA)

En este estudio se han usado siete microsatélites descritos con anterioridad para la tortuga boba o bien desarrollados para otras especies de la misma familia: Cm84, Cc117, Cm72 y Ei8 (FitzSimmons *et al.* 1995); Cc141 y Cc7 (Bowen *et al.* 2005); y Ccar176 (Moore y Ball 2002). Para mejorar la amplificación y la asignación de alelos se rediseñó el primer *reverse* del locus Ccar176 (Forward: 5'-GGCTGGGTGTCCATAAAAGA-3' Reverse: 5'-CCCTAAGTAAAGATTGGCTGCT-3') a partir de la secuencia original del clon depositada en el GenBank (número de acceso AF333763). Se marcó mediante fluorescencia un *primer* de cada pareja con NED, PET, VIC o 6-FAM. Cada locus se amplificó usando un ciclo de 95° C durante dos minutos y 30 segundos, seguido de 30 ciclos a 95° durante 45 segundos, 55° C durante un minuto y 72° C durante un minuto, con una extensión final de 72° C durante cinco minutos. La longitud de los alelos se determinó usando un secuenciador automático de ADN ABI 3730 (Applied Biosystems) y se asignó usando el programa *Genemapper* (ABI PRISM® GeneMapper™ Software 3.0.).

1.4.- Estructura poblacional

ADN mitocondrial

Las secuencias se alinearon visualmente mediante la ayuda del programa BioEdit 5.0.9 (Hall 1999) y se compararon con los haplotipos ya descritos para la especie (Bolten *et al.* 1998, Encalada *et al.* 1998), disponibles en la base de datos del *Archie Carr Center for Sea Turtle Research* (<http://accstr.ufl.edu/>). Para establecer las relaciones entre haplotipos se construyó una red de haplotipos mediante el uso del programa TCS 1.02 (Clement *et al.* 2000), que usa la parsimonia estadística (SP) descrita por Templeton *et al.* (1992).

Se empleó el programa DNAsp (Rozas *et al.* 2003) para calcular la diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (π) de cada población, así como la distancia genética Γ_{st} (γ_{st} , Nei 1982) entre cada par de poblaciones. El grado de diferenciación entre pares de poblaciones dentro del Mediterráneo se determinó mediante la prueba de Chi cuadrado (Cuadras 1983) con las correcciones pertinentes para estudios genéticos incorporadas en el programa CHIRXC (Zaykin y Pudovkin 1993). No se aplicó la corrección secuencial de Bonferroni a las comparaciones múltiples, ni para los resultados de ADN mitocondrial ni para los de ADN nuclear. Esta decisión se basó en dos motivos. En primer lugar, la corrección de Bonferroni incrementa notablemente la probabilidad del error de tipo II (β : asumir la ausencia de diferencias cuando estas sí existen), situación que empeora cuantos más se reduce el nivel de significación (Perneger 1998, Cabin y Mitchell 2000, Moran 2003). En segundo lugar, consideramos que, para el manejo de una especie amenazada, aceptar un mayor riesgo de cometer un error de tipo I (α : asumir diferenciación entre poblaciones cuando no existe) es más razonable que aceptar un elevado riesgo de cometer un error de tipo II. En el primer caso, se pondrían en marcha medidas innecesarias para la conservación de la especie, algo oneroso pero reversible. En cambio, aceptar un error de tipo II llevaría a reduciría las medidas de conservación en algunas poblaciones, lo que podría comprometer su supervivencia a largo plazo.

El número de migrantes (Nm) entre cada par de poblaciones se calculó a partir de las distancias genéticas mediante la ecuación $Nm = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{\text{Gamma}_s} - 1 \right)$ (Takahata y Palumbi 1985).

Microsatélites

Se usó el programa GENECLASS (Piry *et al.* 2004) para calcular diferentes medidas de variabilidad como la diversidad génica (H_e), la heterozigosidad (H_o) o el número de alelos (k). Además, se usó el programa FSTAT (Goudet 1995) para determinar si las poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg y calcular el coeficiente de consanguinidad (F_{is}). Como no se cumplían el requisito de normalidad, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para detectar diferencias en estos parámetros entre las poblaciones estudiadas, usando para ello el programa STATISTICA 6.0.

Se llevaron a cabo tests de diferenciación entre pares de poblaciones (F_{st}) tanto dentro del Mediterráneo como entre las poblaciones del Mediterráneo y los individuos Atlánticos de las zonas de alimentación del Mediterráneo occidental. Además, se evaluó cualquier desequilibrio de ligamiento entre pares de loci. El nivel de significación para la diferenciación entre poblaciones se calculó mediante cadenas aleatorias de Markov (Guo y Thompson 1992). Se usó el método de Fisher, que asume independencia estadística entre loci, para combinar los resultados de las pruebas entre poblaciones para los siete loci (Raymond y Rousset 1995). Para detectar aislamiento por distancia entre las poblaciones nidificantes del Mediterráneo oriental se empleó una prueba de Mantel. Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa Genepop 3.4 (Raymond y Rousset 1995). Las distancias geográficas para la prueba de Mantel se calcularon con la ayuda del programa ArcView 3.1[®]. También se usó el programa Bottleneck 1.2 (Cornuet y Luikart 1996) para detectar cuellos de botella recientes en las poblaciones de estudio. De acuerdo con la recomendación de los autores del programa para el caso concreto de los microsatélites, se empleó el modelo en dos fases (TPM), ya que los microsatélites consisten generalmente en mutaciones de un solo paso con un pequeño porcentaje (5%-10%) de cambios de más de un paso. Además, las distancias genéticas halladas en las poblaciones nidificantes del Mediterráneo se compararon con

las calculadas previamente entre las poblaciones del Atlántico norte (Bowen *et al.* 2005) mediante una t de Student, ya que los datos cumplieron los requisitos de normalidad y homocedasticidad.

El número de migrantes entre cada par de poblaciones (Nm) se calculó a partir de los valores de F_{st} empleando la ecuación $Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{st}} - 1 \right)$ (Wright 1951). Sin embargo, las estimas de flujo génico basadas en los valores de F_{st} se asientan sobre las asunciones del modelo de isla que incluyen idéntico tamaño poblacional y tasas de migración simétricas, asunciones que raramente se dan en poblaciones naturales (Whitlock y McCauley 1999). Por estos motivos, incluimos, además, estimas de flujo génico nuclear calculadas mediante un método de máxima probabilidad basado en las teorías de coalescencia (Beerli y Felsenstein 1999) e incorporado en el programa MIGRATE vers. 1.7.6.1. (Beerli 2002). En todos los análisis se usó la configuración por defecto del programa y se hicieron bajo el *allele model* en vez del '*microsatellite model*' ya que las distribuciones de frecuencia observadas no encajan estrictamente con el Modelo de mutación por pasos (SMM). Ya que los problemas de convergencia son comunes en las estimas con cadenas de Markov, realizamos cada análisis cinco veces, presentándose la media y la desviación de todas las réplicas. Mediante un test de Wilcoxon comparamos las estimas de flujo génico (Nm) obtenidas tanto en base al ADN mitocondrial como en base al ADN nuclear.

La estructura poblacional también se evaluó mediante el programa STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.* 2000), que incorpora un método bayesiano de agrupamiento para identificar el número más probable de poblaciones (K) sin usar información previa sobre la el origen de cada muestra. El programa agrupa los individuos en K poblaciones hasta alcanzar el equilibrio de Hardy-Weinberg y el equilibrio de ligamiento. Para ejecutarlo, se siguió la estrategia descrita por Evanno *et al.* (2005), consistente en hacer correr el programa 20 veces para cada valor de K (desde 1 hasta 15). La longitud del *burn-in* fue de 10.000 y la longitud de las MCMC (cadenas de Markov Monte-Carlo) de 100.000, ya que pruebas preliminares mostraron que cadenas más largas no alteraban sustancialmente los resultados. Para detectar el número de clusters en nuestra muestra se empleó el estadístico *ad hoc* ΔK (Evanno *et al.* 2005)

así como el estadístico $Pr(X/K)$. Una vez determinado el número de poblaciones, se comprobó si cada individuo se reasignaba correctamente a su población de origen.

Además, se empleó el programa GENECLASS 2.0 para identificar migrantes de primera generación (Piry *et al.* 2004). Los valores de probabilidad fueron determinados, de nuevo, usando el método de Monte-Carlo, simulando 1.000 individuos y utilizando un nivel de significación de 0,05 (Paetkau *et al.* 2004).

Finalmente, estimamos el tamaño de la población adulta real con el objetivo de determinar si este parámetro podía estar relacionado con la variabilidad genética de cada población. La estima se realizó a partir de los valores de nidificación anuales indicados por Margaritoulis *et al.* (2003) y Khalil *et al.* (2005) y aplicando posteriormente un factor de corrección de 1,48. Este factor de corrección se calculó asumiendo una razón de sexos 1:1, una media de 3,49 nidos por temporada y hembra y un intervalo de remigración medio de 2,59 años (Miller 1997).

1.5.- Determinación del origen de los individuos en zonas de alimentación

Estructuración de las zonas de alimentación

La estructuración genética de las zonas de alimentación, o lo que es lo mismo, la heterogeneidad en las frecuencias haplotípicas o alélicas de las tortugas que ocupan las distintas zonas de alimentación del Mediterráneo occidental, se determinó empleando los métodos utilizados normalmente para analizar la existencia de estructuración genética entre poblaciones. Las diferencias en las frecuencias haplotípicas del ADN mitocondrial se estableció mediante la prueba Chi cuadrado (Cuadras 1983). Las frecuencias observadas se compararon con las esperadas al combinar aleatoriamente mediante el método de Monte-Carlo los individuos muestreados de todas las poblaciones (Rolf y Bentzen 1989), tal y como está implementado en el programa CHIRXC (Zaykin y Pudovkin 1993). Mediante este método, no es necesario agrupar haplotipos hallados en baja frecuencia. Además, se realizó la prueba Snn (Hudson 2000), ya que incorpora al análisis información sobre la divergencia entre secuencias. Para realizarla se empleó el programa DNAsp 4.0 (Rozas *et al.* 2003). El mismo programa se usó para calcular las distancias genéticas Gamma_{st} (γ_{st} ; Nei 1982) entre

zonas de alimentación, que se emplearon posteriormente para reconstruir un árbol de proximidad (*neighbour-joining cluster*). La prueba de Mantel, ejecutada mediante el programa GENEPOP (Raymond y Rousset 1995), fue empleada para determinar si las distancias genéticas entre zonas de alimentación se correlacionan con las distancias geográficas que las separan. Para comprobar si la corriente Liguro-Provenzal (Millot 1987) influye en la estructuración genética de las zonas de nidificación que están en su recorrido, se calculó la correlación no paramétrica (Rho de Spearman) entre la abundancia relativa del haplotipo CC-A2 (compartido por las zonas de nidificación del Atlántico y del Mediterráneo pero con una frecuencia mucho mayor en este último) y la distancia a las zonas de alimentación de Italia oriental, situadas en el punto de origen de esta corriente. Se realizaron dos pruebas independientes, una considerando la menor distancia geográfica entre cada par de zonas de alimentación y la otra considerando la distancia geográfica a lo largo de la corriente Liguro-Provenzal. El mismo análisis se realizó para evaluar la contribución de la Corriente Argelina (Millot 1987) a la abundancia relativa del haplotipo CC-A1 (exclusivo de las zonas de nidificación del Atlántico) en las zonas de alimentación bajo su influencia. Como en este caso, la distancia mínima y la distancia a lo largo de la corriente son las mismas y se realizó una sola prueba.

Para los microsatélites se llevaron a cabo tests de diferenciación entre pares de poblaciones (F_{st}), además de evaluar cualquier desequilibrio de ligamiento entre pares de loci. Los niveles de significación para la diferenciación entre poblaciones se calcularon mediante cadenas aleatorias de Markov (Guo y Thompson 1992). Se usó el método de Fisher, que asume independencia estadística entre loci, para combinar los resultados de las pruebas entre poblaciones para los siete loci (Raymond y Rousset 1995). Al no tratarse de poblaciones, sino de mezclas de diferentes poblaciones, no se estimó conveniente evaluar la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg.

La talla media (LRC) de los ejemplares procedentes de las diferentes zonas de alimentación muestreadas se comparó mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguida de una prueba *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. No se incluyeron datos sobre la talla de los ejemplares de Madeira, Azores y Lampedusa, al no estar presentes en las referencias originales.

Análisis de agregados mixtos (Mixed Stock Analysis)

Para evaluar la contribución de cada población nidificante a cada zona de alimentación se realizó un análisis de agregados mixtos o *Mixed Stock Analysis* (MSA). No obstante, la aproximación tradicional de máxima probabilidad utilizada en este método proporciona resultados sesgados cuando aparecen haplotipos o alelos con frecuencias menores al 5%, inconveniente que se soluciona mediante el empleo de métodos bayesianos (Pella y Masuda 2001). Esta consideración resultó crucial en el presente estudio, pues la región control del *D-loop* del ADN mitocondrial en la tortuga boba se caracteriza por la presencia de haplotipos raros tanto en las zonas de nidificación como en las zonas de alimentación, y lo mismo sucede con los microsatélites, donde es frecuente la presencia de alelos en baja frecuencia. Los métodos bayesianos jerárquicos permiten, además, combinar la información genética con datos ecológicos, como el tamaño poblacional, para evitar así la sobrerrepresentación de aquellas zonas de nidificación utilizadas por muy pocas hembras, como suele pasar con otros métodos bayesianos (Okuyama y Bolker 2004). Por eso, el programa Bayes (Pella y Masuda 2001) se utilizó de dos formas diferentes. El modelo bayesiano BM1 no consideró el tamaño poblacional mientras que el modelo BM2 ponderó la contribución de cada zona de nidificación teniendo en cuenta el tamaño poblacional de las zonas de nidificación. Las frecuencias haplotípicas de las zonas de nidificación del Atlántico (Noroeste de Florida (NWFL), Sur de Florida (SFL), Noreste de Florida y Carolina del Norte (NEFL-NC), Dry Tortugas y Méjico) se obtuvieron de Encalada (1998) y Bowen (2005), mientras que las frecuencias haplotípicas de las zonas de nidificación de Grecia, Turquía, Israel y Chipre se obtuvieron de Laurent *et al.* (1998) y de los trabajos en las playas de nidificación realizados para la presente tesis. Las frecuencias alélicas de los microsatélites en el Atlántico y Mediterráneo se obtuvieron de los resultados de los trabajos en las zonas de nidificación de esta tesis. Las frecuencias alélicas de las poblaciones atlánticas se estimaron a partir de las frecuencias halladas en los ejemplares portadores del haplotipo CC-A1 procedentes de las zonas de alimentación mediterráneas, pues dicho haplotipo es exclusivo de las playas de nidificación del Atlántico y no se ha hallado diferenciación entre poblaciones Atlánticas (Bowen *et al.* 2005). Los tamaños de las poblaciones nidificantes se obtuvieron de los trabajos publicados por Margaritoulis *et al.* (2003), Ehrhart *et al.* (2003) y Khalil *et al.* (2005). Se empleó el llamado *Gelman-Rubin shrink factor* para

detectar un funcionamiento anómalo de la distribución predictiva posterior de Bayes (Pella y Masuda 2001). Los valores superiores a 1,20 indican una falta de convergencia en el algoritmo y las estimas resultantes se consideraron poco creíbles, por lo que debe aumentarse el número de permutaciones hasta lograr la convergencia. Los análisis se realizaron, además, agrupando las zonas de nidificación en tan sólo dos regiones (Atlántico y Mediterráneo).

Pruebas de asignación

Los microsatélites permiten asignaciones individuales mediante el uso del programa STRUCTURE 2.1 (Pritchard et al. 2000), que utiliza un método de agrupación bayesiano mediante el cual se calcula la probabilidad de cada individuo de pertenecer a una zona de nidificación concreta. Como datos de referencia se emplearon las frecuencias alélicas de los microsatélites en las playas de nidificación obtenidas durante la realización de la presente tesis. A cada individuo se le asignó una probabilidad de pertenecer a las zonas de nidificación atlánticas o a las zonas de nidificación del Mediterráneo.

2.- Estudio de interacción con pesca

Para evaluar la incidencia de los diferentes tipos de artes de pesca sobre la captura accidental de tortugas bobas en el Mediterráneo occidental se realizó un estudio comparativo en las Islas Baleares. Entre mayo y agosto del 2002 se llevó a cabo una encuesta a todos los puertos de Baleares destinada a caracterizar el comportamiento de la flota balear (artes usados, épocas del año, zonas de pesca...) y para averiguar la percepción que tienen los pescadores de las interacciones con tortugas (Anexo 1). La encuesta se elaboró a partir de una similar que el Grupo de Biología de la Conservación del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Barcelona había usado en un estudio previo y con los mismos objetivos en un estudio sobre el delfín mular (*Tursiops truncatus*) (UB 2002). El diseño de la encuesta se realizó bajo la supervisión de la Fundación Centro de Iniciativas e investigaciones Europeas en el Mediterráneo (CIREM), con las modificaciones pertinentes para el caso de la tortuga boba.

A partir de los datos proporcionados por la Dirección General de Pesca del *Govern de les Illes Balears* sobre el número y tipología de barcas de pesca profesionales del archipiélago, se diseñó un muestreo estratificado, destinado a cubrir como mínimo una cuarta parte de las embarcaciones de cada modalidad (arrastre, cerco, palangre de superficie y artes menores). Cuando el número de embarcaciones de una determinada modalidad era muy bajo, se intentó encuestarlas todas. La unidad de estudio fue la embarcación, de forma que sólo se encuestó un pescador de cada una de ellas.

Para asegurar la aleatoriedad del muestreo, el observador dedicó un día completo a cada puerto, entrevistando a todos los pescadores que pudo encontrar en ese día. Si se hubieran escogido determinadas horas del día se hubiera corrido el riesgo de no entrevistar determinados pescadores de un arte, ya que las variaciones horarias entre artes son notables. Este hecho es muy importante en artes menores ya que todos los pescadores usan el mismo tipo de embarcación. En el resto de artes, con embarcaciones bien diferenciadas, este problema no existe.

La segunda parte de la encuesta trató sobre las tortugas, su distribución, abundancia y tendencias de la población, con la inclusión de preguntas sobre las posibles causas del declive, en caso de que el entrevistado opinara que éste se producía. Este grupo de preguntas permitió dirigir la conversación hacia las tortugas en concreto y reducir así la desconfianza del pescador al hablar de las tortugas pero sobre temas que no le comprometían. A continuación, se preguntó sobre temas relacionados con la interacción entre la pesca y las tortugas, tanto a nivel general como en el caso particular del pescador. De nuevo, estas preguntas estaban dirigidas a mejorar la sinceridad de las respuestas, ya que los pescadores se sienten muy identificados con su colectivo y tienden a contestar las preguntas dirigidas a los pescadores “en general”, aportando su caso particular como ejemplo. El disponer de dos respuestas a la misma pregunta permitía descubrir contradicciones que delaten una falta de sinceridad. En este apartado se abordaron todos los problemas que se pueden dar con la pesca, empezando por las capturas incidentales (remarcando el hecho de que son “por accidente” y por tanto “inevitables”) y dejando para el final las cuestiones más delicadas, como el consumo directo o las capturas voluntarias, debido a que requieren una “voluntad” y un elevado grado de sinceridad del pescador para contestarlas.

Las encuestas se realizaron en los meses de junio, julio y agosto, debido a que en este periodo se concentra la mayor actividad de pesca y no hay dificultades para encontrar a los pescadores en el puerto. Como las preguntas se refieren a la totalidad del año anterior, el hecho de realizarlas en un periodo concreto no afecta a la validez de lo que se quiere averiguar.

2.1.- Cuantificación del esfuerzo de pesca

Una parte fundamental en el estudio de las interacciones entre las tortugas marinas y la pesca consistió en caracterizar el comportamiento de la flota balear, es decir, determinar qué artes se usan y qué esfuerzo se realiza con cada uno de ellos a lo largo del año y por cada tramo de costa. En el caso de los artes mayores, cada embarcación opera con el mismo tipo de arte toda la temporada, ya que la embarcación se ha construido pensando en el empleo de dicho arte y no resulta posible modificarla. Sin embargo, las embarcaciones de artes menores pueden operar con diversos aparejos

que van cambiando a lo largo del año, e incluso pueden operar con más de un arte a la vez.

En las encuestas se pidió a los pescadores que identificaran las artes empleadas el año anterior y las zonas trabajadas. Si el pescador operaba con más de un arte en un mes concreto, se repartía el esfuerzo equitativamente entre ellos; lo mismo se hacía si operaba en zonas diferentes en un mismo mes. El esfuerzo de pesca resultante, para cada zona y arte, se expresaba en meses-barca, equivalente al número de meses que una barca operaba con un arte y en una zona en concreto. De esta forma, cada barca disponía de un máximo de 12 meses-barca, que se repartía entre los artes que ha usado y las zonas visitadas en el año anterior. De esta forma fue posible calcular el esfuerzo realizado en cada zona y arte.

El siguiente paso fue extrapolar el esfuerzo derivado de las encuestas al conjunto de la flota balear. Para conseguirlo se tuvo en cuenta el porcentaje de barcas encuestadas de cada tipo y el porcentaje de esfuerzo de pesca originado en cada puerto y realizado a cada zona en concreto. El esfuerzo que la flota entera realizó en cada zona y mediante un arte concreto se calculó como:

$$E_{za} = \sum_{i=1}^{i=n} E_{zai}$$

donde E_{za} es el esfuerzo que soporta la zona z para el arte a , n es el número de puertos de Baleares y E_{zai} es el esfuerzo total que soporta la zona z para el arte a y que proviene de un puerto i .

E_{zai} se calculó como:

$$E_{zai} = E_{ozai} * \frac{n_{bai}}{n_{boai}}$$

donde E_{ozai} es el esfuerzo observado (barcas entrevistadas) sobre la zona z con el arte a que provienen del puerto i , n_{bai} es el número de barcas del puerto i que usan el arte a y n_{boai} es el número de barcas del puerto i que trabajan con el arte a y que han sido entrevistadas.

2.2.- Percepción de los pescadores sobre el estado de conservación de la población de tortugas

La encuesta incluía dos preguntas sobre la evolución interanual de la población de tortugas. Las respuestas obtenidas se agruparon por islas y posteriormente, con el objetivo de determinar si la percepción era significativamente diferente en cada isla, se compararon por parejas mediante la prueba de Chi-cuadrado (Cuadras 1983). Debido a que no se observaron diferencias significativas entre islas (ver Resultados), las respuestas de todo el archipiélago se agruparon. Posteriormente se compararon las respuestas de los pescadores de artes mayores (excluyendo el palangre de superficie) y las de los pescadores de artes menores, también mediante la prueba de Chi-cuadrado (Cuadras 1983). Esta agrupación se realizó debido a que los artes menores capturan muchas más tortugas que el arrastre y el cerco (ver Resultados) y, por consiguiente, la percepción de los pescadores podía ser muy diferente. El palangre de superficie se ha excluido debido al pequeño número de embarcaciones con base en Baleares que practican esta modalidad (ver Resultados).

A los pescadores que respondían diciendo que creían que la población de tortugas estaba en declive se les preguntó acerca de su opinión sobre la implicación de la pesca en este proceso. Como en el caso anterior, las respuestas de todo el archipiélago se agruparon y, posteriormente, se compararon mediante la prueba de Chi-cuadrado las respuestas de los pescadores de artes mayores (excluyendo el palangre de superficie) con las de los pescadores de artes menores (Cuadras 1983).

2.3.- Cuantificación de las capturas

Una de las preguntas de la encuesta fue si el encuestado había capturado alguna tortuga en el año anterior (2001). Si la respuesta era afirmativa se le solicitaba que precisara cuántas había capturado, y con que artes y en qué zonas. Estos resultados se usaron para el cálculo del número total de tortugas capturadas por la flota balear en el mencionado año. Para hacer esta extrapolación se consideró el esfuerzo entrevistado realizado por arte y zona y el esfuerzo total que se realizó en esa zona con dicho arte. Los dos parámetros se pueden obtener a partir de las preguntas destinadas a caracterizar

la flota (ver Resultados). El número total de tortugas capturadas por la flota por zona y arte (C_{tza}) fue:

$$C_{tza} = C_{eza} * \frac{E_{za}}{E_{oza}}$$

donde C_{eza} son las capturas declaradas en las encuestas en la zona z y el arte a , E_{za} es el esfuerzo de la totalidad de la flota para la zona z y con el arte a y E_{oza} es el esfuerzo observado en las encuestas para la zona z y el arte a .

Para cada zona y arte se calcularon las capturas por unidad de esfuerzo (CPUE). Esta es la forma de determinar la “eficiencia” de la flota capturando tortugas.

$$CPUE = \frac{C_{tza}}{E_{za}}$$

La suma de capturas totales de cada arte y zona nos da como resultado el número total de tortugas capturadas involuntariamente en el año 2001.

Si la distribución de tortugas y el comportamiento de los pescadores fueran uniformes en todo el archipiélago existiría una relación directa entre el esfuerzo realizado en una zona con un arte determinado y el volumen de tortugas capturadas con dicho arte y en esa zona. Para comprobar si esto es cierto, se comparó mediante la prueba de Chi-cuadrado (Cuadras 1983), y para cada arte independientemente, la distribución observada de las capturas por zonas con la distribución esperada según la distribución del esfuerzo.

En caso de hallar diferencias significativas, se midió el “rechazo”, la “preferencia” o la “indiferencia” de las capturas hacia una zona en concreto mediante el índice de electividad de Ivlev (Ivlev 1961, citado por Cardona 2000):

$$I = (p_i - p_e) / (p_i + p_e)$$

donde p_i es el porcentaje de capturas en una zona determinada y p_e es el porcentaje de esfuerzo realizado en cada zona o, lo que es lo mismo, el porcentaje de capturas de tortugas que se esperarían capturar en esa zona. Los intervalos de confianza se calcularon mediante la ecuación de Strauss (Strauss 1979).

$$E_c = \left(2 - \left(\frac{2p_e}{(p_e + p_i)} \right) \right) * \left[1 \pm z * \sqrt{ \left[2n_i * p_i * (1 - p_e) * (p_i + p_e)^2 + p_i * (1 - p_i) * n_e + p_e * \frac{(1 - p_e)}{n_i n_e (p_i + p_e)^2} \right] } \right]^{-1}$$

donde n_i es el número de tortugas, n_e es el número de zonas y z es 1,96.

2.4.- Validación de las encuestas mediante embarques

Las respuestas obtenidas de los pescadores y, de forma muy particular, las relacionadas con los aspectos conflictivos de la actividad, se han de valorar con precaución ya que pueden estar sesgadas por diversos motivos:

- Una falta de sinceridad por parte de los pescadores, a pesar de que la encuesta esta diseñada para garantizarla al máximo. El encuestador puede dejarse llevar por una impresión favorable en este sentido e ignorar que el pescador está deformando la realidad.
- Errores no deliberados en las apreciaciones del pescador. Las preguntas se refieren a todo un año y a cuestiones que no son primordiales en la vida del pescador. Puede ser que el pescador no recuerde exactamente cuántas tortugas capturó el año anterior, especialmente si estas capturas fueron relativamente elevadas (como en el caso del palangre de superficie). También puede darse el caso opuesto, es decir, que el pescador mezcle erróneamente las capturas de diferentes años si éstas son anecdóticas y perduran en la mente del pescador como hechos insólitos.

Por todos estos motivos se consideró conveniente contrastar los datos de las encuestas mediante embarques a bordo de los barcos de pesca que permitiese obtener datos directos sobre la intensidad de la interacción. Cuando fue posible, se contrastaron los resultados de las encuestas con datos obtenidos previamente por investigadores de la Universidad de Barcelona o por otros grupos de investigación en campañas de investigación, siempre que en dichas campañas se recogiese información sobre la pesca accidental de tortugas y el esfuerzo de pesca realizado. En aquellos casos en los que no se pudo disponer de datos previos, se realizaron campañas de validación *ex profeso*.

A partir de los datos de los embarques se calculó la CPUE, parámetro que se usó para comparar con la CPUE derivada de las encuestas mediante el test U de Mann-Witney.

3.- Movimientos y distribución

3.1.- Distribución temporal

La encuesta descrita en el apartado anterior, realizada con la finalidad de estimar la magnitud de la interacción con pesca, incluyó también preguntas sobre los meses en que es más frecuente ver tortugas en el mar y en que es más frecuente capturarlas. Conocer la estacionalidad de estos dos parámetros puede ser importante, pues algunos artes de pesca, como los trasmallos, son fuertemente estacionales. Para cada mes del año, tanto la frecuencia de avistamientos como de capturas se clasificaron de 0 a 3 (ninguna, pocas, algunas y muchas, respectivamente). Las respuestas dadas en cada isla se compararon para los diferentes meses mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Cuadras 1983) con la intención de detectar la existencia de diferencias estadísticamente significativas que puedan indicar la existencia de estacionalidad en la frecuencia de avistamiento o capturas.

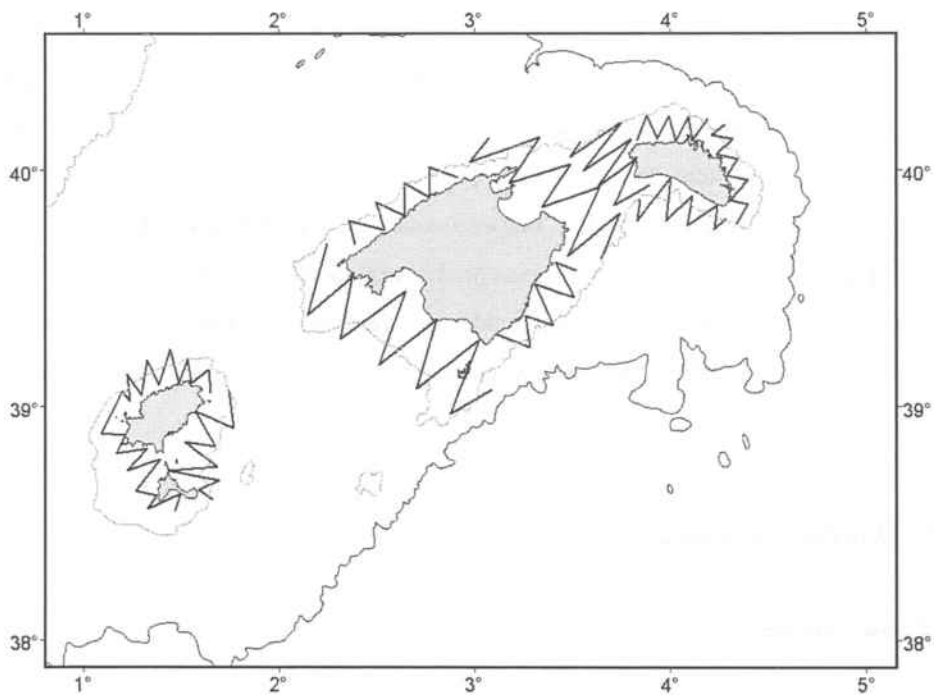
3.2.- Distribución espacial

Censos aéreos

Uno de los métodos más precisos para estimar densidad o tamaño poblacional de tortugas u otros grandes animales marinos de respiración aérea es mediante transectos lineales realizados desde una avioneta (Marsh y Saalfeld 1990; Shoop y Kenedy 1992; Epperly *et al.* 1995; Witzell y Azarovitz 1996; Preen *et al.* 1997). Por ello, de manera combinada con un estudio paralelo dirigido al delfín mular, entre marzo y septiembre de 2002 se realizó una campaña de vuelos en la zona litoral de Baleares (hasta 20 millas de costa). Para la realización de los transectos se usaron avionetas monomotores del modelo Cessna-172, de plano alto y con una autonomía de vuelo de 5 horas. Este aeroplano permite transportar 4 personas: 2 pilotos y 2 investigadores. Los vuelos realizaron siguiendo unos transectos pre-establecidos (Figura 4), a una velocidad de 140-156 km h⁻¹, una altitud fija de 500 pies (unos 150 m) y siempre con valores de Beaufort (escala de viento) inferior a 3. Los vuelos se realizaron en un espacio de

tiempo suficientemente corto como para que las tortugas no se pudiesen desplazar de una zona a otra (6 días), evitando así los posibles dobles avistamientos. Cuando se producía un avistamiento se registraba la posición del avión mediante un GPS y el ángulo respecto a la perpendicular mediante un clinómetro. Este ángulo permite calcular posteriormente la distancia perpendicular entre el animal y la vertical de la avioneta.

Figura 4: Transectos realizados con avioneta en la campaña de marzo del 2002 y septiembre del 2002



Para el cálculo de densidades se usó el método del transecto de banda o *strip transect* (Gates 1979 citado en Thompson y Shoop 1981), que ya ha sido usado anteriormente por otros investigadores en el cálculo de densidad de tortugas (Marsh y Saalfeld 1990; Preen *et al.* 1997). Este modelo supone que existe una determinada banda de mar debajo de la avioneta en la que es posible observar todos los ejemplares presentes (probabilidad de detección = 1).

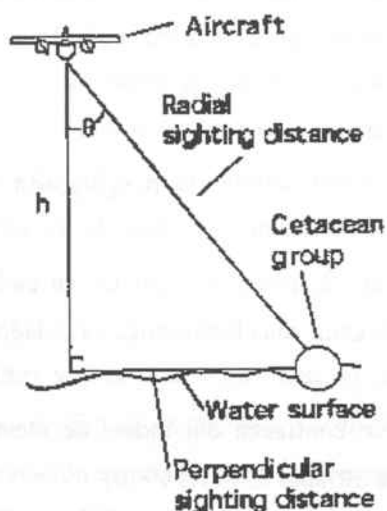
Se ha visto que el ancho de banda en la que se puede hacer esta asunción es de 200 m (Marsh y Sinclair 1989; Marsh y Saalfeld 1990; Preen *et al.* 1997). La metodología tradicional propone hacer dos marcas en las ventanillas de la avioneta de forma que el campo de visión entre marcas sea de unos 200m en cada lado. Sin embargo

hay que tener en cuenta que los movimientos laterales de la avioneta (cuando se gira o para corregir el rumbo) pueden hacer que este ancho de banda entre marcas varíe mucho y se aleje de los pretendidos 200m. Es por esta razón que se usó una metodología algo distinta, calculando directamente la distancia perpendicular a la que se encontraban los animales y posteriormente descartando los que se hallaban a más de 200 metros. Esta distancia perpendicular se puede calcular si se dispone del ángulo respecto a la vertical y la altitud a la que vuela la avioneta mediante la siguiente fórmula:

$$d = h \tan (\theta)$$

donde d es la distancia perpendicular, h es la altitud de vuelo de la avioneta y θ es el ángulo del avistamiento (en radianes) (Figura 5).

Figura 5: Cálculo de la distancia perpendicular (d) del avistamiento (sacado de Keith y Hoggard 1999).



En nuestro caso, se planteó un problema adicional dado que la avioneta no tenía el suelo de cristal, como sería deseable, y por lo tanto, se producía una pérdida de visión de unos 20° a cada lado. De esta forma, al ancho de banda usado en los análisis para calcular la superficie muestreada se ha de restar esta distancia. Combinando el ángulo de pérdida de visión y la altitud a la que vuela la avioneta, se puede calcular dicha distancia, de la misma forma que se calcula la distancia perpendicular a los animales. Así, se determinó que la distancia que se perdía por debajo de la avioneta era de 55m por cada lado, de forma que el ancho de banda efectivo se redujo a 145m.

La densidad se calculó como el número de animales n_1 que pasaron por una franja de longitud L y ancho 2Δ .

$$D = n_1 / 2L_1\Delta$$

donde D es la densidad, n_1 es el número de avistamientos de banda 1, L_1 es la longitud del transecto 1 y Δ es el ancho de banda efectivo (145m).

Se calculó la densidad, considerando la superficie muestreada, en tres zonas batimétricas según la profundidad del agua: <50 metros, 50-100 metros y de 100-200 metros. Mediante el test de la Chi cuadrado (Cuadras 1983) se determinó si los avistamientos de tortugas realizados en las tres regiones se correspondían con la superficie ocupada por cada una de dichas regiones en la plataforma continental de las Islas Baleares. En caso de observarse diferencias estadísticamente significativas, se calculó también el índice de electividad de Ivlev para cada zona batimétrica según la ecuación:

$$I = (p_i - p_e) / (p_e + p_i)$$

donde p_i es el porcentaje de tortugas avistadas en cada zona batimétrica, y p_e es el porcentaje disponible de cada zona batimétrica calculado mediante GIS.

Los intervalos de confianza del índice de electividad de Ivlev se calcularon mediante la ecuación de Strauss (Strauss 1979)

$$E_c = \left(2 - \left(\frac{2p_e}{(p_e + p_i)} \right) \right) * \left[1 \pm z * \sqrt{ \frac{2n_i * p_i * (1 - p_e) * (p_i + p_e)^2 + p_i * (1 - p_i) * n_e + p_e * \frac{(1 - p_e)}{n_i n_e (p_i + p_e)^2} }{n_i n_e (p_i + p_e)^2} } \right]^{-1}$$

donde n_i es el número total de tortugas avistadas, n_e es el número de puntos usados para definir la disponibilidad de hábitat (Smith y Sandwell 1997) y z es 1,96.

Telemetría por satélite

Con el fin de determinar los movimientos de las tortugas a medio plazo se colocaron transmisores por satélite Telonics ST-18 a 5 tortugas juveniles capturadas en

abril de 2003 en los alrededores de la isla de Formentera,. Los individuos se capturaron por inmersión mientras estaban calentándose al sol en áreas de la plataforma continental de menos de 200 metros profundidad y fueron trasladados a tierra, donde se les colocó el transmisor. La talla media de las tortugas fue de 41,36 cm de longitud recta del caparazón (LRC), ligeramente inferior a la media de (50,21 cm LRC) registrada en los animales capturados por el palangre de superficie en estudios previos (Mayol *et al.* 1988). Comparativamente, la LRC media de las muestras recogidas para genética fue de 49,6 cm. Además de proporcionar información sobre la localización de las tortugas, el transmisor de satélite proporcionó información sobre el tiempo en superficie ya que estaba equipado con un contador que se activaba cuando el animal estaba en superficie. Los transmisores pesaban 275 g, equivalente a menos del 3% del peso de la tortuga, y fueron fijados al caparazón con fibra de vidrio y resina de poliéster siguiendo la metodología descrita por Balazs *et al.* (1996). Una vez marcadas, las tortugas se mantuvieron en un tanque de fibra de vidrio al menos durante 24h para asegurar el correcto anclaje del transmisor. Los animales se liberaron en el mismo lugar de captura, que fue determinado mediante GPS. A fin de ahorrar batería, los transmisores se programaron para alternar ciclos de 8 horas en funcionamiento con 24 horas de desconexión,.

Los datos fueron recibidos y procesados mediante el Servicio Argos (Argos 2000). El sistema Argos asigna un índice de calidad (*location class* o LC) a cada localización del animal. La desviación estimada, tanto en longitud como en latitud, es de <150 m para LC3, entre 150 m y 300 m para LC2, entre 300 y 1.000 para LC1 y >1.000 para LC0. Argos no proporciona ningún rango para LCA, LCB o LCZ pero Hays *et al.* (2001) demostraron que LCA es tan preciso como LC1, y más fiable que LC0 o LCB.

Los modelos de difusión denominados *correlated random walks* proporcionan el marco conceptual para cuantificar el movimiento de un organismo y para explicar sus patrones de movimiento (Turchin 1991). A pesar de que el movimiento de las tortugas es continuo, el seguimiento por telemetría sólo proporciona un número discreto de posiciones, por lo que la reconstrucción del recorrido de los animales se hizo conectando puntos sucesivos con líneas rectas. Para ello se realizó un filtrado de los datos, utilizando únicamente la posición de mayor calidad de cada ciclo de 32 horas (8

horas de conexión seguidas de 24 horas de desconexión). Los criterios empleados para el filtrado fueron los siguientes: error de localización inferior a 1 kilómetro (es decir LC3, LC2, LC1 y LCA) y una velocidad de desplazamiento inferior a 5 km/h (Luschi *et al.* 1998; Argos 2000; Hays *et al.* 2001). A pesar de eso, y de forma muy ocasional, se usó algún punto de menor calidad cuando no fue posible cumplir estos requisitos durante un ciclo de 32 h (Luschi *et al.* 1998). Nunca se usaron posiciones en tierra firme. Una vez realizado el filtrado de los datos, cada ruta se reconstruyó mediante el uso de SIG (Sistemas de Información Geográfica) para recrear el camino recto entre posiciones consecutivas. A continuación, se calcularon para cada tramo la velocidad de desplazamiento, la dirección y el ángulo de giro (la dirección del tramo actual con respecto a la dirección del tramo anterior). Mediante el uso del SIG, y a partir de una base de datos batimétrica de 1'x1' (latitud x longitud; Smith y Sandwell 1997), se determinó también la profundidad de la columna de agua bajo cada punto. A partir de esta información, se clasificaron las localizaciones como neríticas (entre 0 y 200 metros de profundidad), en talud (entre 200 metros y 1.400 metros de profundidad) y oceánicas (más de 1.400 m de profundidad). Los animales sólo podrían llegar a usar el fondo marino en el medio nerítico de la plataforma continental, ya que el record de inmersión en tortuga boba ha sido establecido en 233 m (Lutcavage y Lutz 1997). El talud y las aguas oceánicas abiertas se consideraron como hábitats diferentes ya que están formadas por masas de agua que difieren en productividad, origen y estabilidad (Pinot *et al.* 1994; Estrada *et al.* 1996). El SIG se usó también para determinar la superficie de cada tipo de hábitat en las dos regiones usadas por las tortugas marcadas, la Cuenca Argelina y el Mar Balear. La información se clasificó en tres categorías temporales para los análisis: mañana (desde la salida del sol hasta el mediodía), tarde (desde el mediodía hasta la puesta del sol) y noche (desde la puesta a la salida del sol). Durante el período de estudio la salida del sol varió entre las 05:22 hasta las 04:34 GMT y la puesta desde las 18:11 hasta las 19:06 GMT, de acuerdo con los datos proporcionados por la Estación Meteorológica del Aeropuerto de Menorca. A cada punto de le asignó una de estas categorías, por lo que el tramo entre puntos puede alargarse por estas tres categorías.

Mediante la prueba de Chi-cuadrado (Zar 1984) se determinó si el uso del hábitat, calculado como porcentaje de puntos en cada hábitat, coincidía con la disponibilidad del mismo, cuantificado como porcentaje de cada hábitat respecto al área total. Cuando la prueba de Chi-cuadrado determinó que el uso de hábitat no se

correspondía con la disponibilidad, se usó el Índice de Electividad de Ivlev (Ivlev 1961, citado por Cardona 2000) para determinar si el uso, para cada hábitat, era mayor o menor de lo esperado. El índice se calculó como:

$$I=(p_t-p_e)/(p_e+p_t)$$

donde p_t es el porcentaje de puntos en cada zona, y p_e es el porcentaje de disponibilidad de hábitat. En este caso p_e también equivaldría al porcentaje de puntos de tortuga esperados en cada hábitat si su uso estuviera relacionado con la disponibilidad.

Los intervalos de confianza del índice de electividad de Ivlev se calcularon mediante la ecuación de Strauss (Strauss 1979)

$$E_c = \left(2 - \left(\frac{2p_e}{(p_e + p_t)} \right) \right) * \left[1 \pm z * \sqrt{ \left[2n_t * p_t * (1 - p_e) * (p_t + p_e)^2 + p_t * (1 - p_t) * n_e + p_e * \frac{(1 - p_e)}{n_t n_e (p_t + p_e)^2} \right] } \right]^{-1}$$

donde n_t es el número total de puntos, n_e es el número de puntos batimétricos usados para definir el hábitat (Smith y Sandwell 1997) y z es 1,96.

Mediante la prueba de Rayleigh (Zar 1984) se determinó si las tortugas tenían un rumbo y un ángulo de giro preferentes. Los valores medios se calcularon siguiendo la metodología de Zar (1984). El coeficiente de correlación de Spearman (Zar 1984) se calculó para determinar si el valor absoluto del ángulo de giro y la velocidad estaban correlacionados. Mediante un análisis de la variancia con dos factores (ANOVA; Zar 1984) se determinó si las tortugas individuales (factor 1) y el dominio batimétrico (factor 2) influían en la velocidad de desplazamiento o en el coseno del ángulo de giro. Como los datos no cumplían el requisitos de normalidad, se realizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis (Zar 1984) para detectar diferencias en el tiempo de superficie en los distintos intervalos de tiempo: mañana, tarde y noche.

Resultados

"No hay nada nuevo bajo el sol,
pero cuántas cosas viejas hay que no conocemos".
Ambrose Bierce (1842-1914); escritor estadounidense.

1.- Análisis Genéticos

1.1.- Estructura poblacional

ADN mitocondrial

En las áreas de nidificación del Mediterráneo se encontraron un total de cinco haplotipos. De éstos, los haplotipos CC-A2 y CC-A3 ya habían sido descritos, tanto para las zonas de nidificación del Atlántico como las del Mediterráneo (Encalada *et al.* 1998, Laurent *et al.* 1998), mientras el haplotipo CC-A6 había sido descrito únicamente para las playas de nidificación del Mediterráneo (Encalada *et al.* 1998). Finalmente, los haplotipos CC-A29 y CC-A32 no habían sido descritos con anterioridad en ninguna zona de nidificación.

El haplotipo CC-A32 difiere en una sustitución tanto del haplotipo CC-A3 (hallado en Turquía oriental y occidental) como del CC-A6 (hallado en Grecia), por lo que la red de haplotipos elaborada mediante el programa TCS presentó una ambigüedad. Ahora bien, la localización geográfica de los haplotipos permitió aclarar dicha ambigüedad, ya que el haplotipo CC-A32 sólo se encuentra en Zakynthos, localidad que también presenta el haplotipo CC-A6 pero no el haplotipo CC-A3. Además, los haplotipos CC-32 y el CC-A6 comparten un *gap* y difieren en una transición, mientras que los haplotipos CC-32 y CC-A3 difieren en el antes mencionado *gap* pero comparten la transición. Todo ello sugiere que el haplotipo CC-A32 deriva del CC-A6, pues resulta más probable que la transición haya aparecido dos veces de forma independiente a que lo haya hecho el *gap*.

En las playas de nidificación de Chipre se han hallado un único haplotipo, tanto en los estudios anteriores como en los realizados para la redacción de esta tesis. Como los datos de Laurent *et al.* (1998) incluían más individuos, consideramos más conveniente usar solamente los primeros para los análisis de ADN mitocondrial. Los datos de ambos estudios no se combinaron para evitar cualquier riesgo de pseudoreplicación. Sin embargo, los dos grupos de datos de Turquía diferían claramente en sus frecuencias haplotípicas (Chi-cuadrado, $P < 0.05$), a pesar de compartir los mismos haplotipos (CC-A2 y CC-A3). Como dichos datos provienen de dos áreas diferentes, una en la costa oriental y otra en la costa occidental, se han considerado unidades independientes en todos los análisis posteriores.

Las comparaciones entre pares de poblaciones revelaron diferencias estadísticamente significativas a pesar de que todas las poblaciones comparten el haplotipo CC-A2 (distancia genética global $\gamma_{st} = 0.212$, $P < 0.001$, Tabla 2 para comparaciones por parejas). Las zonas de nidificación de Zakynthos, Lakonikos y Kyparissia presentaron los haplotipos CC-A2 y CC-A6 en frecuencias muy similares y las diferencias entre ellas no fueron significativas. En consecuencia, todas estas localidades fueron agrupadas bajo el nombre de Grecia (GRE) para los análisis posteriores. Las zonas de nidificación de Chipre, Creta y el Líbano presentaron solo el haplotipo CC-A2 (Tabla 2) y por eso podrían considerarse homogéneas. Sin embargo, no se agruparon ya que los análisis con ADN nuclear (siguiente sección) revelaron diferencias significativas entre algunas de estas poblaciones. Al comparar las frecuencias haplotípicas de Grecia con las observadas en el resto de las localidades, se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre Grecia, Israel y Turquía oriental (Tabla 2).

Microsatélites

La amplificación de algunos microsatélites (Cc141, Ccar176 y Ei8) fue difícil o imposible en ciertas muestras, probablemente debido al estado degradado de los embriones empleados para el análisis. En consecuencia, el tamaño muestral para esos marcadores fue en ciertas poblaciones menor del esperado. Estos problemas fueron especialmente severos para el microsatélite Ei8 en la población de Zakynthos y, por esta razón, todas las pruebas estadísticas se realizaron dos veces, una vez incluyendo

este marcador y otra sin él. Al no observarse ninguna diferencia, el locus se conservó para análisis posteriores, ya que podía ser informativo para otras comparaciones que no incluyan a Zakynthos.

Todos los microsatélites estudiados resultaron ser altamente polimórficos en el conjunto de las playas de nidificación del Mediterráneo oriental; el número total de alelos osciló entre 6 (Cm72) y 15 (Cc7), con una media de 10,86 alelos por microsatélite. Todas las poblaciones se hallaban en equilibrio Hardy-Weinberg, incluso el conjunto de individuos atlánticos muestreados en el Mediterráneo occidental (Chi cuadrado, $P > 0,05$). Sólo la agrupación de todas las muestras de las playas de nidificación del Mediterráneo estaba en desequilibrio (Chi cuadrado, $P > 0,05$), lo que demuestra la presencia dentro de este grupo de varias poblaciones entre las cuales los apareamientos no se realizan al azar. Además, no se halló desequilibrio de ligamiento entre ningún par de loci (Chi cuadrado, $P > 0,05$) por lo que se puede asumir su independencia. La heterozigosidad observada fue muy variable, oscilando entre $H_o = 0,03$ (Cm72 en Grecia) y $H_o = 0,94$ (Cc7 en Israel). La diversidad génica también fue muy variable, hallándose comprendida entre $H_e = 0,03$ (Cm72 en Grecia) y $H_e = 0,87$ (Cc7 en Israel). Sin embargo, los valores medios de H_e y H_o , así como el número medio de alelos (k) o del coeficiente de consanguinidad (F_{is}) no fueron significativamente diferentes ni entre las poblaciones del Mediterráneo ni entre estas y la muestra de individuos atlánticos (Kruskal-Wallis; $P > 0,01$ en todos los casos) a pesar de las grandes diferencias de tamaño poblacional existentes. Además, no se detectó ningún cuello de botella reciente para ninguna población bajo el modelo TPM (Wilcoxon test $P > 0,05$).

El cálculo de la F_s reveló la existencia de estructuración genética entre el conjunto de las poblaciones analizadas ($F_{st} = 0,029$, $P < 0,001$), siendo el grupo atlántico significativamente diferente del mediterráneo ($F_{st} = 0,025$, $p < 0,001$). Además, los mayores valores de F_{st} se encontraron entre el grupo de individuos atlánticos y una población mediterránea (Tabla 2). Dentro del Mediterráneo también se observó estructuración genética, aunque a menor escala ($F_{st} = 0,005$, $P < 0,001$). En este caso, Israel, Turquía occidental, Grecia y Chipre resultaron ser significativamente diferentes los unos de los otros ($P < 0,05$) a excepción del par Chipre-Turquía ($P = 0,06$). Creta fue diferente de Turquía, pero Chipre no difirió del resto (Tabla 2). Estas diferencias dentro del Mediterráneo no se pueden explicar por aislamiento por distancia, al no existir

correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica (prueba de Mantel, $P > 0,05$). Además, las distancias genéticas dentro del Mediterráneo resultaron ser significativamente mayores (t-Student, $P < 0,001$) a las distancias genéticas calculadas por Bowen *et al.* (2005) para las zonas de nidificación del Atlántico occidental del hemisferio norte.

Tabla 2: Distancias genéticas entre pares de poblaciones usando mtDNA (debajo de la diagonal) y nDNA (encima de la diagonal). (-) indica que no hay datos de microsatélites de ETU. Para comparaciones de mtDNA entre Atlántico y Mediterráneo ver Encalada *et al.* 1998. Las abreviaturas están definidas en la Tabla 1: ATL: muestras atlánticas; GRE: Grecia; CRE: Creta; WTU: Turquía occidental; ETU: Turquía oriental; CYP: Chipre; ISR: Israel; LEB: El Líbano.

	GRE	CRE	WTU	ETU	CYP	ISR	LEB
ATL	0,0339***	0,0384***	0,0403***	-	0,0128	0,0143***	0,0258**
GRE		-0,0052	0,0079*	-	0,0007*	0,0158***	0,0037*
CRE	0,021		0,0109*	-	0,0044*	0,0065	-0,0038
WTU	0,009	0,035		-	0,0052	0,0152**	0,0075*
ETU	0,165***	0,203**	0,127*		-	-	-
CYP	0,037	0,000	0,047	0,286***		0,0131*	-0,0036
ISR	0,043**	0,000	0,067	0,181**	0,116**		0,0097
LEB	0,012	0,086	0,023	0,131*	0,000	0,057	

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Las estimas de flujo génico (Nm) fueron muy variables, siendo las estimas basadas en ADN nuclear significativamente mayores que las calculadas a partir del ADN mitocondrial (Wilcoxon signed rank test, $P < 0,001$). Las estimas de flujo génico calculadas en base a la coalescencia mediante el programa MIGRATE (Figura 6) no se correlacionan con las estimas de flujo génico basadas en los valores de F_{st} (Mantel, $P = 0,66$), tal como ya había sucedido en estudios previos sobre tortugas marinas (Bowen *et al.* 2005).

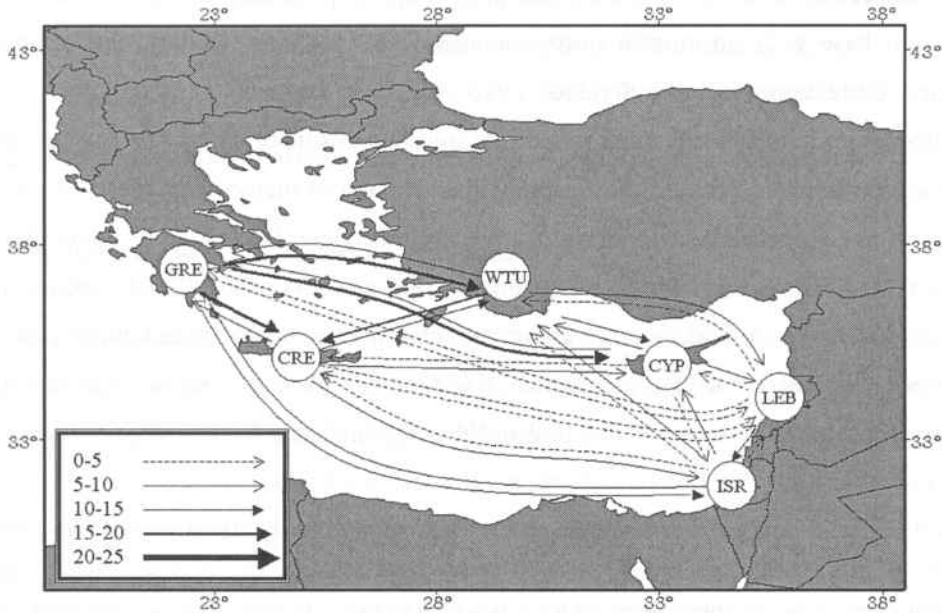
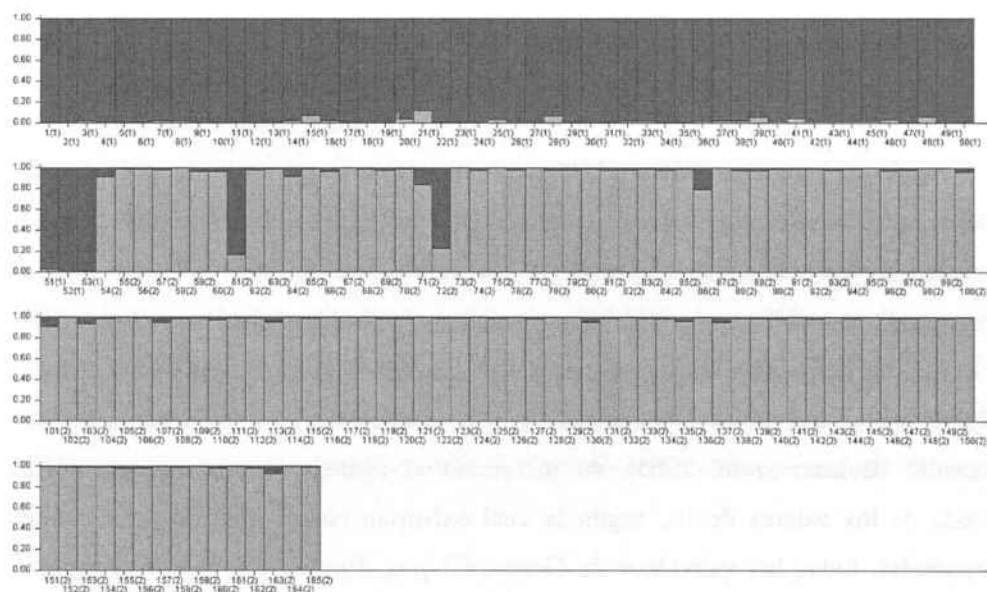


Figura 6: Tasa de migración (M) entre cada par de poblaciones calculado mediante métodos de coalescencia por el programa MIGRATE. La anchura de cada flecha es proporcional al número de migrantes.

Según el programa STRUCTURE, el número más probable de poblaciones existente en el Mediterráneo sería de cuatro ($\text{Pr}(X/K)=0,95$ para $K=4$). Sin embargo, el estadístico *ad hoc* ΔK (Evanno *et al.* 2005) sugiere que el número más probable de poblaciones sería de dos, aunque un pico secundario en $K=5$ indicaría la posibilidad de que existieran cinco. Éste es, precisamente, el resultado esperado para una Zona de Contacto en la cual varias poblaciones (4 o 5 en nuestro caso) estén parcialmente conectadas (Evanno *et al.* 2005). Al incorporar al análisis la información previa derivada de los valores de F_{st} , según la cual existirían cuatro unidades claramente diferenciadas, todos los individuos de Grecia, Chipre, Turquía e Israel se reasignan correctamente a su población de origen, mientras que las muestras de Creta y el Líbano no se asignan a ninguna de las anteriores poblaciones. Sorprendentemente, cuando se incorpora a los análisis el grupo de individuos atlánticos, el programa indica que el número de poblaciones más probable es $K=1$ ($\text{Pr}(X/K)=0,99$) y el estadístico *ad hoc* ΔK no muestra ningún pico significativo, lo que indica la existencia de una única población.

Ante estas contradicciones, se realizó una prueba con el programa STRUCTURE para ver si, en base a la información proporcionada por los microsatélites, era posible reasignar correctamente los individuos cuyo origen se conocía, al portadores del haplotipo CC-A1 (atlánticos) o por haber sido muestreados directamente en la playa de nidificación (mediterráneos). Todos los individuos atlánticos fueron asignados al mismo grupo con una probabilidad superior al 80 %, mientras que el 96,4 % de los individuos mediterráneos fueron asignados a un segundo grupo con una probabilidad superior al 80%. De los cuatro individuos con una probabilidad menor, dos (uno de Chipre y otro de Israel) se asignaron al clúster atlántico, mientras que los otros dos se asignaron al clúster mediterráneo, si bien con una probabilidad algo menor del 80 % (Figura 7).

Figura 7: Resumen de los resultados de reasignación (*clustering*) obtenidos mediante el empleo del programa STRUCTURE. Cada barra muestra la probabilidad estimada que tiene un individuo de pertenecer a uno de los dos grupos definidos por el programa en base a la información proporcionada por los microsatélites. El número de identificación de cada individuo está seguido por el número de población de origen entre paréntesis: (1) individuos Atlánticos (desde el individuo 1 al individuo 53), (2) individuos Mediterráneos (desde el individuo 54 al individuo 165).



El programa GENECLASS 2.0 detectó cinco inmigrantes de primera generación provenientes del Atlántico entre las crías nacidas en Mediterráneo, incluyendo los

cuatro ejemplares asignados con baja probabilidad por el programa STRUCTURE. No se detectó ningún inmigrante Mediterráneo entre las muestras atlánticas.

1.2.- Determinación del origen de los individuos en zonas de alimentación

Estructuración de las zonas de alimentación

Se detectaron un total de 21 haplotipos diferentes en las zonas de alimentación, seis de ellos no descritos previamente (CC-A27 hasta CC-A32, *Genbank accession numbers* AY742908 hasta AY742913). Estos nuevos haplotipos aparecieron siempre en baja frecuencia (inferior al 5%). La incorporación de los datos previamente publicados sobre las zonas de alimentación de Lampedusa, Azores y Madeira elevó el total de haplotipos a 24.

Los resultados de las pruebas Chi cuadrado y Snn apoyaron la existencia de una profunda heterogeneidad en la composición de las 11 zonas de alimentación analizadas (pruebas Chi-cuadrado y Snn; $p < 0,05$ en ambos casos). Las diferencias permanecieron significativas al eliminarse del análisis las zonas de alimentación atlánticas de Azores y Madeira (prueba Chi-cuadrado y Snn; $p < 0,05$), demostrando así que existe una profunda estructuración genética en las zonas de alimentación del Mediterráneo occidental. Las comparaciones por parejas de las zonas de alimentación mediante las pruebas Chi cuadrado y Snn (Tabla 3), así como el árbol de proximidad (*neighbour joining tree*) (Figura 8) revelaron la existencia de dos grupos bien diferenciados. Uno incluye las zonas de alimentación de Azores, Madeira, Gimnesias y el sur de España, mientras que el otro incluye las zonas de Italia y Cataluña. Los miembros del primer grupo muestran una prevalencia de los haplotipos exclusivos de las playas de nidificación del Atlántico (especialmente el CC-A1), mientras que las tortugas de las zonas del segundo grupo presentan una mayor proporción del haplotipo CC-A2, presente tanto en las zonas de nidificación atlánticas como mediterráneas si bien con frecuencias muy elevadas en estas últimas. Aunque no existen datos de microsátélites para la mayoría de las zonas de alimentación, los disponibles corroboran el modelo anterior, al agrupar las zonas de alimentación del sur de España y Gimnesias, frente a Pitiüses y la Comunidad Valenciana (Tabla 3).

Figura 8: *Neighbour-joining unrooted tree* basado en el mtDNA, donde se muestran las relaciones genéticas entre todas las zonas de alimentación.

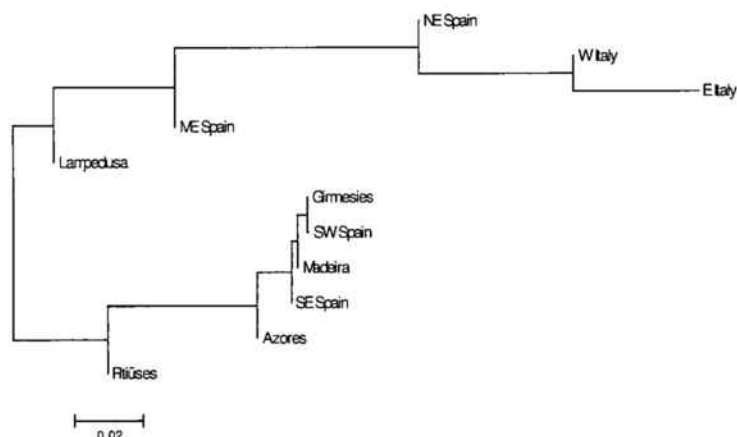


Tabla 3: Distancias genéticas entre pares de zonas de alimentación usando mtDNA (debajo de la diagonal) y nDNA (encima de la diagonal). (-) indica la ausencia de datos de microsatélites. AZO: Azores; MAD: Madeira; SWS: SW España (Andalucía Occidental); SES: SE España (Andalucía Oriental); MES: Mid E España (Comunidad Valenciana); NES: NE España (Cataluña); GIM: Gimnesias (Mallorca y Menorca); PIT: Pitiüses (Ibiza y Formentera); WIT: W Italia; EIT: E Italia; LAM: Lampedusa.

	AZO	MAD	SWS	SES	GIM	PIT	LAM	MES	NES	WIT	EIT
AZO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAD	0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SWS	0.003	0.001	-	0.003	0.000	0.008**	-	0.004	-	-	-
SES	0.001	0.000	0.001	-	0.011	0.010**	-	0.022***	-	-	-
GIM	0.001	0.003	0.001	0.001	-	0.017***	-	0.015**	-	-	-
PIT	0.027	0.017	0.039	0.028	0.041 ^{ab}	-	-	0.003**	-	-	-
LAM	0.059 ^a	0.170 ^{ab}	0.073 ^b	0.053 ^b	0.067 ^b	0.006	-	-	-	-	-
MES	0.056 ^b	0.078 ^b	0.100 ^b	0.083 ^b	0.101 ^b	0.017	0.002	-	-	-	-
NES	0.167 ^{ab}	0.151 ^{ab}	0.184 ^{ab}	0.149 ^{ab}	0.168 ^{ab}	0.055 ^{ab}	0.032	0.015	-	-	-
WIT	0.215 ^{ab}	0.170 ^{ab}	0.255 ^{ab}	0.233 ^{ab}	0.256 ^{ab}	0.108 ^{ab}	0.056	0.044 ^b	0.004	-	-
EIT	0.287 ^{ab}	0.231 ^{ab}	0.336 ^{ab}	0.317 ^{ab}	0.340 ^{ab}	0.173 ^{ab}	0.101 ^{ab}	0.092 ^{ab}	0.022	0.010	-

^a Chi-cuadrado (p<0.05); ^b S_{nn} (p<0.05); **P<0,05; ***P<0,01; ****P<0,001

Volviendo a la estructuración revelada por el mtDNA, las zonas de alimentación de Lampedusa, Pitiuses y la Comunidad Valenciana se hallan en una posición intermedia entre el grupo con predominio del haplotipo CC-A1 y el grupo con predominio del haplotipo CC-A2, revelando así la existencia de una clina en la frecuencia de ambos haplotipos. Así, la frecuencia del haplotipo CC-A1 disminuye hacia el este y, como consecuencia, la del haplotipo CC-A2 aumenta en la misma dirección. Sin embargo, la clina no está ligadamente únicamente a la posición geográfica entre el estrecho de Gibraltar y el Canal de Sicilia, como podría esperarse. Las islas Gimnesias, en el centro del Mediterráneo occidental, aparecen agrupadas con las lejanas islas atlánticas de Azores y Madeira, así como a las zonas de alimentación andaluzas del Golfo de Cádiz (SWS) y el mar de Alborán (SES). Por otro lado, la zona de alimentación de Cataluña (NES) se agrupa con las dos zonas de alimentación de Italia. Finalmente, la zona de alimentación de Pitiuses, situada a unos 150 km de Gimnesias, se diferencia de esta y ocupa una posición intermedia entre los dos grupos principales. En consecuencia, no hay una correlación significativa entre las distancias geográficas y las distancias genéticas (prueba de Mantel; $p > 0.05$). Además, no hay correlación entre la abundancia relativa del haplotipo CC-A2 en las zonas de alimentación bajo la influencia de la corriente Liguro-Provenzal (las dos zonas de alimentación de Italia, Cataluña, la Comunidad Valenciana y las dos zonas de las Islas Baleares) y la distancia más corta a Italia oriental (Spearman Rho = -0,6; $p > 0.05$), aunque la correlación es altamente significativa cuando se tienen en consideración la distancia geográfica medida a lo largo de la corriente (Spearman Rho = -1.0; $p < 0.001$). Por otro lado, no existe correlación significativa entre la frecuencia relativa del haplotipo CC-A1 en las zonas influenciadas por la Corriente Argelina (Azores, Madeira, las dos zonas de Andalucía, las dos de Baleares y Lampedusa) y la distancia a Azores (Spearman Rho = -0.3; $p > 0.624$).

Análisis de los agregados mixtos (Mixed Stock Analysis)

Al realizar un *Mixed Stock Analysis* ponderando los datos en base al tamaño de las poblaciones nidificantes (BM2), se observa que la mayoría de las zonas de alimentación analizadas (Azores, Madeira, Gimnesias, SW de España, SE de España y Pitiuses) están habitadas principalmente por tortugas provenientes por tortugas del Atlántico (Tabla 4). Únicamente las zonas de alimentación situadas a lo largo de la

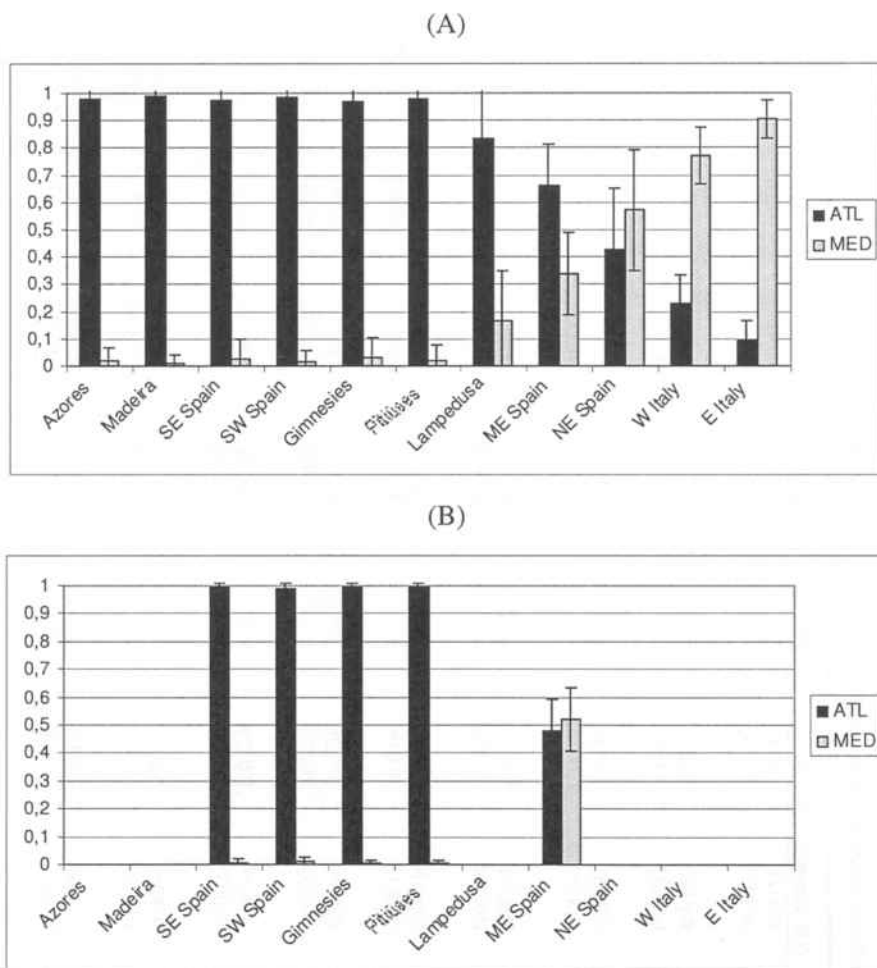
costa europea (E de Italia, W de Italia, Cataluña y Comunidad Valenciana) presentan una contribución significativa de las zonas de nidificación del Mediterráneo. Además, el MSA indica que la mayoría de las tortugas atlánticas provienen de las poblaciones del Sur de Florida y el NE de Florida-Carolina del Norte, mientras que la mayoría de las tortugas procedentes de las zonas de nidificación del Mediterráneo oriental han nacido en Grecia, Turquía y Chipre. Cuando se repitió el análisis sin ponderar las contribuciones con el tamaño de las poblaciones nidificantes (BM1), se obtuvieron unos resultados muy similares, pero aumentando considerablemente la contribución de la zona de nidificación de Dry Tortugas en detrimento de la enorme población del sur de Florida, situación que parece poco realista, considerando que la primera población está formada por sólo unos pocos centenares de ejemplares.

Los microsatélites proporcionaron resultados similares, ya que tanto las dos zonas de alimentación del sur de España, como Pitiüses y Gimnesias estarían habitadas básicamente por ejemplares atlánticos, mientras la zona de alimentación de la Comunidad Valenciana presentaría una contribución mixta de las zonas de nidificación del Atlántico y del Mediterráneo (Figura 9).

Tabla 4: Contribución estimada de cada zona de nidificación (filas) a cada zona de alimentación (columnas) basada en mtDNA. La contribución mostrada corresponde al modelo BM2, donde se pondera la contribución de cada zona de nidificación según su tamaño poblacional. Entre paréntesis se muestra el error estándar.

	Azores	Madeira	SE España	SW España	Gimnesias	Pitiúses	Lampedusa	ME España	NE España	W Italia	E Italia
NWFL	0.0043 (0.023)	0.0035 (0.032)	0.0032 (0.027)	0.0043 (0.032)	0.0088 (0.054)	0.0005 (0.007)	0.0005 (0.006)	0.0006 (0.007)	0.0009 (0.008)	0.0004 (0.005)	0.0005 (0.004)
SFL	0.9358 (0.074)	0.8196 (0.1421)	0.9542 (0.087)	0.8347 (0.208)	0.9221 (0.1489)	0.8639 (0.142)	0.7092 (0.181)	0.6511 (0.152)	0.2902 (0.094)	0.2249 (0.112)	0.0844 (0.0612)
NEFL-NC	0.0134 (0.040)	0.0403 (0.085)	0.0262 (0.068)	0.0620 (0.119)	0.0427 (0.0975)	0.0108 (0.034)	0.0068 (0.021)	0.0071 (0.022)	0.0055 (0.016)	0.0064 (0.019)	0.0042 (0.012)
Dry tortugas	0.0004 (0.004)	0.0017 (0.0190)	0.0003 (0.004)	0.0296 (0.096)	0.0001 (0.003)	0.0212 (0.084)	0.1122 (0.1809)	0.0027 (0.024)	0.0819 (0.202)	0.0011 (0.015)	0.0079 (0.061)
México	0.0317 (0.045)	0.1272 (0.088)	0.0017 (0.011)	0.0580 (0.081)	0.0030 (0.019)	0.0603 (0.091)	0.0337 (0.076)	0.0028 (0.015)	0.0295 (0.110)	0.0033 (0.019)	0.0025 (0.018)
Grécia	0.0029 (0.012)	0.0040 (0.019)	0.0101 (0.041)	0.0075 (0.029)	0.0051 (0.025)	0.0265 (0.079)	0.0361 (0.097)	0.3230 (0.151)	0.0886 (0.184)	0.6181 (0.2215)	0.5554 (0.2448)
Turquía	0.0099 (0.034)	0.0019 (0.013)	0.0017 (0.012)	0.0005 (0.003)	0.0159 (0.0620)	0.0032 (0.023)	0.0201 (0.063)	0.0046 (0.024)	0.1611 (0.159)	0.0723 (0.128)	0.2601 (0.181)
Brasil	0.0006 (0.003)	0.0006 (0.004)	0.0009 (0.005)	0.0008 (0.005)	0.0012 (0.007)	0.0010 (0.006)	0.0006 (0.003)	0.0010 (0.006)	0.0003 (0.002)	0.0007 (0.004)	0.0006 (0.003)
Chipre	0.0010 (0.008)	0.0010 (0.009)	0.0017 (0.012)	0.0026 (0.021)	0.0008 (0.008)	0.0126 (0.051)	0.0808 (0.155)	0.0065 (0.042)	0.3242 (0.279)	0.0727 (0.1845)	0.0844 (0.226)
Israel	0.0000 (0.000)	0.0000 (0.001)	0.0000 (0.000)	0.0000 (0.000)	0.0003 (0.006)	0.0000 (0.000)	0.0000 (0.000)	0.0005 (0.010)	0.0177 (0.106)	0.0000 (0.001)	0.0000 (0.001)

Figura 9: Proporción de individuos provenientes del Atlántico (ATL) o del Mediterráneo (MED) para cada zona de alimentación usando el *Mixed Stock Analysis* bajo el modelo BM2. (A) Usando mtDNA; (B) Usando microsatélites.



Pruebas de asignación

En la mayor parte de los casos, el programa STRUCTURE fue capaz de identificar con notable seguridad la población de origen de los ejemplares presentes en las zonas de alimentación (Tabla 5). Además, confirmó la presencia tanto de ejemplares de origen mediterráneo como atlántico en todas las zonas de alimentación, demostrando así que todas ellas son una mezcla de tortugas de las dos áreas, si bien la proporción en ellas es muy variable.

Tabla 5: Resultados de las asignaciones individuales de las tortugas que no presentan el haplotipo CC-A1 en base a la información proporcionada por el nDNA. El programa STRUCTURE asigna a cada individuo una probabilidad de tener un origen atlántico o mediterráneo. Cuando la probabilidad de asignación es inferior al 70%, se considera que no es posible identificar la población de origen.

	n	Atlántico			Mediterráneo		CC-A1	Total
		p>90%	90%>p>70%	Desconocido	90%>p>70%	p>90%		
SWS	21	8	4	5	0	4	19	40
SES	15	6	3	4	1	1	16	31
GIM	15	5	1	5	1	3	16	31
PIT	23	6	8	7	0	2	9	32
MES	27	4	1	7	4	11	8	35
TOT	101	29	17	28	6	21	68	169

Finalmente, las tallas medias de las tortugas (LRC) no son homogéneas entre las zonas de alimentación del Mediterráneo occidental (ANOVA; $df=7$; $F=7,469$ $p<0,001$), ya que las tortugas de las zonas de alimentación situadas en la entrada al Mediterráneo occidental (Gibraltar y el Canal de Sicilia) son estadísticamente menores que las presentes en el resto de zonas de alimentación, con la única excepción de Cataluña (Tabla 6).

Tabla 6: Resultados del test de Student-Neuman-Keuls (nivel de significación) realizado una vez el análisis de la varianza ha revelado la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre la talla media de las tortugas de algunas de las zonas de alimentación aquí consideradas. En negrita se marcan los valores significativos ($p<0,05$) SCL indica la talla media en cada zona de alimentación, DS la desviación estándar y R el rango.

	EIT	SWS	SES	NES	PIT	WIT	GIM	LRC	DS	R
EIT								36,8	12,5	16-65
SWS	0,6969							41,4	16,4	13-74
SES	0,6546	0,6257						43,0	17,5	21-79
NES	0,6057	0,6759	0,7220					44,1	14,9	20-100
PIT	0,0223	0,0496	0,1119	0,1424				49,6	9,0	28-66
WIT	0,0007	0,0023	0,0094	0,0185	0,3027			49,7	13,7	25-72
GIM	0,0217	0,0430	0,0825	0,0748	0,9160	0,4918		50,0	9,6	32-73
MES	0,0008	0,0029	0,0122	0,0265	0,5379	0,9752	0,6476	53,8	10,0	26-71

2.- Estudio de Interacción con pesca

2.1.- Evaluación de la interacción con pesca en el Mediterráneo occidental: el caso de las Islas Baleares

Entre mayo y agosto de 2002 se entrevistó un total de 162 pescadores que correspondían al mismo número de embarcaciones. Esta cifra significó un 32% de la flota Balear. El porcentaje de cobertura fue proporcionalmente mayor para la flota de cerco, arrastre y palangre de superficie, ya que el total de barcos de este tipo es mucho menor que el de la pesca artesanal (Tabla 7). Los pescadores declararon usar un total de 13 tipos de artes de pesca, aunque el cerco, el arrastre de fondo, el palangre de superficie y los tres tipos de trasmallo representaron la mayor parte del esfuerzo pesquero realizado durante el 2001.

Tabla 7: Número de embarcaciones registradas usando los distintos tipos de artes de pesca, número de pescadores entrevistados en cada caso y cobertura de las encuestas.

	Embarcaciones Registradas			Encuestas Realizadas			Cobertura
	Mallorca	Menorca	Pitiüses	Mallorca	Menorca	Pitiüses	
Artes Menores	219	90	107	71	23	78	27,40%
Arrastre	41	7	13	18	7	13	60,66%
Palangre de Superficie	3	0	0	2	0	0	66,67%
Cerco	10	1	0	6	1	0	63,63%

A partir de la información sobre el número total de embarcaciones de cada tipo en la flota balear (registro oficial) y el uso de los diferentes artes de pesca (entrevistas) se calculó el esfuerzo pesquero total generado por la flota balear. La distribución de este esfuerzo no fue homogénea, ya que la mayor parte del esfuerzo de arrastre de fondo, cerco y palangre de superficie se realiza en la isla de Mallorca, mientras que en el resto de islas predominan las artes menores, destacando el trasmallo (Tabla 8).

La mayoría de los pescadores (53%) opinó que la abundancia de tortugas disminuye y que la pesca es, al menos parcialmente, responsable de esta tendencia (59%). Las tortugas son una captura común en el archipiélago, ya que 33 pescadores

declararon haber capturado un total de 143 tortugas durante 2001. La combinación de la información sobre el esfuerzo pesquero (Tabla 8) y los valores de CPUE derivados de las entrevistas (Tabla 9) sugieren que 337 tortugas (95% CI: 365-309) fueron capturadas por la flota balear durante 2001 (Tabla 9).

Tabla 8: Distribución del esfuerzo pesquero (E_{2a}) en el Archipiélago Balear durante el año 2001, expresado como meses en los que una barca usa este arte.

Arte	Mallorca	Menorca	Pitiüses	TOTAL	Porcentaje
Trasmallo de langosta	462,1	417,65	269,4	1149,15	23,22
Trasmallo de sepia	584,41	107,11	377,52	1069,04	21,60
Palangre de Fondo	359,62	307,43	169,75	836,8	16,91
Arrastre	411,33	134,66	194,4	740,39	14,96
Trasmallo de salmonete	270,85	179,35	154,28	604,48	12,22
Otros (potera y curricán)	98,72	38,18	14	150,9	3,05
Cerco	120	12	-	132	2,67
Llampuguera	115,33	-	-	115,33	2,33
Solta	25,5	-	27,5	53	1,07
Jonquillera	38,81	-	3,25	42,06	0,85
Nasa	5,6	21,6	-	27,2	0,55
Palangre de Superficie	14	-	1	15	0,30
Almadraba	13	-	-	13	0,26
TOTAL	2519,27	1217,98	1211,1	4948,35	

A pesar de que se detectaron capturas de tortugas en muchas artes de pesca, la mayoría de los ejemplares se capturaron con palangre de superficie (Mallorca) o trasmallo de langosta (Menorca) (Tabla 9). No se detectó ninguna diferencia significativa, para ningún arte de pesca, entre los valores de CPUE calculados a partir de las encuestas y aquellos obtenidos de los embarques (Tabla 10), por lo que se puede asumir que los resultados de las encuestas son un reflejo preciso de las capturas incidentales en las zonas validadas y, por lo tanto, que las estimas globales son realistas del volumen de capturas de tortugas en la totalidad del archipiélago.

Tabla 9: Capturas realizadas mensualmente por los pescadores de cada arte (CPUE) y número de capturas totales (C_{za}) realizadas por la flota balear.

	CPUE	Mallorca	Menorca	Pitiuses	Total	95% CI
Arrastre de Fondo	0,018	11	0	2	13	21-5
Cerco	0,039	5	0	*	5	8-3
Palangre de Superficie	4,665	96	*	6	102	111-93
Palangre de Fondo	0,010	8	*	0	8	24-0
Trasmallo de Langosta	0,170	39	152	4	196	269-123
Trasmallo de Sepia	0,007	3	0	5	8	19-0
Trasmallo de Salmonete	0,009	2	4	0	6	15-0
Llampuguera	0,000	0	0	0	0	-
Nansa	0,000	0	0	0	0	-
Solta	0,000	0	0	0	0	-
Jonquillera'	0,000	0	0	0	0	-
Almadraba	0,000	0	0	0	0	-
Otros (potera y curricán)	0,000	0	0	0	0	-
Total		164	156	17	337	365-309

*Este arte no se usa en esta isla

Tabla 10: Número medio de tortugas capturadas mensualmente por embarcación en las zonas de pesca (CPUE) validadas según la respuestas de los pescadores en las encuestas, y según los datos obtenidos en los embarques en las mismas zonas de pesca. También se muestran los valores de la prueba de Mann-Whitney (Nivel de significación)

	CPUE encuestas	CPUE embarques	Nivel de significación
Palangre de Superficie	4.665	4.588	>0,05
Trasmallo de Langosta	0,326	0,144	>0,05
Cerco	0,017	0	>0,05
Arrastre de Fondo	0,07	0	>0,05
Palangre de Fondo	0,012	0	>0,05
Trasmallo de Salmonete	0,042	0	>0,05
Trasmallo de Sepia	0,003	0	>0,05
Llampuguera	0	0	>0,05

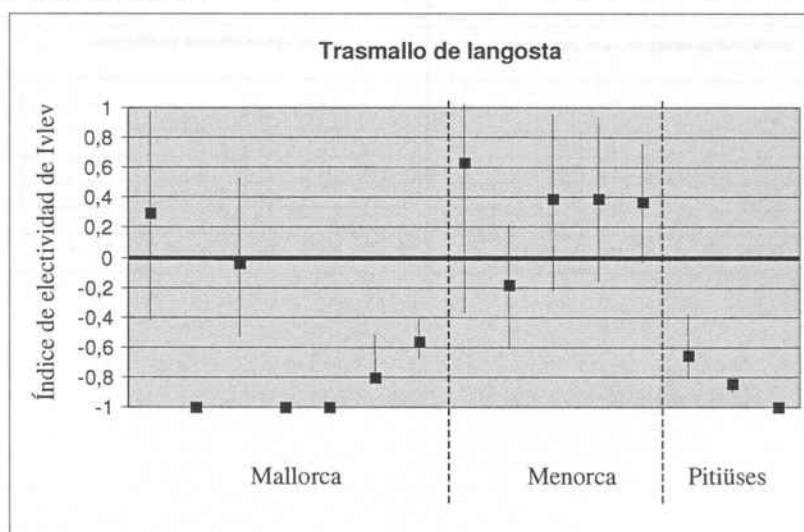
La distribución de las capturas entre las diferentes zonas del archipiélago difirió significativamente de lo esperado si tenemos en cuenta la distribución del esfuerzo

pesquero con trasmallo de langosta, palangre de fondo y trasmallo de salmonete (Tabla 11). Este dato indica que la vulnerabilidad de las tortugas al arte de pesca varía entre zonas. Dado que las capturas de tortugas mediante trasmallo de salmonete y palangre de fondo son escasas, nos centramos en investigar las causas de esta diferenciación en el trasmallo de langosta. Los resultados indican que la vulnerabilidad es mucho más elevada en las zonas de pesca situadas alrededor de Menorca (Figura 10).

Tabla 11: Capturas de tortugas declaradas por los pescadores en cada isla (o), capturas esperadas en cada isla asumiendo que es proporcional al esfuerzo pesquero realizado en cada isla (e) tal y como se muestra en la tabla 8 y resultados del test de Chi-cuadrado (p-valor). Los valores de las zonas de pesca en cada isla se han juntado en la tabla, pero los análisis estadísticos se realizaron con los datos originales.

	Mallorca		Menorca		Pitiüses		p-valor
	o	e	o	e	o	e	
Arrastre	11,31	7,22	0,00	2,36	1,78	3,41	0,566
Cerco	5,20	4,55	0,00	0,45	0,00	0,00	0,364
Palangre de superficie	64,26	65,33	0,00	0,00	5,71	4,67	0,940
Palangre de fondo	8,06	3,44	0,00	2,94	0,00	1,62	<0,001
Trasmallo de langosta	39,18	78,82	152,35	71,23	4,33	45,95	<0,001
Trasmallo de sepia	2,58	3,83	0,00	0,70	4,84	2,47	0,397
Trasmallo de salmonete	1,75	2,24	3,56	1,48	0,00	1,28	<0,001

Figura 10: Vulnerabilidad de la tortuga boba al trasmallo de langosta en las diferentes zonas de pesca de las islas Baleares, tal y como indica el índice de electividad de Ivlev. Las líneas verticales muestran los intervalos de confianza (95%)



La mayoría de las tortugas capturadas con trasmallos de langosta estaban muertas al subir a bordo, mientras que las pescadas con palangre de superficie estaban en su mayoría vivas (Tabla 12).

Tabla 12: Mortalidad inmediata causada por diferentes artes de pesca. n: tamaño muestral, (-) no hay datos de este arte.

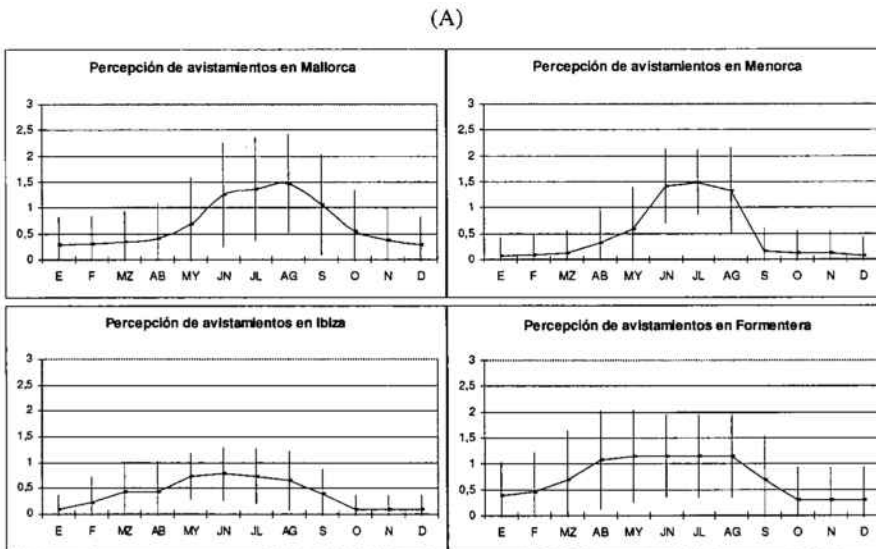
	Encuestas a pescadores		Datos de embarques	
	n	Mortalidad (%)	n	Mortalidad (%)
Palangre de superficie	70	0,0	13	7,7
Trasmallo de langosta	45	77,7	7	100,0
Cerco	2	0,0	-	-
Arrastre de Fondo	3	50,0	-	-
Palangre de fondo	6	0,0	-	-
Trasmallo de salmonete	2	50,0	1	0,0
Trasmallo de sepia	-	-	-	-

3.- Movimientos y distribución

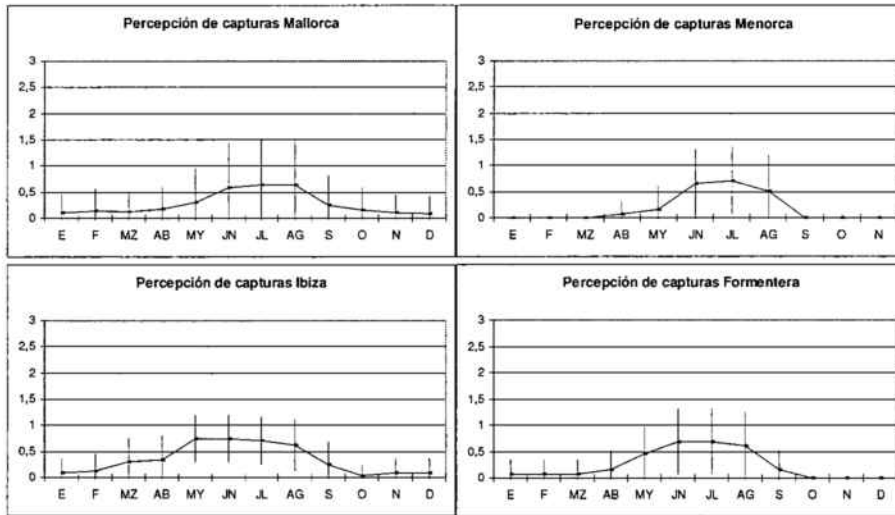
3.1.- Distribución temporal

En ninguna de las islas la frecuencia mensual de avistamientos fue constante, ya que se observó que existían diferencias estadísticamente significativas entre meses (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$ en todos los casos). La Figura 11 muestra la existencia de un período de mayor frecuencia de avistamientos entre los meses de junio y agosto, una frecuencia mucho menor en los meses más fríos y dos cortos periodos de transición. Lo mismo pasa con las capturas, que tienen una estacionalidad aún más marcada (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$ en todos los casos).

Figura 11. Percepción de avistamientos (A) y capturas (B) a lo largo del año. El eje de ordenadas se corresponde con la escala de percepción del pescador, que va desde ninguna tortuga (0) a muchas tortugas (3).



(B)



No se encontró ninguna diferencia significativa (Chi-cuadrado; $p > 0,05$) entre islas respecto a la percepción de la tendencia de la frecuencia de avistamientos o capturas.

3.2.- Distribución espacial

Censos aéreos

Los censos aéreos cubrieron un total de 329,03 km², lo que supone el 4,23% de la superficie total de la plataforma continental del Archipiélago Balear (7.773,7 km²). La mayoría de las tortugas se observó en zonas de profundidad intermedia (Tabla 13), que es el tipo de hábitat más abundante, por lo que se considera que las tortugas usan el hábitat de acuerdo con su disponibilidad ($\chi^2=3,064$; $df=2$; $P=0,081$). Se observaron de media $18,5 \pm 3,5$ tortugas en cada censo aéreo, por lo que $437,1 \pm 41,7$ tortugas confluyen al mismo tiempo en la plataforma continental del archipiélago.

Tabla 13: Disponibilidad de hábitat en la sección cubierta de la plataforma continental del Archipiélago Balear y distribución de los avistamientos de tortuga boba.

	Área muestreada (km ²)	Tortugas avistadas
Profundidad <50m	73,09	6
Profundidad entre 50 m y 100 m	202,60	13
Profundidad entre 200 m y 200 m	150,92	3

Telemetría por satélite

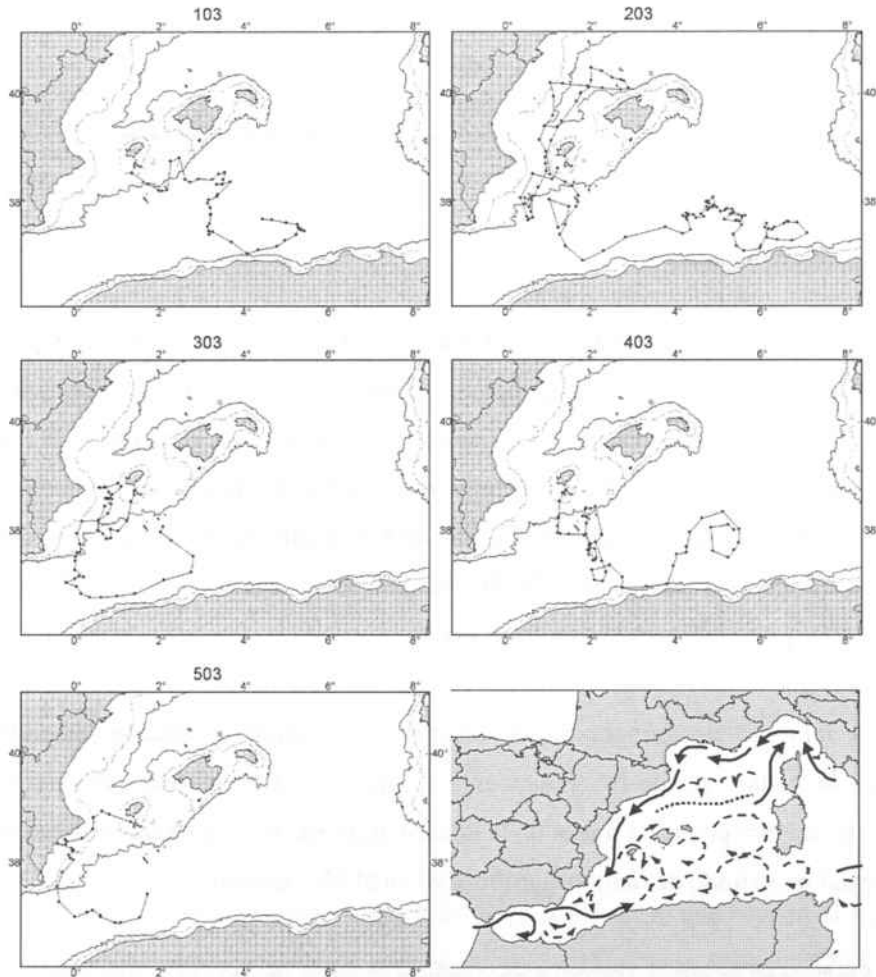
Las cinco tortugas equipadas con transmisores fueron liberadas entre el 8 y el 26 de abril del 2003. El período de seguimiento se extendió entre 48 y 159 días, con una media de $84,8 \pm 38,7$ días. De todos los animales se obtuvieron posiciones de buena calidad (Tabla 14), a pesar de que aproximadamente la mitad de los ciclos de funcionamiento no proporcionaron posiciones de buena calidad (52,2% para la tortuga n° 103, 50,0% para la tortuga n° 203, 56,3% para la tortuga n° 303, 39,4% para la tortuga n° 403, y 51,64% para la tortuga n° 503).

Las rutas de las tortugas fueron reconstruidas usando solamente las mejores posiciones de cada ciclo de funcionamiento (Figura 12). Los animales estuvieron la mayor parte del tiempo en las aguas de la cuenca argelina, a pesar de que un individuo (n° 203) pasó un periodo de tiempo significativo en el Mar Balear.

Tabla 14: Rendimiento del seguimiento de las cinco tortugas marcadas. (n): número de posiciones.

Individuo	n	Proporción de mensajes por <i>location class</i> (%)						Periodo de seguimiento	
		3	2	1	0	A	B	Meses	días
n° 103	248	6,0	21,0	23,0	5,7	16,5	23,8	Abril-Junio	62
n° 203	613	4,9	13,1	15,7	10,0	22,0	34,4	Abril-Septiembre	159
n° 303	310	9,4	15,2	18,4	8,1	24,5	24,5	Abril-Julio	75
n° 403	309	7,4	12,3	24,0	11,7	17,5	27,2	Abril-Julio	80
n° 503	135	9,0	17,0	15,0	8,1	20,0	29,6	Abril-Junio	48
TOTAL	1.615	6,8	14,9	18,9	9,7	20,6	29,1	Abril-Septiembre	424

Figura 12: Rutas de las tortugas (paneles del 103 al 503) y corrientes predominantes en el Mediterráneo occidental de acuerdo con Millot (1986) (panel F). La línea gris clara corresponde a la isóbata de los 200 m mientras que la línea negra corresponde a la isóbata de los 1.400 m.



Los rumbos de las tortugas n° 103, n° 203 y n° 503 no se distribuyeron de forma homogénea y se concentraron en el segundo cuadrante (Tabla 15), lo que significa que la dirección de movimiento general fue hacia el sudeste, aunque las rutas seguidas variaron enormemente. La tortuga n° 103 nadó hacia el este inmediatamente después de ser liberada, luego giró al sur pero retomó el movimiento hacia el este cuando llegó a las costas del norte de África. Después de unos días nadando paralela a la costa, se movió mar adentro y giró de vuelta hacia el oeste. La ruta de la tortuga n° 203 fue más compleja. Después de la liberación se movió primero hacia la península Ibérica y hacia el sur, pero rápidamente viró hacia el norte y nadó a lo largo del talud occidental de las

islas baleares hasta llegar al norte de Mallorca. Una vez allí giró al oeste y luego al sur, de retorno al punto de liberación. A partir de este punto la ruta es similar a la de la tortuga n° 103, aunque con más giros. La ruta de la tortuga n° 403 fue similar a la segunda parte de la tortuga n° 203, o sea, hacia el sur hacia las costas del norte de África y después hacia el este siguiendo la costa, para luego dirigirse mar adentro y describir un pequeño giro anticiclónico. Sin embargo, como esta tortuga se movió varias veces hacia el norte y hacia el sur antes de alcanzar las costas de África, la distribución de los ángulos de giro no fue diferente de lo que se esperaría por azar (tabla 15). Durante los primeros días, la ruta de la tortuga n° 503 se pareció a la de la n° 203, o sea, se aproximó hacia la península Ibérica para luego nadar hacia el sur. Sin embargo, luego realizó un giro ciclónico de 147 km de diámetro. Finalmente, la ruta de la tortuga n° 303 fue similar a la de la tortuga n° 503, aunque el giro casi se completó dando como resultado una distribución al azar de los ángulos de natación y con un diámetro de 195 km.

Tabla 15: Rumbo y ángulo de giro medios de las cinco tortugas marcadas con el test de Rayleigh correspondiente para determinar si se distribuyen al azar.

Individuo	Movimientos	Rumbo	Dirección	z de Rayleigh	Ángulo de giro medio	z de Rayleigh
#103	42	146,88	SE	4,529*	353,20	3,908*
#203	109	97,26	SE	4,115*	14,93	20,86***
#303	50	205,756	SW	1,970	355,988	17,221***
#403	54	104,14	SE	1,938	10,35	17,59***
#503	27	163,127	SE	4,087*	4,832	5,285**

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Los ángulos de giro no se distribuyeron al azar en ninguna de las cinco tortugas (Tabla 15). Las tortugas n° 103 y n° 303 giraron hacia la izquierda algo más de lo esperado, mientras que lo contrario sucedió con las tortugas n° 203, n° 403 y n° 503. Los valores absolutos de los ángulos de giro y de la velocidad de los animales se correlacionaron negativamente en las tortugas n° 303 (Spearman $\rho = -0,298$; $P = 0,034$; $n = 51$), n° 505 (Spearman $\rho = -0,460$; $P = 0,018$; $n = 26$), n° 103 (Spearman $\rho = -0,378$; $P = 0,015$; $n = 41$) y n° 203 (Spearman $\rho = -0,222$; $p = 0,021$; $n = 108$) pero no en la tortuga n° 403 (Spearman $\rho = -0,080$; $P = 0,570$; $n = 53$).

Ninguna de las cinco tortugas usó los tres tipos de dominios batimétricos de acuerdo con su disponibilidad (Tabla 16). Cuatro de ellas evitaron significativamente la plataforma continental, mientras que los valores para el talud y las aguas oceánicas oscilaron entre ligeramente negativos a ligeramente positivos. Sin embargo, ni el efecto individual de cada tortuga ni la zona batimétrica tuvieron ningún efecto sobre la velocidad media de desplazamiento (ANOVA de dos factores; $F=1,481$; $P=0,131$; Tabla 17) o la media del coseno del ángulo de giro (ANOVA de dos factores; $F=0,330$; $P=0,0983$; Tabla 17).

Los animales marcados pasaron un promedio de $35,1 \pm 19,7\%$ de su tiempo en superficie, sin mostrar diferencias significativas entre los diferentes periodos del día (mañana: $31,5 \pm 24,6\%$; tarde $39,2 \pm 17,3\%$; noche: $34,9 \pm 20,4\%$; Kruskal-wallis; $H_{stat}=1,289$; $df=2$; $P=0,525$). Sin embargo, las tortugas n° 103 y n° 503 invirtieron el 98,8% y el 93,0% del tiempo en superficie durante su última transmisión, antes de perder la conexión con Argos. Este comportamiento no se había producido en ningún caso anterior ni en su última conexión, en la que pasaron el 18,6% (n° 203), 7,3% (n° 303) y el 3,9% (n° 403) del tiempo en superficie antes de perder el contacto con Argos, por lo que se considera un comportamiento excepcional.

Tabla 16: Uso del hábitat de las cinco tortugas indicando el Índice de electividad de Ivlev. La disponibilidad del hábitat fue el siguiente: oceánico 307.574,4 km², talud 94.972,1 km² y plataforma continental 66.741,2 km²

Individuo y tipo de hábitat	Posiciones	Chi-cuadrado	Electividad de Ivlev	95 % CI
n° 103		7,01***		
Oceánico	38		0,15	0,23 / 0,06
Talud	4		-0,37	-0,18 / -0,56
Plataforma	1		-0,72	-0,64 / -0,80
n° 203		12,13***		
Oceánico	86		0,09	0,16 / 0,01
Talud	22		-0,01	0,18 / -0,19
Plataforma	2		-0,77	-0,74 / -0,81
n° 303		6,72***		
Oceánico	28		-0,11	0,0006 / -0,22
Talud	22		0,34	0,64 / 0,05

n° 403	Plataforma	3	4,6*	-0,43	-0,25 / -0,61
	Oceánico	44		0,10	0,19 / 0,01
	Talud	9		-0,11	0,14 / -0,35
n° 503	Plataforma	2	6,62***	-0,59	-0,48 / -0,71
	Oceánico	10		-0,29	-0,17 / -0,42
	Talud	7		0,11	0,50 / -0,29
	Plataforma	11		0,47	0,97 / -0,03

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; grados de libertad = 2 para todas las tortugas

Tabla 17: Velocidad media de desplazamiento y media del coseno del ángulo de giro (ψ) de los cinco animales marcados en los tres tipos de hábitat.

Tipo de hábitat	Tortuga	Velocidad ($m s^{-1}$)	ψ
103			
Oceánico		0.47	0.995
Talud		0.79	0.589
Plataforma		1.08	-
203			
Oceánico		0.55	0.333
Talud		0.82	0.779
Plataforma		0.78	0.586
303			
Oceánico		0.67	0.567
Talud		0.44	0.543
Plataforma		0.39	0.954
403			
Oceánico		0.61	0.532
Talud		0.62	0.712
Plataforma		0.33	0.931
503			
Oceánico		0.77	0.666
Talud		0.74	0.597
Plataforma		0.38	0.292

Discusión

"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto
y pensar lo que nadie más ha pensado".

Werner Heisenberg (1901-1976); físico alemán

Los datos presentados en esta tesis demuestran la existencia de una profunda estructuración genética en las zonas de nidificación del Mediterráneo oriental, con independencia del marcador empleado. La variabilidad del ADN mitocondrial es inferior a la observada en las zonas de nidificación del Atlántico norteamericano (Bowen *et al.* 2005), lo que se considera que refleja el reciente origen de la población Mediterránea (unos 12.000-18.000 años según Bowen *et al.* 1993). La colonización del Mediterráneo debió de llevarse a cabo por unos pocos ejemplares, ya que las zonas de nidificación del Atlántico y del Mediterráneo comparten únicamente dos haplotipos, y uno de ellos podría haberse generado mediante un proceso de homoplasia. El haplotipo CC-A2 se encuentra en elevada frecuencia en todas las zonas del Mediterráneo y de él surgieron los haplotipos CC-A6 y CC-A29, que hasta la actualidad han permanecido relegados a determinadas zonas debido a la filopatría de las hembras. Sobre el origen del haplotipo CC-A3, el otro haplotipo compartido con las playas de nidificación norteamericanas, existen serias dudas ya que tanto pudo llegar desde el Atlántico o haber evolucionado independiente en el Mediterráneo a partir del haplotipo CC-A2. Sin disponer de secuencias más largas resulta imposible determinar cuál de estas dos hipótesis es la correcta, aunque el hecho de que la transición que diferencia el CC-A2 del CC-A3 se haya producido al menos dos veces (una para originar el CC-A3 a partir del CC-A2 en el Atlántico y otra para originar el CC-A32 a partir del CC-A6) apoya la posibilidad de que se trate de una homoplasia. En cualquier caso, el hecho de que esa transición en concreto haya surgido dos veces de forma independiente supone el primer caso demostrado de homoplasia en tortugas marinas. Por lo tanto, un origen independiente del CC-A3 en el Mediterráneo es una hipótesis plausible que requiere un análisis más detallado en el futuro. En cualquier caso, la filopatría de las hembras restringió la expansión de los haplotipos CC-A3, CC-A6, CC-A29 y CC-A32 provocando una profunda estructuración entre diferentes zonas de nidificación dentro

del Mediterráneo, tal como ya se había detectado entre el Atlántico y el Mediterráneo (Encalada *et al.* 1998).

La diferenciación genética basada en el ADN mitocondrial indica la existencia de, al menos, cuatro unidades independientes dentro del Mediterráneo: (1) las playas de nidificación de Grecia continental y las islas del Jónico, que presentan el haplotipo CC-A6, (2) Turquía oriental, caracterizada por el haplotipo CC-A3, (3) Israel, que presenta el haplotipo CC-A29 y (4) Chipre, que sólo presenta el haplotipo común CC-A2. La única comparación que no mostró diferencias significativas fue la realizada entre Chipre y Grecia continental, aunque el valor de significación se aproximó al valor crítico. Posiblemente, las diferencias serían estadísticamente significativas con un mayor tamaño de muestra, por lo que se puede considerar marginalmente significativa. La agrupación de Grecia continental y de las islas Jónicas está confirmada además por estudios de marcaje y recaptura, ya que se han detectado hembras marcadas inicialmente en una playa de dicha región nidificando en otras playas de la misma (Margaritoulis 1998). Por el contrario, no existen evidencias de intercambio de hembras entre las cuatro unidades anteriormente definidas.

El uso de marcadores nucleares ha revelado en estudios previos realizados en tortuga boba un menor grado de estructuración que el revelado por el ADN mitocondrial (Bowen *et al.* 2003). Estas diferencias se han interpretado como el resultado de las diferencias existentes en el grado de filopatría de machos y hembras. Por una parte, una elevada filopatría de las hembras generaría una estructuración a nivel del ADN mitocondrial, mientras que la baja filopatría de los machos generaría un elevado flujo entre poblaciones que homogenizaría los marcadores nucleares. En este escenario, las poblaciones del Atlántico podrían estar conectadas con las del Mediterráneo gracias a la presencia de machos atlánticos de maduración sexual temprana en las zonas de alimentación que comparten ambas poblaciones en el Mediterráneo occidental. Los resultados de esta tesis indican que, si bien existe un cierto flujo génico entre el Atlántico y el Mediterráneo, éste es muy pequeño y a efectos prácticos las dos poblaciones evolucionarían independientemente. Para explicar esta situación es necesario tener en cuenta dos elementos. En primer lugar, la mezcla de juveniles atlánticos y mediterráneos en las zonas de alimentación no es homogénea, como se ha demostrado en esta tesis, aunque sí es verdad que en todas las zonas de alimentación

hay individuos de los dos orígenes. De esta forma, la probabilidad de que dos individuos de diferente origen se encuentren es menor de lo sugerido por estudios previos (Laurent *et al.* 1993, Laurent *et al.* 1998, Casale *et al.* 2002), aunque dicha posibilidad existe. En segundo lugar, hay que tener en cuenta que la mayoría de los individuos presentes en estas zonas de alimentación son inmaduros (Margaritoulis *et al.* 2003) ya que la talla media de estas zonas de alimentación ronda los 40-50 cm SCL. Sin embargo, es posible encontrar individuos de hasta 100 cm SCL, ya adultos, aunque estudios previos realizados mediante ADN mitocondrial sugieren que estos individuos de gran tamaño serían todos ellos de origen mediterráneo (Laurent *et al.* 1998). A falta de confirmar este hecho con marcadores nucleares es razonable pensar que, en un escenario así, la gran mayoría de los machos atlánticos abandonarían el Mediterráneo antes de alcanzar la madurez sexual, dando lugar así al aislamiento detectado. Ahora bien, la presencia de híbridos en las playas mediterráneas indica que este aislamiento no es total, aunque en cualquier caso es suficiente para provocar una profunda diferenciación genética.

Una de las principales diferencias fenotípicas entre las tortugas mediterráneas y las atlánticas es la menor talla de las primeras (Margaritoulis *et al.* 2003). Esta diferencia pueden tener una explicación ecológica, ya que el Mediterráneo tiene una productividad mucho menor que el Atlántico. Sin embargo, teniendo en cuenta el grado de diferenciación genética documentado en la presente tesis, no puede descartarse un origen genético para dicha diferencia.

Sin embargo, no sólo existe estructuración a nivel del ADN mitocondrial en el Mediterráneo oriental. También existe a nivel del ADN nuclear, si bien el flujo génico basado en ADN mitocondrial es significativamente menor que el basado en el ADN nuclear. De hecho, los datos proporcionados por los microsatélites refuerzan la existencia de las cuatro unidades definidas sobre la base del ADN mitocondrial, ya que tanto Grecia como Israel o Chipre aparecen como unidades independientes. Turquía occidental también aparece como una unidad diferente, aunque próxima a Chipre. Estos datos coinciden con los de Schroth *et al.* (1996) quien, sobre la base de datos de ADN nuclear (RAPDs) y ADN mitocondrial (región control) sugirió la existencia de una clina longitudinal a lo largo del litoral turco y la diferenciación de esta región del resto del Mediterráneo. No obstante, sería necesario un muestreo más amplio a lo largo de la

costa turca para comprobar la existencia de dicha clina en las frecuencias de microsatélites. La situación de Creta es particular ya que, por un lado, difiere de Turquía oriental en su ADN mitocondrial mientras que, por otro, difiere de Turquía occidental y de Chipre en su ADN nuclear. Ello indicaría que Creta juega un papel de enlace entre ambos lados del Mediterráneo oriental, por ejemplo entre Grecia e Israel. La situación del Líbano no queda totalmente clara, posiblemente debido al reducido tamaño muestral, aunque probablemente forme una unidad junto con Israel ya que (1) no hay diferencias significativas para ningún marcador, (2) las dos localidades muestran el mismo patrón de similitud al ser comparadas con otras localidades y (3) la zona de nidificación de Al-Mansouri, en el Líbano, está junto a la frontera con Israel. Por todo ello, la ausencia del haplotipo CC-A29 en la muestra del Líbano puede ser perfectamente un artefacto derivado del pequeño tamaño muestral. De hecho, Roberts *et al.* (2004), trabajando con tortuga verde (*Chelonia mydas*) en el Pacífico y en el Atlántico, ya sugirieron que un pequeño tamaño muestral podía conducir a una pérdida de poder estadístico a la hora de detectar diferenciación genética. Por ello, podemos estar seguros de que existe diferenciación genética cuando ésta se encuentra, pero la existencia de comparaciones no significativas no debe ser tomada como una prueba de elevado flujo génico. Por todas estas razones, los resultados de aquellas poblaciones con bajo tamaño muestral (como el Líbano con ambos marcadores o Chipre para ADN nuclear) deben ser tomados con precaución. En cualquier caso, los valores de F_{st} encontrados entre las zonas de nidificación del Mediterráneo son un orden de magnitud menores que los encontrados entre las zonas de nidificación del Atlántico norte (Bowen *et al.* 2005), indicando que el nivel de diferenciación es mucho mayor en el Mediterráneo que en el Atlántico.

Dejando al margen el hecho de que todas las zonas de nidificación del Mediterráneo han visto reducidas sus poblaciones sin que se hayan apreciado signos de recuperación (Margaritoulis *et al.* 2003), existen dos grupos de poblaciones que pueden haber sufrido las mayores pérdidas desde el punto de vista genético si tenemos en cuenta los estudios genéticos previos realizados mediante ADN mitocondrial (Bowen *et al.* 2003) y los datos disponibles sobre el número de hembras nidificantes: (1) las reducidas poblaciones de Israel y el Líbano y (2) las poblaciones de Creta y Chipre, donde sólo se encuentra el haplotipo ancestral CC-A2. Encalada *et al.* (1998) documentó niveles similares de variabilidad en la población Atlántica de Carolina del

norte, donde sólo se encuentra el haplotipo CC-A1. Bowen (2003) propuso que este fenómeno se debía a una reciente expansión hacia el norte de unos pocos individuos procedentes de otras poblaciones del Atlántico provocado por un incremento de la temperatura durante el Holoceno. Sin embargo, esta hipótesis no es aplicable a las poblaciones de Creta y Chipre, ya que ambas islas se encuentran en latitudes inferiores a las ocupadas por las poblaciones de Grecia y Turquía, con una variabilidad en su ADN mitocondrial muchísimo mayor. Las costas de Creta y Chipre son abruptas y la plataforma continental es estrecha y no está conectada al continente (Hofrichter *et al.* 2004), por lo que la disponibilidad de playas de nidificación tiene que haberse muy afectada por los cambios en el nivel del mar registrados durante el Holoceno (Tichy *et al.* 2004); ello podría haber provocado extinciones locales y conducido a la baja diversidad mitocondrial observada. Este patrón no se puede generalizar a las islas con una ancha plataforma continental y unidas al continente, como Zakynthos, en Grecia. Esta isla presenta una de las mayores diversidades en el ADN mitocondrial del Mediterráneo, posiblemente debido a que sus características topográficas garantizan la continuidad en el tiempo de zonas aptas para la nidificación a pesar de cambios en el nivel del mar.

Sorprendentemente, no se han encontrado diferencias en el ADN nuclear entre ninguna de las poblaciones consideradas, ni tampoco entre las poblaciones mediterráneas y la submuestra de la población atlántica representada por los ejemplares portadores del haplotipo CC-A1 presentes en el Mediterráneo occidental. Asimismo, tampoco se han detectado cuellos de botella, indicando que la reducción del tamaño que han sufrido las poblaciones de tortuga boba del Mediterráneo oriental no ha afectado todavía a la variabilidad genética nuclear, a pesar de hallarse éstas prácticamente aisladas del Atlántico y de tener una menor variabilidad de ADN mitocondrial. Para explicar estas discrepancias entre marcadores hemos de tener en cuenta que el ADN mitocondrial tiene un tamaño efectivo cuatro veces menor que el ADN nuclear (Birky *et al.* 1983), por lo que posiblemente se vio más afectado por la colonización del Mediterráneo a partir de pocos individuos y por las recientes reducciones poblacionales de origen antropogénico. Además, los microsatélites tienen una tasa de mutación mucho más elevada que el ADN mitocondrial (D-loop 2×10^{-8} (Encalada *et al.* 1998); microsatellites (2×10^{-3}) (Ellegren 2000)) con lo que posiblemente permitió una rápida diversificación hasta alcanzar una diversidad similar al Atlántico con la aparición de

diversos alelos privados en las poblaciones Mediterráneas. Finalmente, las diferencias en el grado de filopatría entre machos y hembras podría ser clave para explicar estas discrepancias.

El hecho de que no se aprecie una disminución de la variabilidad genética es especialmente intrigante en poblaciones como las del Líbano o Israel, formadas por unas pocas decenas de hembras nidificantes. Estas poblaciones son las que han sufrido una reducción más drástica de sus poblaciones, especialmente desde la Primera Guerra Mundial hasta mediados de los años 30 (Sella 1982). Esta aparente paradoja tiene dos posibles explicaciones que no se excluyen mutuamente. La primera implica que la reducción de las poblaciones de Israel y el Líbano es muy reciente y desde ella sólo han pasado unas pocas generaciones de estos longevos animales, por lo que todavía no sería posible detectar cambios en la diversidad genética. Sin embargo, esta explicación no resulta suficiente, pues tras una fuerte reducción poblacional se espera que el número de alelos disminuya mucho más rápido que la heterocigosidad (Nei *et al.* 1975), algo que no ha sucedido, pues ambos parámetros no difieren entre las poblaciones más reducidas (Israel y el Líbano) y el resto (Grecia, Turquía e incluso la submuestra atlántica). La segunda hipótesis sugiere que un cierto flujo génico mediado por machos de poblaciones como Creta previene el descenso de la diversidad genética. Esta hipótesis se ve reforzada por los valores de migración proporcionados por el programa MIGRATE y por el hecho de que el programa STRUCTURE indique para el Mediterráneo una estructura correspondiente a una zona de contacto formada por varias poblaciones parcialmente conectadas. De este modo, Creta tendría un importante papel como conexión entre las reducidas poblaciones del Levante mediterráneo (Israel y el Líbano) y las poblaciones del Jónico (Grecia). Al mismo tiempo, Chipre podría estar conectando la población del Líbano con las poblaciones turcas. Este flujo génico entre poblaciones estaría mediado principalmente por machos, ya que el flujo génico detectado con microsatélites es significativamente mayor al detectado mediante ADN mitocondrial. Este hecho no es único, ya que en la gran mayoría de las poblaciones de tortuga boba y otras especies de tortugas marinas estudiadas hasta la fecha la estructuración genética es más profunda a nivel del ADN mitocondrial que a nivel del ADN nuclear (Bowen *et al.* 2005, FitzSimmons *et al.* 1996 1997a,b).

Todas estas conclusiones ponen de manifiesto la importancia de un análisis genético detallado para garantizar un manejo adecuado de especies amenazadas, ya que en caso contrario se puede llegar a conclusiones erróneas que generarían decisiones de conservación inadecuadas. Además permite una visión más compleja ya que, de forma general, los resultados genéticos se han aplicado de forma simplista a la conservación de especies amenazadas, pues generalmente sólo se ha prestado atención a aquellas poblaciones que presentan haplotipos o alelos exclusivos o que presentan una clara diferenciación genética (Ruckelhaus *et al.* 2003). De acuerdo con esta práctica, los esfuerzos de conservación deberían concentrarse en aquellas playas de nidificación con haplotipos exclusivos, como Grecia, Turquía o Israel, si sólo se realizara un estudio con ADN mitocondrial. Paralelamente, un estudio basado sólo en ADN nuclear sugeriría que quizás Chipre también podría considerarse una unidad de conservación. En cualquier caso, ninguna de estas aproximaciones propondría una conservación de las playas de nidificación de Creta, ya que presentan un haplotipo común a todas las restantes zonas de nidificación y tampoco se diferencian de las restantes poblaciones en su ADN nuclear. Sin embargo, no proteger estrictamente la población de Creta sería un error importante ya que ésta actúa de nexo entre el Jónico y el Levante gracias al flujo génico mediado por machos, conclusión que sólo se obtiene de la combinación de diferentes marcadores.

Teniendo en cuenta todos estos argumentos, podemos afirmar que la variabilidad genética de las poblaciones del Mediterráneo se verá protegida sólo si 1) se preserva la variabilidad mitocondrial, 2) se preserva la variabilidad nuclear y 3) se preservan las poblaciones que actúan de nexo entre las poblaciones situadas en los extremos del rango de nidificación. En conclusión 1) las poblaciones de Grecia, Turquía y Israel se tienen que conservar ya que son diferentes desde el punto de vista del ADN mitocondrial y presentan haplotipos propios, 2) las mismas poblaciones y las de Chipre se tienen que conservar ya que son unidades desde el punto de vista del ADN nuclear y 3) las poblaciones de Creta y Chipre son imprescindibles ya que enlazan, al menos, dos de las anteriores unidades. La relevancia de la población del Líbano no está resuelta, debido a que el reducido tamaño muestral ha impedido un estudio en profundidad, aunque probablemente forme una unidad con Israel, por lo que es necesaria más información para resolver esta cuestión.

No obstante, la conservación de la población de tortuga boba que nidifica en el Mediterráneo oriental no depende sólo de la conservación de las playas de nidificación. El estudio de la estructura genética de esta especie en el Mediterráneo occidental no sólo ha confirmado la presencia de tortugas mediterráneas y atlánticas, sino una distribución heterogénea de los juveniles. Por un lado, los individuos atlánticos se encuentran preferentemente en aguas de la Cuenca Argelina, en la mitad meridional del Mediterráneo occidental, mientras que los individuos procedentes del Mediterráneo oriental habitan principalmente las zonas de alimentación localizadas a lo largo de la costa europea del Mediterráneo occidental, desde Italia hasta la Comunidad Valenciana. Esta segregación diferencial no puede ser explicada mediante un modelo de difusión simple, en el que la proporción de tortugas de cada origen disminuiría a medida que la distancia a la zona de nidificación aumentara. El hecho de que zonas de alimentación muy próximas difieran en su composición genética (como sucede entre Pitiusas y Gimnesias) o muy alejadas con una misma composición genética (como Gimnesias y Azores) hace que la relación entre distancia genética y distancia geográfica no sea significativa.

Una posible explicación a esta distribución heterogénea podría hallarse en una hipotética selección diferencial del hábitat entre los individuos más jóvenes y los inmaduros, pues la migración de desarrollo que llevan a cabo los juveniles de tortuga boba va asociada a una transición entre la alimentación oceánica, característica de las fases iniciales de la vida de estos animales, y la alimentación nerítica propia de las fases adultas (Bolten *et al.* 2003). Sin embargo, las diferencias genéticas halladas no tienen relación alguna con la talla de los individuos analizados, aunque las zonas de alimentación que se encuentran en la entrada del Mediterráneo occidental están habitadas por tortugas de menor tamaño que las encontradas en el interior del Mediterráneo occidental. Estas diferencias se explican fácilmente si tenemos en cuenta que las zonas de alimentación situadas en la entrada del Mediterráneo occidental son pasos intermedios para las tortugas que habitan dicha cuenca.

Seguramente, la estructura genética de la tortuga boba en las zonas de alimentación del Mediterráneo occidental es debida a la compleja hidrografía de la región, que está caracterizada por la existencia de dos corrientes principales. Desde el estrecho de Mesina fluye una masa de agua de elevada salinidad a lo largo del Mar

Tirreno y el Mar de Liguria (Millot 1987, 2001; Pinardi y Masseti 2000). En este punto, se origina la corriente Liguro-Provenzal, que enlaza con el Golfo de León y el litoral ibérico, enlazándose así el mar Jónico con el litoral ibérico mediante una masa de agua de elevada salinidad. Una vez llega al Cabo de la Nao, una rama de esta corriente se desvía hacia las islas meridionales de las Baleares (Pitiusas) y la otra se desvanece entre el mar de Alborán y la Cuenca Argelina. Por otro lado, aguas Atlánticas de baja salinidad fluyen hacia el este a través del estrecho de Gibraltar para originar posteriormente la Corriente Argelina, que fluye hacia el este a lo largo de la parte meridional del Mediterráneo occidental hasta alcanzar el canal de Sicilia (Millot 1987, 2001; Pinardi y Masseti 2000). Esta masa de agua forma giros temporales que se desplazan por la Cuenca Argelina y transportan agua Atlántica hasta las islas Baleares (López Jurado 1990) y a Cerdeña.

La distribución de tortugas marinas procedentes del Atlántico y del Mediterráneo se puede explicar en base a dicho patrón de corrientes, asumiendo que los individuos permanecen ligados a las masas de agua procedentes de su misma zona de origen. Tanto el número de tortugas mediterráneas como el porcentaje de ejemplares portadores del haplotipo CC-A2 disminuye con la distancia medida a lo largo de la corriente Liguro-Provenzal desde el estrecho de Mesina hasta la zona de alimentación considerada, demostrando así que las tortugas Mediterráneas usan dicha corriente para dispersarse. De este modo, dicha corriente actuaría como un atajo que aceleraría el transporte de estas tortugas hacia las zonas de alimentación del litoral ibérico. Por otro lado, la presencia de tortugas Atlánticas es mayoritaria en las zonas de alimentación que reciben la influencia de las aguas Atlánticas, reforzando así dicha hipótesis.

Aunque todos los métodos de análisis empleados están de acuerdo con el patrón general de distribución de las tortugas atlánticas y mediterráneas en el Mediterráneo occidental, existen algunas sutiles diferencias. Por un lado, la realización de un *mixed stock analysis* en base a los datos de ADN mitocondrial y prescindiendo del tamaño poblacional proporciona algunos resultados sorprendentes, como la elevada contribución de ciertas zonas de nidificación pequeñas y distantes, tales como las playas de Dry Tortugas. Se trata, a todas luces, de un resultado poco realista. Una vez se aplica una corrección teniendo en cuenta el tamaño de la población, los resultados son más plausibles, tal como ya apuntó Bass *et al.* (2004) al analizar las zonas de alimentación

de Carolina del Norte. Para explicar esta incongruencia nos tenemos que fijar en la composición haplotípica de poblaciones como Dry Tortugas, con elevada abundancia del haplotipo CC-A2, común a todas las zonas de puesta, y la presencia de otros haplotipos en muy baja frecuencia. La aparición de un individuo con alguno de estos haplotipos exclusivos en zonas como Pitiusas o Lampedusa provoca que el programa asigne gran parte de los individuos con el haplotipo CC-A2 a la población de Dry Tortugas, resultando así en una elevada contribución global. Ahora bien, la presencia de estos haplotipos raros en las muestras de las zonas de alimentación posiblemente se deba más al azar que al hecho de que se encuentren en esa frecuencia. Teniendo en cuenta estos resultados, en futuros estudios de zonas de alimentación de tortugas marinas recomendamos ponderar los análisis con el tamaño poblacional.

Los diferentes marcadores empleados también generan pequeñas diferencias en los resultados, ya que los microsatélites dan lugar a intervalos de confianza menores que los obtenidos mediante el ADN mitocondrial. Sin embargo, la principal ventaja del uso de microsatélites es la posibilidad de realizar asignaciones individuales. Debido a que la mayoría de los individuos presentes en las zonas de alimentación presentan haplotipos comunes a diferentes zonas de nidificación, la asignación individual usando ADN mitocondrial rara vez es posible. Además, los haplotipos exclusivos son mucho más raros en el Mediterráneo, por lo que esta asignación estaría sesgada hacia el Atlántico. Sin embargo, los microsatélites asignan correctamente a la mayoría de individuos de origen ya conocido, y cuando esto no sucede suele ser debido a problemas durante la amplificación. Esto permite afinar los resultados proporcionados por el *mixed stock analysis*, pues esta técnica parte de la base de que todas las zonas de nidificación contribuyen a la composición de la zona problema y por lo tanto el método no es capaz de detectar la no contribución de una zona. Gracias a los tests de asignación ha sido posible demostrar, por primera vez, la presencia real de tortugas mediterráneas en el Atlántico, algo sugerido por el *mixed stock analysis* pero de lo que faltaba una evidencia directa. Además, este tipo de análisis abre un abanico de nuevas posibilidades en el estudio de tortugas marinas, ya que se puede usar el origen de los individuos como factor a combinar con otros tipos de análisis. De esta forma, se puede determinar si el patrón de movimientos determinado por telemetría por satélite se relaciona con el origen de los individuos, o si la carga de contaminantes tiene que ver con el origen. Del mismo modo se podría determinar con más exactitud todavía el impacto de la pesca sobre las

diferentes poblaciones, ya que se podrían encontrar diferencias en cuanto a las tasas de captura o mortalidad de individuos de diferentes orígenes en una misma zona.

Ya hemos explicado anteriormente que la segregación de tortugas atlánticas y mediterráneas dentro del Mediterráneo occidental está de acuerdo con la hidrografía de la zona, pero sería deseable disponer de información directa de los ejemplares para corroborar dicha hipótesis. Los movimientos de los cinco individuos rastreados mediante telemetría por satélite se ajustan perfectamente a dicha hipótesis, ya que éstos se movieron generalmente por la zona comprendida entre las islas Baleares y la costa africana. Trabajos futuros combinando genética y telemetría permitirán profundizar aún más acerca de si las hipótesis que se formulan en esta tesis sobre los movimientos de las tortugas de diferentes orígenes se cumplen. En cualquier caso, estos individuos cambian de rumbo cuando se aproximan a la costa africana o a la península Ibérica, manteniéndose así en la cuenca argelina. La ausencia de diferencias en el coseno del ángulo medio de giro y la velocidad entre los tres tipos de hábitat considerados, plataforma, talud y océano abierto, sugiere además que la aparente selección de hábitat sería en realidad fruto de una dispersión básicamente pasiva, pues si la escasez de tortugas en la plataforma continental fuera el fruto de una selección activa, tanto la velocidad de desplazamiento como el coseno del ángulo de giro deberían aumentar cuando los animales se encuentran en este hábitat (Turchin 1991). Por otra parte, la distribución de las tortugas dentro de la plataforma continental sí se corresponde con la disponibilidad, apoyando la teoría de que no hay una selección activa, al menos en esta zona.

Sin embargo, la natación pasiva por sí sola no es suficiente para explicar los movimientos de las tortugas marcadas, ya que éstas muestran una clara preferencia por aguas oceánicas dentro la cuenca argelina, lo que no se corresponde con la disponibilidad de hábitat. Además, algunos animales se movieron hacia el oeste a lo largo de la costa africana, o hacia el sur a lo largo de la costa occidental del archipiélago balear, es decir, en contra de las principales corrientes. En ambos casos estos movimientos se dieron en el océano abierto, donde las corrientes no son tan fuertes (Millot 1987, Salat 1995). La natación contracorriente permitiría un incremento de la tasa de encuentro con el seston, y por lo tanto con el alimento, como ya se ha visto que ocurre en el Pacífico Norte (Polovina *et al.* 2000). Además, la existencia de una débil,

pero significativa, correlación entre la tasa de movimiento y el valor absoluto del ángulo de giro en cuatro de las cinco tortugas muestra que estos individuos combinan dos estrategias diferentes de natación: rápida y directa en hábitats no favorables, y lenta y tortuosa cuando se hallan en hábitats favorables. Un patrón similar se ha documentado para los albatros, que se desplazan activamente buscando frentes oceánicos y los bordes de plataformas continentales productivas (Hyrenbrach *et al.* 2002). Ahora bien, las tortugas seguidas por telemetría usaron el talud en proporción a su disponibilidad y pasaron la mayor parte del tiempo alejadas de los sistemas frontales que hay entre la península y las Islas Baleares (Pinot *et al.* 1994, Salat 1995), aunque sí ocuparon el área de elevada actividad a mesoescala asociada a los giros generados por la Corriente Argelina, que son sistemas de elevada productividad (Estrada 1996). Esta asociación con estos sistemas turbulentos también podría explicar por qué los movimientos de las tortugas en esta zona presentan un recorrido tortuoso con frecuentes giros con muchos más cambios de orientación que las tortugas estudiadas en el Pacífico Norte (Polovina *et al.* 2000) o en el Atlántico Norte (Dellinguer y Freitas 1999). Futuros trabajos combinando el seguimiento por telemetría con medidas simultáneas de las corrientes geostroóficas ayudará a clarificar cómo las tortugas explotan las estructuras hidrográficas en el Mediterráneo Occidental (Luschi *et al.* 2003).

El área que usan las tortugas rastreadas en esta tesis se solapa con las zonas de pesca empleadas por la flota española de palangre de superficie (Camiñas y de la Serna 1995), a la cual se le atribuye una elevada tasa de capturas de tortugas marinas por unidad de esfuerzo (Mayol *et al.* 1988, Aguilar *et al.* 1995, Camiñas y de la Serna 1995). Resulta destacable que los transmisores de dos de las tortugas rastreadas transmitieron enteramente desde superficie durante el último ciclo de actividad que registraron (8 h), algo que no se observó en ninguna de las otras tortugas ni en registros previos de estas mismas tortugas. Este tipo de comportamiento ha sido interpretado como una evidencia de captura (Hays *et al.* 2003). Aunque resulta imposible saber si los animales murieron o fueron liberados una vez quitado el transmisor, es muy probable que estas tortugas interactuaran con la pesquería, lo que da idea de la magnitud del problema.

No obstante, el palangre de superficie podría no ser la principal amenaza para las tortugas que utilizan las zonas de alimentación del Mediterráneo occidental, a pesar de

las estimas disponibles sobre la posible captura accidental de 15.000 tortugas anuales por parte de la flota española (Mayol et al. 1988, Aguilar et al. 1995, Camiñas 1988). Algunos estudios preliminares ya habían sugerido que el trasmallo podría representar otra importante amenaza para las tortugas (Delaugerre 1987; Laurent 1991; Godley *et al.* 1998), aunque la mortalidad que llevaban asociada no se había podido cuantificar. El estudio sobre las capturas accidentales de tortugas marinas por parte de la flota con base en las islas Baleares ha permitido por primera vez dicha cuantificación, demostrando que el trasmallo de langosta es una fuente importante de capturas, al menos en las Islas Baleares. El escaso número de capturas anuales realizado por cada embarcación se ve compensado por el hecho de que la flota de trasmallo de langosta incluye varios centenares de embarcaciones, lo que resulta en una cifra global de capturas elevada. La amenaza que este arte de pesca representa para las tortugas se ve agravada por el hecho de que tanto las encuestas como los embarques desvelaron que la mayoría de las tortugas que interaccionaron con el trasmallo de langosta morían de forma directa debido a la interacción, ya que las redes de trasmallo debido al largo tiempo que se hallan sumergidas las tortugas mueren asfixiadas. Por el contrario, la mayoría de los individuos pescados con palangre de superficie son liberados con vida, ya que este arte permanece cerca de superficie, tal y como ya se había descrito en trabajos anteriores (Delaugerre 1987, Laurent 1991, Aguilar *et al.* 1995). La mortalidad que se produce una vez las tortugas capturadas por el palangre son liberadas se considera que es relativamente baja (Polovina *et al.* 2000), con tasas de supervivencias probablemente superiores al 50% (Aguilar et al. 1995; NMFS-SEFSC 2001). Esta supervivencia, sumada a una captura anual de 15.000 tortugas en todo el Mediterráneo occidental (Mayol *et al.* 1988, Aguilar *et al.* 1995, Camiñas 1988), supone una mortalidad estimada de unos 7.500 individuos en toda la cuenca. Por otro lado, un total de 196 individuos son capturados anualmente en el archipiélago Balear mediante trasmallo, los que sugiere que probablemente miles de individuos mueren anualmente en la totalidad del Mediterráneo occidental debido a la interacción con trasmallos, lo que convertiría este arte en la segunda causa de mortalidad de juveniles de tortuga boba en esta cuenca.

De todos modos, la heterogeneidad espacial de la captura de tortugas por unidad de esfuerzo en torno a las Baleares sugiere que la vulnerabilidad de las tortugas a diferentes artes podría variar también en diferentes regiones del Mediterráneo. Así la pesca de arrastre apenas captura tortugas en las Islas Baleares, pero puede ser una

importante fuente de capturas allí donde la plataforma continental es muy extensa, como sucede en el Mar Adriático (Gerosa y Casale 1999). Por otra parte, y dada la heterogénea distribución de tortugas mediterráneas y atlánticas en el Mediterráneo occidental, la incidencia global de cada arte dependerá de su distribución regional. Así, el palangre de superficie se utiliza básicamente en la cuenca argelina (Camiñas y de la Serna 1995), una zona habitada básicamente por tortugas de origen atlántico. En cambio, el Adriático es una zona habitada básicamente por tortugas mediterráneas, al igual que el resto de la orilla europea. Por lo tanto, la mortalidad generada por el palangre de superficie incidiría básicamente sobre la población atlántica, mientras que la mortalidad generada por otros artes utilizados a lo largo de la orilla europea del Mediterráneo, previsiblemente trasmallo y arrastre, incidiría sobre la población mediterránea. Dado que ambas poblaciones tienen un estado de conservación muy distinto, el impacto de dichas mortalidades tendría también un efecto comparativamente distinto.

En las zonas de nidificación del Atlántico se registran actualmente unos 80.000 nidos por año (Ehrhart *et al.* 2003) por lo que es una de las zonas de nidificación más abundantes de tortuga boba. Las capturas accidentales de inmaduros tardíos y adultos por la pesca de arrastre en el Golfo de Méjico y en el litoral Atlántico de Estados Unidos llevaron a estas poblaciones a un progresivo declive (NRC 1990), que en años recientes ha podido ser revertido gracias a la incorporación de los dispositivos conocidos como TEDs (*Turtles Excluder Device*) en el aparejo de arrastre. El resultado ha sido un incremento del número de hembras nidificantes (NMFS-SEFSC 2001). Por el contrario, las poblaciones del Mediterráneo apenas registran unos 5.000 nidos al año como consecuencia de décadas de explotación (Margaritoulis *et al.* 2003), lo que ha llevado a algunos autores (Groombridge 1990) a considerar las poblaciones del Mediterráneo como “en peligro crítico”. Así pues, reducir el número de tortugas muertas anualmente por la flota palangrera en el Mediterráneo occidental sin duda favorecerá a la población norteamericana, pero a penas tendrá incidencia sobre el futuro de la población mediterránea. Para ello sería necesario reducir la mortalidad difusa que pueden estar causando el arrastre y el trasmallo a lo largo del litoral septentrional del Mediterráneo occidental y en el conjunto del Mediterráneo oriental.

Conclusiones

"La conclusión es que sabemos muy poco
y sin embargo es asombroso lo mucho que conocemos".
Bertrand Russell (1872-1970); filósofo y matemático inglés

1. Las poblaciones de tortuga boba del Mediterráneo están aisladas genéticamente de las del Atlántico, a pesar de derivar de aquellas y de compartir ciertas zonas de alimentación durante la fase juvenil.
2. Las poblaciones de tortuga boba del Mediterráneo presentan una clara estructuración genética tanto en su ADN mitocondrial como en su ADN nuclear. Israel, Grecia, Turquía y Chipre forman unidades diferenciadas, actuando la población de Creta como nexo entre las poblaciones del Jónico y las del Levante mediterráneo.
3. El flujo génico mediado por machos entre las poblaciones mediterráneas es mayor que el mediado por hembras, indicando una mayor filopatría de las segundas.
4. Para evaluar el estado de las poblaciones de especies amenazadas se recomienda combinar marcadores de herencia materna y marcadores de herencia biparental o, en el caso de animales con determinación cromosómica del sexo, de herencia paterna.
5. A pesar del declive que han sufrido la población mediterránea de tortuga boba, su variabilidad genética nuclear es comparable a la de las poblaciones atlánticas. Esto se debe, en parte, al papel de Creta y Chipre, que garantizan un flujo mediado por machos entre poblaciones, evitando así que las más reducidas pierdan variabilidad.

6. La conservación de la variabilidad genética de la población mediterránea depende de la conservación de las cuatro unidades principales (Israel, Grecia, Turquía y Chipre), así como de Creta.
7. Los juveniles de la población mediterránea tienen importantes zonas de alimentación en el Mediterráneo occidental e incluso en el Atlántico europeo.
8. En el Mediterráneo occidental, las tortugas de origen mediterráneo se concentran a lo largo de la orilla europea, mientras que las tortugas de origen atlántico se concentran en la parte meridional de la cuenca. Esta distribución es fruto del patrón de corrientes superficiales.
9. Los marcadores mitocondriales y nucleares ofrecen el mismo resultado en el análisis de agregaciones mixtas (*mixed stock analysis*), aunque el uso de microsatélites genera menores intervalos de confianza.
10. La incorporación del tamaño poblacional al análisis de agregaciones mixtas (*mixed stock analysis*) genera resultados más plausibles desde el punto de vista biológico, con independencia del marcador.
11. Los microsatélites permiten asignar individualmente a la población atlántica o mediterránea a la mayor parte de los ejemplares procedentes de las zonas de alimentación mixta, dando mayor solidez a los resultados del análisis de agregaciones mixtas (*mixed stock analysis*).
12. El trasmallo es una importante fuente de capturas accidentales, con una elevada tasa de mortalidad. Si los datos de las Islas Baleares son extrapolables al resto del Mediterráneo occidental, ésta sería la segunda fuente de capturas accidentales de tortuga boba en la cuenca.
13. La distribución de las tortugas de origen Mediterráneo en el cuenca occidental apenas se solapa con la distribución del esfuerzo de la flota palangrera, por lo que el palangre de superficie no sería la principal amenaza para la conservación

de la población mediterránea. Este papel correspondería al trasmallo y, quizás, al arrastre.

14. La captura accidental de tortugas bobas por parte de la flota palangrera de superficie afectaría básicamente a la población norteamericana, ya que esta flota opera principalmente en aguas de la Cuenca Argelina.

Bibliografía

"Libros, caminos y días dan al hombre sabiduría".

Proverbio árabe

- Aguilar R., Mas J., Pastor X. (1995) Impact of the Spanish swordfish long-line fisheries on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* population in the western Mediterranean: 1-6. In Richardosn, J.I. and Richardson, T.H. (Eds.) *Proceedings of the 12th Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation* NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFSC-361.
- Argos (2000) User's manual. CLS, Ramonville, France.
- Bass AL, Epperly SP, Braun-McNeill J (2004) Multi-year analysis of stock composition of a loggerhead turtle (*Caretta caretta*) foraging habitat using maximum likelihood and Bayesian Methods. *Conservation Genetics*, **5**, 783-796
- Berli P (2002) MIGRATE version 1.7.6.1 - Documentation and Program. Available at <http://evolution.genetics.washington.edu/lamark.html>.
- Berli P, Felsenstein J (1999) Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, **152**, 763-773.
- Bentivegna F (2002) Intra-Mediterranean migration of loggerhead sea turtles monitored by satellite telemetry, *Marine Biology*, **141**, 795-800.
- Bentivegna F, Hochscheid S, Minucci C (2003) Seasonal variability in voluntary dive duration of the Mediterranean loggerhead turtle *Caretta caretta*. *Scientia Marina*, **67**, 371-375.
- Bentivegna F, Paglialonga A (1998) Identification of the Gulf of Naples as a feeding ground and migratory path for *Caretta caretta* in the Mediterranean sea. In: Abreu-Grobois FA, Briseño-Dueñas R, Márquez R, Sarti L (Comps) *Proceedings of the 18th Annual Symposium on Sea Turtle Conservation and Biology*. NOAA Tech Memo NMFS-SEFSC, **436**, 95-97.
- Blanco JC, González JL (eds.) (1992) Libro Rojo de los Vertebrados de España. Colección Técnica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación-ICONA

- Bolten AB (2003) Active swimmers-passive drifters: the oceanic juvenile stage of loggerheads in the Atlantic system. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 63–78.
- Bolten AB, Balazs GH (1995) Biology of the early pelagic stage-the “lost year”. In: Bjorndal KA (ed) *Biology and conservation of sea turtles* revised edition, Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 579-581.
- Bolten AB, Bjorndal KA, Martins HR, Dellinger T, Biscoito MJ, Encalada SE, Bowen BW (1998) Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecological Applications*, **8**, 1–7.
- Bowen BW, Abreu-Grobois FA, Balazs GH, Kamekazi N, Limpus CJ, Ferl RJ (1995) Trans-Pacific migrations of the loggerhead sea turtle demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 3731-3734.
- Bowen BW, Karl SA (1997) Population Genetics, Phylogeography, and Molecular Evolution. in Lutz, P.L.and Musick, J.A.(editors). *The biology of sea turtles* 1997; 29-50
- Bowen BW (2003) What is a loggerhead turtle? The genetic perspective. In: *Loggerhead Sea Turtles*, (eds. Bolten AB, Witherington BE), pp. 7-27. Smithsonian Books, Washington D.C.
- Bowen BW, Avise JC, Richardson JI, Meylan AB, Margaritoulis D, Hopkins-Murphy SR (1993) Population structure of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the Northwestern Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Conservation Biology*, **7** (4), 834-844 .
- Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen RJ (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology*, **14**, 2389-2402.
- Broderick AC, Glen F, Godely BJ, Hays GC (2002) Estimating the number of green and loggerhead turtles nesting annually in the Mediterranean. *Oryx*, **36**(3), 227-235.
- Cabin RJ, Mitchell RJ (2000) To Bonferroni or not to bonferroni: when and how are the questions. *Bull. Ecol. Soc. Am.*, **81**, 246-248.
- Camañas JA, de la Serna JM (1995) The loggerhead distribution in the western Mediterranean sea as deduced from captures by the Spanish long line fishery.

- In: Llorente G, Montori A, Santos X, Carretero MA (Eds) *Scientia Herpetologica*. Asociación Herpetológica Española, Barcelona, pp. 316-323.
- Camiñas JA, Valieras J (2003) Critical areas for loggerhead and leatherback marine turtles in the western Mediterranean sea and the Gibraltar Strait Region. In: Margaritoulis D, Demetropoulos A (eds) *Proceedings of the first Mediterranean conference on Marine turtles*. Barcelona Convention –Bern Convention-Bonn Convention, Nicosia Cyprus, pp 88-93
- Camiñas JA (1988) Incidental Captures of *Caretta caretta* (L.) with surface long-lines in the Western Mediterranean. *Rapports et process-Verbaux des Réunions Condensés des travaux présentés lors du XXXI Congrès Assemblée Plénier. Athènes*, **31** (2): 285, V.III4. C.I.E.S.M. Mónaco.
- Cardona L (2000) Effects of salinity on the habitat selection and growth performance of Mediterranean flathead grey mullet *Mugil cephalus* (Osteichthyes, Mugilidae). *Estuarine, coastal and Shelf Science*, **50**, 727-737.
- Carr AF (1986) Rips, FADS, and little loggerheads. *Bioscience*, **36**, 92-100.
- Casale P, Laurent L, Gerosa G, Argano R (2002) Molecular evidence of male-biased dispersal in loggerhead turtle juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **267**, 139-145.
- Clement M, Posada D, Crandall, KA (2000) TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9** (10), 1657-1660.
- Coles WC, Musick JA (2000) Satellite sea surface temperature analysis and correlation with sea turtle distribution off North Carolina. *Copeia*, **2000**, 551-554.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- Crouse DT, Crowder LB, Caswell H (1987) A stage-based population model for loggerhead sea turtles and implications for conservation. *Ecology*, **68** (5) 1412-1423.
- Cuadras CM (1983) *Problemas de probabilidad y estadística*. PPU Barcelona
- Delaugerre M (1987) *Statut des Tortues Marines de la Corse et de la Méditerranée*. Vie et Milieu 37, 243-264
- Delaugerre M, Cesarini C (2004) Confirmed Nesting of the Loggerhead Turtle in Corsica. *Marine Turtle Newsletter*, **104**, 12

- Dellinger T, Freitas C (1999) Movements and diving behaviour of pelagic stage loggerhead sea turtles in the North Atlantic: preliminary results obtained through satellite telemetry. In: Kalb H, Wibbels T (eds) *Proceedings of the 19th annual symposium on the sea turtle biology and conservation*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, **443**, 155-157.
- Dutton PH (1995) Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies In: *Proceedings of the International Symposium on Sea turtle Conservation Genetics* (eds. Bowen BW, Witzell WN), pp. 17-24. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, **396**. National Technical Information Service, Springfield, Virginia.
- Ehrhart LM, Bagley DA, Redfoot WE (2003) Loggerhead turtles in the Atlantic Ocean. In: *Loggerhead Sea Turtles* (eds. Bolten AB, Witherington BE) pp 157-174. Smithsonian Books, Washington D.C.
- Encalada SE, Bjorndal KA, Bolten AB, Zurita JC, Schroeder B, Possardt E, Sears CJ, Bowen BW (1998) Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Marine Biology*, **130** (4), 567-575.
- Epperly SP, Braun J, Chester AJ, Cross FA, Merriner JV, Tester PA (1995) Winter distribution of sea turtles in the vicinity of cape Hatteras and their interactions with the summer flounder trawl fishery. *Bulletin of Marine Science*, **56** (2).
- Estrada M (1996) Primary production in the northwestern Mediterranean. *Scientia Marina*, **60** (suppl 2): 55-64.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611-2620.
- FitzSimmons NN, Limpus CJ, Norman JA, Goldizen AR, Miller JD, Moritz C (1997a) Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **94**, 8912-8917.
- FitzSimmons NN, Moritz C, Limpus CJ, Pope L, Prince R (1997b) Geographic structure of Mitochondrial and Nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics*, **147**, 1843-1854.

- FitzSimmons NN, Moritz C, Moore SS (1995) Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **12** (3), 432-440.
- Fletmeyer JR (1978) Underwater tracking evidence that neonate loggerhead sea turtles seek shelter in drifting *Sargassum*. *Copeia*, **1**, 148.
- Frankham R, Ballou JD and Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. University Press, Cambridge.
- Gates, C.E. 1979. Line transect and other issues. In: Cormack, R.M., Patil, G.P. and Robson, D.S. (eds). *Sampling Biological Populations*. Statistical Ecology Series **5**(2) 1-154.
- Gerosa G, Casale P (1999) Interaction of Marine turtles with fisheries in Mediterranean. Tunis: UNEP (MAP), RAC/SPA.
- Godley BJ, Gücü AC, Broderick AC, Furness RW, Solomon SE (1998). Interaction between marine turtles and artisanal fisheries in the eastern Mediterranean: a probable cause of concern? *Zoology in the Middle East*, **16**, 48-64.
- Gómez de Segura A (2006) Abundancia y distribución de cetáceos y tortugas marinas en el Mediterráneo español. Universidad de Valencia. Tesis doctoral 131 pag
- Gómez de Segura A, Tomás J, Pedraza SN, Crespo EA, Raga JA. (2003) Preliminary patterns of distribution and abundance of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, around Columbretes Islands Marine Reserve, Spanish Mediterranean. *Marine Biology*, **143**, 817-823.
- Groombridge B (1990) Marine turtles in the Mediterranean: distribution, population status, conservation. *Nat. Environ. Ser. (Council of Europe)*, **48**, 1-98.
- Goudet J (1995) FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485-486.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361-372.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids Symp. Ser.*, **41**, 95-98.
- Hays GC, Åkesson B, Godley BJ, Luschi P, Santidrian P (2001) The implications of location accuracy for the interpretation of satellite tracking data. *Animal Behaviour*, **61**, 1035-1040.

- Hays GC, Broderick A, Godley BJ, Luschi P, Nichols WJ (2003) Satellite telemetry suggests high levels of fishing induced mortality in marine turtles. *Marine Ecology Progress Series*, **262**, 305-309
- Houghton JDR, Broderick AC, Godley BJ, Metcalfe JD, Hays GC (2002) Diving behaviour during the interesting interval for loggerhead turtles *Caretta caretta* nesting in Cyprus. *Marine Ecology Progress Series*, **227**, 63-70.
- Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics*, **155**, 2011.
- Hykle D (2000) Tratados internacionales de conservación. In Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois Fam, Donnelly M (eds.) *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas UICN/CSE* Publicación n°4
- Hyrenbrach KD, Fernández P, Anderson DJ (2002) Oceanographic habitats of two sympatric North Pacific albatroses during the breeding season. *Marine Ecology Progress Series*, **233**, 283-301
- IUCN (2006). *2004 IUCN Red List of Threatened Species*.
- Ivlev VF (1961) Experimental ecology of feeding of fishes. Yale University Press, New Haven, CT.
- Keith DM, Hoggard W (1999) Visual surveys of cetaceans and sea turtles from aircraft and ships. In USGS 1999 Cetaceans, sea turtles and seabirds in the Northern Gulf of Mexico: distribution, abundance and habitat associations. Vol. **II**, chapter 4 111-171.
- Khalil M, Syed H, Aureggi M and Venizelos L (2005) Marine Turtle nesting at El Mansouri, South Lebanon. *Book of abstracts of the II Mediterranean Conference on Marine Turtles*, Turkey 28.
- King M (1995) Fisheries Biology, Assessment and Management. Fishing News Books. Oxford
- Laurent L (1991) Les tortues marines des côtes françaises Méditerranéennes continentales. *Faune de Provence (C.E.E.P.)* **12**, 76-90
- Laurent L, Abd El-Mawla EM, Bradai MN, Demirayak F, Oruç A (1996). Reducing sea turtle mortality induced by Mediterranean fisheries: trawling activity in Egypt, Tunisia and Turkey. Report of the WWF project 9E0103. Rome: WWF International Mediterranean program.

- Laurent L, Casale P, Bradai MN *et al.* (1998). Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Molecular Ecology*, **7**, 1529-1542.
- Laurent L, Lescure J (1995) Attempt of spatial-temporal pattern distribution of Loggerhead Turtle in the Mediterranean. *Scientia Herpetologica*, 324-327.
- Laurent L, Lescure J, Excoffier L, *et al.* (1993) Genetic studies of relationships between Mediterranean and Atlantic populations of loggerhead turtle *Caretta caretta* with a mitochondrial marker. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences, Paris* **316**, 1233-1239.
- Lazar B, Tvrtkovic, N (2002) Marine turtles and fisheries in the Mediterranean: are we missing something? In *22th Annual Symposium on Sea Turtle and Conservation, Miami USA (in press)*.
- Llorente GA, Carretero MA, Pascual X, Perez A (1992). New record of a nesting loggerhead turtle *Caretta caretta* in western Mediterranean. *Br. Herp. Soc. Bull.*, **42**, 14-17.
- Lohmann KJ, Lohmann CMF (2003) Orientation mechanisms of hatchling loggerheads. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 44–62
- Luschi P, Hays GC, Del Seppia C, Marsh R, Papi F (1998) The navigational feats of green sea turtles migration from Ascension Island investigated by satellite telemetry. *Proceedings of the Royal Society of London B Biology Science*, **265**, 2279-2284
- Luschi P, Hays GC, Papi F (2003) A review of long distance movements by marine turtles and the possible role of ocean currents. *Oikos*, **102**, 293-302
- Lutcavage ME, Plotkin P, Witherington B, Lutz PL (1997) Human Impacts on Sea Turtle Survival. in Lutz, P.L.and Musick, J.A.(editors) *The Biology of Sea Turtles*, 387-410, CRC Marine Serie, Boca Raton.
- Lutcavage ME Lutz PL (1997). Diving Physiology. in Lutz, P.L.and Musick, J.A.(editors) *The Biology of Sea Turtles*, 277-296, CRC Marine Serie, Boca Raton
- Lutz PL, Bergey A, Bergey M (1989) Effects of temperature on gas exchange and acid-base balance in the sea turtle *Caretta caretta* at rest and during routine activity. *Journal of Experimental Biology*, **144**, 155-169

- Margaritoulis D (1998) Interchange of nesting loggerheads among Greek beaches. In *Proceedings of the Seventeenth Annual Sea Turtle Symposium* (eds. Epperly SP, Braun J). pp 225-227. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-415. National Marine Fisheries Service, Southeast Fisheries Science Center, Orlando, Florida.
- Margaritoulis D, Argano R, Baran I, *et al.* (2003) Loggerhead turtles in the Mediterranean Sea : Present knowledge and conservation perspectives. In: *Loggerhead Sea Turtles* (eds. Bolten AB, Witherington BE) pp. 175-198. Smithsonian Books, Washington D.C.
- Marsh H, Saalfeld WK (1990) The distribution and abundance of dugongs in the Great Barrier Reef Marine Park south of Cape Bedford. *Australian Wildlife Research*, **17**, 511-524.
- Marsh H, Sinclair DF (1989) An experimental Evaluation of Dugong and Sea Turtle aerial Survey Techniques. *Australian Wildlife Research*, **16**, 639-650.
- Mayol J, Muntaner J, Aguilar R (1988) Incidencia de la Pesca Accidental sobre las Tortugas Marinas en el Mediterráneo Español. *Boll. Soc. Hist. Nat. Balears*, **32**. 19-31. Palma de Mallorca
- Meylan AB, Bowen BW, Avise JC (1990) A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Science*, **248**, 724-727.
- Miller JD (1997) Reproduccion in Sea Turtles. in Lutz, P.L.and Musick, J.A.(editors) *The Biology of Sea Turtles*, 51-82, CRC Marine Serie, Boca Raton.
- Miller JD, Limpus CJ Godfrey MH (2003) Nest site selection, oviposition, eggs, development, hatchling and emergence of loggerhead turtles. In: *Loggerhead Sea Turtles* (eds. Bolten AB, Witherington BE) pp. 125-143. Smithsonian Books, Washington D.C.
- Millot C (1987) Circulation in the western Mediterranean Sea. *Oceanological Acta*, **10**,143-149.
- Millot C (2001) Mesoscales and seasonal variabilities of the circulation in the western Mediterranean. *Dynamic Atmos. Ocean.*, **15**, 179-214.
- Moore MK, Ball RM (2002) Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **11**, 281-288.
- Moran MD (2003). Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies. *Oikos*, **100**, 2 403-405.

- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The Bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, **29**, 1-10.
- Nei M (1982) Evolution of human races at the gene level. In: *Human genetics part A: the unfolding genome* (eds. Bone-Tamir B, Cohen T, Goodman RM) pp 167-181 Alan R Liss New York.
- Nichols WJ, Resendiz A, Mayoral-Rousseau C (1999) Biology and conservation of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in Baja California, Mexico. In: Kalg, H.J. and Wibbels, T. (eds.) *Proceedings of the Nineteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. U.S. Dept. Commerce. NOAA. Tech. Memo. NMFS SEFSC, **443**, 169-171
- NMFS-SEFSC [National Marine Fisheries service- SouthEast Fisheries Science Center] (2001) Stock Assessments of loggerhead and leatherback sea turtles and assessment of the impact of the pelagic longline fishery on the loggerhead and leatherback sea turtles of the western North Atlantic. *U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC*, **455**, 343pp.
- NRC [National Research Council] (1990) Decline of the Sea Turtles: Causes and Prevention. National Academy Press, Washington D.C. 259 pp.
- Okuyama T, Bolker B.M (2004) Combining genetic and ecological data to estimate sea turtle origins. *Ecological Applications*, **15**, 315-325.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* **13**, 55-65.
- Pella J, Masuda M (2001) Bayesian methods for analysis of stock mixtures from genetic characters. *Fish. Bull.*, **99**, 151-167.
- Perneger TV (1998) What's wrong with Bonferroni adjustments. *Br. Med. J*, **316**, 1236-1238.
- Pinardi N, Masetti E (2000) Variability of the large scale general circulation of the Mediterranean sea from observations and modelling: a review. *Palaeogeogr Palaeoclimat Palaeoecol*, **158**, 153-173.
- Pinot JM, Tinotre J, Gomis D (1994) Quasi-synoptic mesoscale variability in the Balearic Sea. *Deep Sea Research*, **41**, 897-914.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, *et al.* (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment

- Polovina JJ, Kobayashi DR, Parker DM, Seki MP, Balazs GH (2000) Turtle on the edge: movement of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along oceanic fronts, spanning longline fishing grounds in the central North Pacific, 1997-1998. *Fisheries Oceanography*, **9**, 71-82.
- Preen AR, Marsh H, Lawler IR, Prince RIT, Shepherd R (1997) Distribution and abundance of dugongs, turtles, dolphins and other megafauna in Shark Bay, Nogaloo Reef and Exmouth Gulf, Western Australia. *Wildlife Research*, **24** 185-208.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Pritchard PC, Mortimer JA (2000) Taxonomía, morfología externa e identificación de las Especies. In Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois Fam Donnelly M (eds.) *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas UICN/CSE* Publicación nº4.
- Pritchard PC (1997) Evolution, Phylogeny, and Current status. in Lutz, P.L. and Musick, J.A. (editors). 1997. *The Biology of Sea Turtles*; 1-28. CRC Marine Serie, Boca Raton.
- Pritchard PC (1999) Status of the Black Turtle. *Conservation Biology*; **13**, 1000-1003.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Rolf DA, Bentzen P (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X2 and the problem of small samples. *Molecular Biology and Evolution*, **6**, 539-545.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496-2497.
- Salat J (1995) The interaction between the Catalan and Balearic currents in the southern Catalan Sea. *Oceanological Acta*, **18**, 227-234
- Salvador A (1974). Guía de los anfibios y reptiles españoles. ICONA Madrid
- Schroeder BA, Foley AM, Bagley DA (2003) Nesting patterns, reproductive migrations, and adult foraging areas of loggerhead turtles. In: *Loggerhead Sea Turtles* (eds. Bolten AB, Witherington BE) pp. 114-124. Smithsonian Books, Washington D.C.

- Sella I (1982). Sea turtles in the eastern Mediterranean and northern Red Sea. In: *Biology and Conservation of Sea turtles* (Bjorndal KA eds.), 417-423 Washington DC Smithsonian Institution Press.
- Shoop CR, Kenney RD (1992) Seasonal distributions and abundances of loggerhead and leatherback sea turtles in waters of the northeastern *United States*. *Herpetol. Monogr.*, **6**, 43-67.
- Silvani L, Gazo M, Aguilar A (1999) Spanish drifnet fishing and incidental catches in the western Mediterranean. *Biological Conservation*, **90**, 79-85.
- Smith WG (1968) A neonate Atlantic loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, captured at sea. *Copeia*, **4**, 880.
- Smith WHF, Sandwell DT (1997) Global seafloor topography from satellite altimetry and ship depth soundings. *Science*, **277**, 1957-1962.
- Strauss RE (1979) Reliability estimates of Ivlev's electivity index, the forage ratio, and a proposed linear index of food selection. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, **51**, 257-280.
- Takahata N, Palumbi SR (1985) Extranuclear differentiation and gene flow in the finite island model. *Genetics*, **109**, 441-457.
- 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**, 619-633.
- Thompson NB, Shoop CR (1981) Statistical analyses of sea turtles data derived from the 1979 cetacean and turtle assessment program. *A Report to the National Marine Fisheries Service*. NMFS Contract NA-81-FA-C-00011
- Tomás J, Aznar FJ, Raga JA (2001) Feeding ecology of the loggerhead turtle *Caretta caretta* in the western Mediterranean. *J. Zool. Lond.*, **255**, 525-532.
- Tomas J, Fernández M, Raga JA (2003) Sea turtles in Spanish Mediterranean waters: surprises in 2001. *Marine Turtle Newsletter*, **101**, 1-3.
- Tomas J, Mons JL, Martin JJ, Bellido JJ, Castillo JJ (2002) Study of the first reported nest of loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, in the Spanish Mediterranean coast. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **82**, 1005-1007.
- Turchin P (1991) Translating foraging movements in heterogeneous environments into the spatial distribution of foragers. *Ecology*, **72**, 1252-1266
- Universitat de Barcelona (UB) (2002) Actuaciones para la Conservación del Delfín Mular. Memoria Final de Resultados no publicada.

- Witherington BE (1994) Some "lost year" turtles found. In: Schroeder BA, Witherington BE (eds) *Proceedings of the 13th annual symposium on sea turtle biology and conservation*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, **341**, 192.
- Witzell, WN, Azarovitz T (1996) Relative abundance and thermal and geographic distribution of sea turtles off the U.S. Atlantic coast based on aerial surveys (1936-1969). *NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC* **381**.
- Witzell WN (1999) Distribution and relative abundance of sea turtles caught incidentally by the U.S. pelagic longline fleet in the western North Atlantic Ocean, 1992-1995. *Fish. Bull.*, **97**, 200-211.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal $1/(4Nm+1)$. *Heredity*, **82**, 117-125.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**, 323-354
- Wyneken J, Salmon M (1992) Frenzy and postfrenzy swimming activity in loggerhead, green, and leatherback hatchling sea turtles. *Copeia*, **1992**, 478-484.
- Zaykin DV, Pudovkin AI (1993). Two programs to estimate significance of X^2 values using pseudo-probability tests. *J. Hered.*, **84**, 152.
- Zar JH (1984) Biostatistical analysis. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Publicaciones

Esta tesis es el resultado de la compilación de los siguientes trabajos de investigación, los cuales se encuentran publicados, aceptados o enviados para publicar en diversas revistas científicas:

- **Artículo 1:** CARRERAS C, Pascual M, Cardona L, Aguilar A, Margaritoulis D, Rees A, Turkozán O, Levy Y, Gasith A, Aureggi M, Khalil M (2006) The genetic structure of the Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications. *Conservation Genetics* (available online DOI: 10.1007/s10592-006-9224-8)
- **Artículo 2:** CARRERAS C, Pascual M, Cardona L, Aguilar A, Marco A, Rico C, Roques S, Bellido JJ, Castillo JJ, Tomas J, Raga JA, SanFélix M, Fernández G, Margaritoulis D, Rees A, Turkozán O, Levy Y, Gasith A, Aureggi M, Khalil M (2006) DNA microsatellites reveal genetic isolation of the Mediterranean loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). (in prep).
- **Artículo 3:** CARRERAS C, Pont S, Maffucci F, Pascual M, Barceló A, Bentivegna F, Cardona L, Alegre F, SanFélix M, Fernández G, Aguilar A (2006) Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns. *Marine Biology*, **149**: 1269-1279.
- **Artículo 4:** CARRERAS C, Pascual M, Cardona L, Aguilar A, Marco A, Rico C, Mons JL, Martín JJ, Tomas J, Raga JA, Fernández G, San Félix M (2006) Using mtDNA and microsatellites for origin assessment in marine turtles feeding grounds. (in prep).
- **Artículo 5:** Cardona L, Revelles M, CARRERAS C, SanFélix M, Gazo M Aguilar A (2005) Western Mediterranean Immature loggerhead turtles: habitat

use in spring and Summer assessed through Satellite tracking and aerial surveys.
Marine Biology, **147**, 583-591.

- **Artículo 6:** CARRERAS C, Cardona L, Aguilar A (2004) Incidental Catch of the loggerhead sea turtle off the Balearic Islands (western Mediterranean).
Conservation Biology, **117**, 321-329.

Artículo 1: The genetic structure of the Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications

"Si estudio, no es por saber más, sino por ignorar menos".

Anónimo.

Resumen:

Las poblaciones nidificantes de tortuga boba en el Mediterráneo han sufrido un declive generalizado en el último siglo debido principalmente a la acción humana. La posibilidad de que exista una estructuración genética interna puede agravar esta situación ya que un flujo restringido unido a un tamaño poblacional reducido, puede llevar a una pérdida importante de variabilidad genética por consanguinidad o deriva genética.

Para determinar la estructura genética de las poblaciones de tortuga boba (*Caretta caretta*) del Mediterráneo se han analizado muestras de nueve zonas de nidificación mediante la secuenciación de un fragmento de la región control del ADN mitocondrial (n=190) y siete zonas mediante microsatélites (n=112). Usando estos datos se estimó la diferenciación genética entre poblaciones así como medidas de flujo génico, la presencia de cuellos de botella o diferencias significativas en la variabilidad genética entre poblaciones teniendo en cuenta las diferencias existentes en cuanto a tamaño poblacional.

Los dos tipos de marcadores revelaron estructuración genética (mtADN: $\gamma_{st}=0.212$, $P<0.001$; nADN $F_{st}=0.006$, $P<0.001$), indicando de este modo que tanto los machos como las hembras de esta especie son filopátricos en el Mediterráneo y que el flujo génico entre poblaciones es restringido. La estructuración obtenida con ADN mitocondrial sugiere la existencia de las siguientes unidades genéticas: Grecia (Zakynthos y Lakonikos), Turquía oriental, Israel y Chipre, mientras que la obtenida con los microsatélites sugiere también las unidades de Grecia, Chipre e Israel así como Turquía occidental. El ADN mitocondrial indica que las poblaciones de hembras nidificantes de Creta y Chipre han sufrido un reciente cuello de botella o un evento de colonización, ya que su variabilidad es nula. Sin embargo, los marcadores nucleares no revelan ningún cuello de botella ni un efecto fundador. Estos resultados indican la existencia de un flujo génico mediado por machos que puede haber incrementado la variabilidad genética nuclear en estas poblaciones, así como en aquellas de pequeño tamaño poblacional, como Israel o El Líbano. Creta, y en menor medida Chipre, podrían realizar un papel central en este flujo génico mediado por machos.

Esta compleja estructuración genética indica que determinar la relevancia de la conservación de cada población tan sólo en base a su variabilidad genética y tamaño poblacional puede ser contraproducente, ya que algunas poblaciones que no cumplan estos requisitos pueden jugar un papel importante en el intercambio genético y de esta forma contribuir a la variabilidad genética global.

The genetic structure of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in the Mediterranean as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications

C. Carreras · M. Pascual · L. Cardona · A. Aguilar ·
D. Margaritoulis · A. Rees · O. Turkozan · Y. Levy ·
A. Gasith · M. Aureggi · M. Khalil

Received: 16 March 2006 / Accepted: 18 September 2006
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract The population genetic structure of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) nesting in the eastern Mediterranean was assessed by sequencing a fragment of the control region of the mitochondrial DNA ($n = 190$) and seven microsatellites ($n = 112$). The two types of markers revealed genetic structuring (mtDNA: $\gamma_{st} = 0.212$, $P < 0.001$; nDNA $F_{st} = 0.006$, $P < 0.001$), thus indicating that both females and males are philopatric and that gene flow between populations is restricted. Mitochondrial DNA data indicate that the female populations nesting on the islands of Crete and Cyprus have suffered a recent bottleneck or colonization event. However, no bottleneck or founder effect was revealed by nuclear markers, thus indicating male-mediated gene flow from other populations that would increase nuclear genetic variability. Crete, and to a lower extent Cyprus, are thought to play a central role in such male-mediated gene flow that may reduce the negative effect of genetic drift or inbreeding on the

small populations of Lebanon and Israel. This population structure indicates that assessing population relevance only on the basis of genetic variability and size would be misleading, as some populations not fulfilling those requirements may play a relevant role in genetic exchange and hence contribute to the overall genetic variability.

Keywords *Caretta caretta* · Mitochondrial DNA · Microsatellite DNA · Mediterranean · Genetic structure

Introduction

The circumtropical loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) is the most common sea turtle breeding in the Mediterranean sea (Broderick et al. 2002). It is estimated that about 5,000 nests are laid every year in the Mediterranean (Margaritoulis et al. 2003), much less than the large rookeries of the Atlantic (about 80,000

C. Carreras · L. Cardona · A. Aguilar
Department of Animal Biology, Faculty of Biology,
University of Barcelona, Avda. Diagonal 645,
E-08028 Barcelona, Spain

C. Carreras (✉)
Estación Biológica de Doñana-CSIC-Apdo.,
1056-E-41013 Sevilla, Spain
e-mail: carreras@ebd.csic.es

M. Pascual
Department of Genetics, Faculty of Biology,
University of Barcelona, Avda, Diagonal 645,
E-08028 Barcelona, Spain

D. Margaritoulis · A. Rees
ARCHELON, The Sea Turtle Protection Society of Greece,
Solómuou 57, GR-104 32 Athens, Greece

O. Turkozan
University of Adnan Menderes, 09010 Aydin, Turkey

Y. Levy
The Israel Sea Turtle Rescue Centre, Nature Parks
Authority, Mevot Yam, Mikhmoret 40297, Israel

Y. Levy · A. Gasith
Department of Zoology, Faculty of Life Sciences,
Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel

M. Aureggi
Naucrates, Via Corbetta, 11, 22063 Cantù, CO, Italy

M. Khalil
MEDASSET, P.O. Box 19, Tyre, Lebanon

nests/year; Ehrhart et al. 2003) or the Indian Ocean (about 20,000–40,000 females/year that represents about 70,000–140,000 nests/year; Baldwin et al. 2003). Most rookeries are located in the eastern Mediterranean basin (Margaritoulis et al. 2003) although sporadic nesting has been reported from the western basin (Llorente et al. 1992; Tomas et al. 2002; Delaquerre and Cesarini 2004).

The species is listed as “endangered” globally by the IUCN (IUCN 2006) although Groombridge (1990) considered the Mediterranean populations as “critically endangered”. The Mediterranean population has declined due to incidental catch by fishing activity, egg harvest and tourism development (Margaritoulis et al. 2003). Moreover, genetic studies on Mediterranean loggerhead sea turtles (Bowen et al. 1993; Encalada et al. 1998) provided more arguments for considering the Mediterranean a relevant area for conservation of the loggerhead sea turtle as it is for green sea turtle, *Chelonia mydas* (IUCN 2006).

Population genetic studies with marine turtles first used the mitochondrial DNA (mtDNA) using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) (e.g. Bowen et al. 1992, 1993) and then focused on the control region of the mtDNA by sequencing (e.g. Bowen et al. 1998, 2005; Encalada et al. 1996, 1998; Laurent et al. 1998). The mtDNA is maternally inherited and high levels of genetic structuring were found all around the world either by RFLPs or by sequencing. These high levels of genetic structuring indicated that the females of marine turtles were highly philopatric to the beaches where they were born (Meylan et al. 1990). Studies on the Mediterranean loggerhead sea turtle populations (Bowen et al. 1993; Encalada et al. 1998) indicated that these rookeries became isolated from the Atlantic populations at the beginning of the Holocene, and should be considered an independent management unit. Genetic isolation from the Atlantic populations is likely to further increase the vulnerability of the Mediterranean population, not only because the strength of stochastic phenomena increases, but also because of the potential reinforcement of inbreeding depression and loss of diversity through genetic drift. Furthermore, the existence of internal genetic structuring has been proposed to increase the probability of local extinctions in animal populations (Frankham et al. 2002). Although this has not been proved for marine turtles, the existence of several different management units within the Mediterranean, some of them of extremely small size (Margaritoulis et al. 2003; Khalil et al. in press), would make extinction risk even higher.

Nuclear markers (nDNA) were incorporated to marine studies first as RFLPs of anonymous nuclear

loci (Karl et al. 1992), then as randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) (Schroth et al. 1996) and more recently as microsatellites (e.g. Bowen et al. 2005; FitzSimmons et al. 1997b), biparentally inherited markers that, combined with mtDNA, provide a further insight into the structure of marine turtle populations, as mtDNA ignores male-mediated gene flow. This combined approach has revealed that the Atlantic populations of the loggerhead sea turtle in the northern hemisphere are highly structured with mtDNA, hence reflecting the high philopatry of the females, but no structure exists for the nDNA due to male-mediated gene flow. As a result, male-mediated gene flow would prevent genetic isolation in Atlantic loggerhead sea turtles despite female philopatry (Bowen et al. 2005). Similar results were reported by FitzSimmons et al. (1997b) for Australian green turtles.

Available information suggests that this may not be a likely scenario in the Mediterranean, as regional genetic structuring has been observed not only for mitochondrial DNA markers (Laurent et al. 1993, 1998; Schroth et al. 1996; Encalada et al. 1998), but also in nuclear DNA (Schroth et al. 1996). Unfortunately, sample effort has been uneven and some areas have been poorly sampled or not sampled at all. Without more detailed information on the genetic structure of the populations nesting in the eastern Mediterranean, identifying management units is difficult and may lead to inappropriate management decisions. The absence of internal structuring would indicate that the Mediterranean rookeries may be treated as a single management unit and hence, the loss of small local nesting sites would not hinder the conservation of the overall genetic variability. Otherwise, if internal structuring exists, several management units would be defined and should be preserved to guarantee healthy populations.

The purposes of this paper are (1) to assess the population structure of Mediterranean loggerhead populations, including gene flow and possible bottlenecks among the nesting sites, using both nuclear (nDNA) and mitochondrial (mtDNA) markers and (2) identify those populations that need to be protected in order to preserve the genetic diversity of the Mediterranean rookeries.

Methods

Collection and DNA extraction

During the nesting seasons of 2003 and 2004, hatchlings were sampled from 112 independent nests found in seven different nesting areas in the Mediterranean

(Fig. 1). Individuals were collected from Zakynthos, Lakonikos and Crete in Greece; Fethiye, in west Turkey; northern Cyprus; El Mansouri in Lebanon; and sites scattered along the Israeli coastline (Table 1). To avoid pseudoreplication (e.g. sampling hatchlings from two nests of the same female), sampled females were tagged with external flipper tags or subcutaneous PIT tags. When this was unfeasible, samples were collected only from clutches laid within a 15-day window, as females rarely nest at intervals shorter than this period. These procedures are expected to ensure independency of the collected samples. Furthermore, when dead embryo/hatchlings from a nest were found, only one was collected and analyzed. From each individual, muscle or skin samples were stored in 95% ethanol. DNA was extracted using the QIAamp extraction kit (QIAGEN®) following the manufacturer's instructions.

Mitochondrial DNA analysis

A fragment of 391 base-pair (bp) of the mtDNA control region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer pairs TCR1 and TCR2 (Norman et al. 1994) as described in Carreras et al. (2006).

Sequences were aligned by eye using the program BioEdit version 5.0.9 (Hall 1999) and compared with haplotypes previously described (Bolten et al. 1998; Encalada et al. 1998; Carreras et al. 2006) and found in the Archie Carr Center for Sea Turtle Research database (<http://accstr.ufl.edu/>). Previous data from the Greek population of Kyparissia (Encalada et al. 1998) and from Cyprus and eastern Turkey (Laurent et al.

1998) were also included in the present work for statistical analysis (Table 1). In order to establish haplotype relationships, a haplotype network was constructed using package TCS v1.02 (Clement et al. 2000), which implements the statistical parsimony (SP) described in Templeton et al. (1992).

Genetic differentiation between different samples from the same location was assessed with the Chi-square test (Cuadras 1983) as implemented in the program CHIRXC (Zaykin and Pudovkin 1993). When statistical differences were not found between published and present data of the same nesting area, the two sets were considered to be subsamples of the same population. Both groups of studies were cautious in order to avoid pseudoreplication but, because independence of data across different sampling datasets cannot feasibly be totally ensured, the largest sample was considered for each nesting area, as detailed in Table 1.

Haplotype diversity (h), nucleotide diversity (π) and the genetic distance (γ_{st}) (Nei 1982) between each pair of populations were calculated using the program DNAsp (Rozas et al. 2003). Differentiation among population pairs within the Mediterranean was also assessed by the Chi-square test. A sequential Bonferroni correction was not applied for mtDNA nor for nDNA multiple pairwise comparisons, since they dramatically increase the probability for type II error (β : assume no differentiation when it does exist), an effect that becomes worse as many P -values are discarded (Perneger 1998; Cabin and Mitchell 2000; Moran 2003).

The number of migrants (N_m) between each population pair was calculated from genetic distances

Fig. 1 Map of analyzed locations. See Table 1 for details of each location

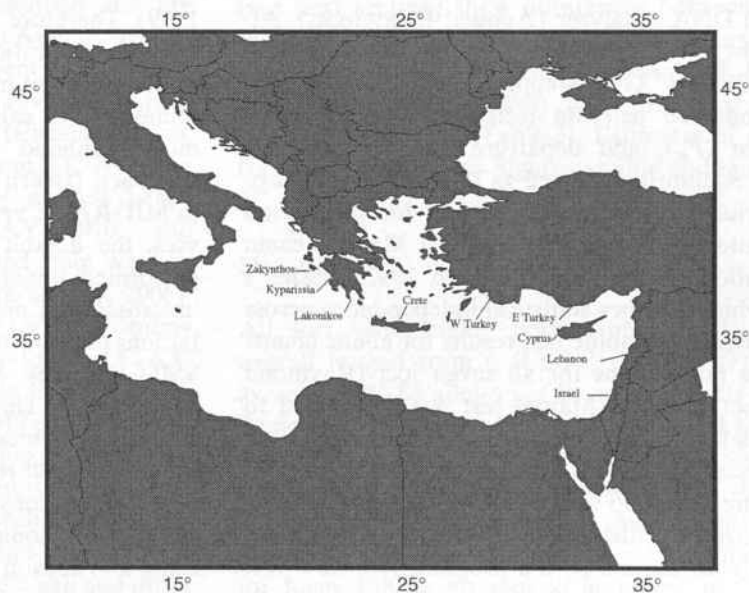


Table 1 Sampling sites, number of individuals (*n*), percentage of mtDNA haplotypes and source

Sampling site	Acronyms	<i>n</i>	% of mtDNA haplotypes					Source
			CC-A2	CC-A3	CC-A6	CC-A29	CC-A32	
Zakynthos	ZAK	20	85	–	10	–	5	Present study
Kyparissia	KYP	21	90	–	10	–	–	Encalada et al. (1998)
Lakonikos	LAK	19	95	–	5	–	–	Present study
Crete	CRE	19	100	–	–	–	–	Present study
W Turkey	WTU	16	94	6	–	–	–	Present study
E Turkey	ETU	32	59	41	–	–	–	Laurent et al. (1998)
Cyprus	CYP	35	100	–	–	–	–	Encalada et al. (1998)
Cyprus	CYP	10	100	–	–	–	–	Present study
Lebanon	LEB	9	100	–	–	–	–	Present study
Israel	ISR	20	84	–	–	16	–	Present study

through the equation $N_m = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{\Gamma_{\text{Gamma}_n} - 1} \right)$ (Takahata and Palumbi 1985).

Microsatellite analysis

Seven previously described microsatellite loci for sea turtles were used in this study: Cm84, Cc117, Cm72 and Ei8 (FitzSimmons et al. 1995); Cc141 and Cc7 (Bowen et al. 2005); and Ccar176 (Moore and Ball 2002). However, to improve amplification reaction and allele sizing the reverse primer of the locus Ccar176 was redesigned (Forward: 5'-GGCTGGGTGTCC-ATAAAGA-3' and new Reverse: 5'-CCCTAAG-TAAAGATTGGCTGCT-3') using the sequence of the original clone found in GenBank (accession number AF333763). One primer for each pair was fluorescently labeled with NED, PET, VIC or 6-FAM. Each locus was amplified using a cycle of 95°C for 2 min 30 s followed by 30 cycles at 95°C for 45 s, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension of 72°C for 5 min. Allele length was determined on an ABI 3730 automated DNA Analyzer (Applied Biosystems). Allele sizes were assigned using the Genemapper package (ABI PRISM® GeneMapper™ Software ver. 3.0.).

We conducted pairwise tests for population differentiation (F_{st}), and departure from the Hardy-Weinberg equilibrium as well as for detecting linkage disequilibrium between loci. *P*-values for population differentiation were calculated with a Markov chain randomization (Guo and Thompson 1992). Fisher's method, which assumes statistical independence across loci, was used to combine test results for allelic counts among the populations for all seven loci (Raymond and Rousset 1995). A Mantel test was performed to detect isolation by distance between Mediterranean nesting areas. All these statistical analyses were conducted using Genepop ver. 3.4 (Raymond and Rousset 1995). Geographic distances for the Mantel test were calculated with the aid of the program ArcView ver.

3.1®. Furthermore, the program Bottleneck ver. 1.2 (Cornuet and Luikart 1996) was used to detect recent bottlenecks in populations using the two-phased model (TPM) as recommended by the authors for microsatellites consists of mostly one-step mutations, but a small percentage (5%–10%) of multi-step changes. Furthermore, genetic distances found in the Mediterranean nesting populations (present study) were compared to those found in the Atlantic nesting populations in the northern hemisphere, hence excluding Brasil (Bowen et al. 2005), using a *T*-test, as data met the normality and homoscedasticity requirements.

The number of migrants between each population pair (N_m) was calculated from the F_{st} values using the formula $N_m = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{st}} - 1 \right)$ (Wright 1951). Estimates of gene flow based on F_{st} rely on the island model assumptions of equal population sizes and symmetric migration rates; however, these assumptions rarely hold in natural populations (Whitlock and McCauley 1999). Therefore we also estimated nuclear gene flow using the migration rate (*M*) that indicates how much more important migration is to bring new variants than mutation. We calculated this parameter using a maximum-likelihood method based on a coalescent approach (Beerli and Felsenstein 1999) implemented in MIGRATE ver. 1.7.6.1. (Beerli 2002). For all analyses, the default settings were used. Analyses were performed under the 'allele model' rather than the 'microsatellite model' because allele frequency distributions of these loci did not fit strict expectations of the SMM. Because convergence problems are common with Markov chain estimations, we performed each analysis five times, and the values presented herein are the mean of all replicate runs and the standard deviation across runs. Gene flow (N_m) obtained from mtDNA was compared with that obtained from nDNA using a Wilcoxon signed rank test.

Population structure was also assessed using the programme STRUCTURE ver. 2.1 (Pritchard et al. 2000), which implements a Bayesian clustering method to identify the most likely number of populations (K) without using prior information on sampling location. The program groups individuals in K populations so as to achieve Hardy–Weinberg and linkage equilibrium. The search strategy described in Evanno et al. (2005) was followed and 20 runs were carried out for each value of K (from 1 to 15). We set the length of the burn-in to 10,000 and MCMC (Markov Chain Monte Carlo) to 100,000 as preliminary tests showed that the results did not change substantially with longer values. We use the ad hoc statistic ΔK (Evanno et al. 2005) to detect the number of clusters in our sample but we also calculated $Pr(X/K)$ as described in the manual.

Finally, we considered adult population size to test if this parameter can explain possible differences in genetic variability between populations. This parameter was estimated using mean annual nesting values found by Margaritoulis et al. (2003) and Khalil et al. (in press) and applying a correction factor of 1.48. This correction factor was calculated assuming equal sex ratio, a mean of 3.49 clutches per season and a mean of 2.59 years of remigration interval (Miller 1997).

Results

Mitochondrial DNA

A total of five haplotypes were found among the nesting areas investigated (Table 1). Haplotypes CC-A2 and CC-A3 were previously described and are shared by both the Mediterranean and Atlantic nesting beaches (Encalada et al. 1998; Laurent et al. 1998). Haplotype CC-A6 was also reported previously only in the Mediterranean nesting beaches (Encalada et al. 1998). Finally, haplotypes CC-A29 and CC-A32 had not been previously found in any nesting beach (GenBank accession numbers AY742910 and AY742913) but were recently reported from western Mediterranean feeding grounds (Carreras et al. 2006).

The haplotype network constructed using parsimony (Fig. 2) exhibited an ambiguity, as haplotype CC-A32 differed by one substitution either from haplotype CC-A3 (from eastern and western Turkey) or from CC-A6 (from Greece). The geographic location of the haplotypes allowed us to clarify this ambiguity since haplotype CC-A32 is only present in Zakynthos, a location that has haplotype CC-A6 but not haplotype CC-A3. Furthermore, CC-32 and CC-A6 share a gap and differ

by a transition, while CC-32 and CC-A3 differ by the above-mentioned gap while sharing the transition. It is thus more probable that the transition has independently arisen twice.

Both the new and the previous data sets from Cyprus exhibited only haplotype CC-A2. As a consequence, since the earlier data set was much larger than our data set, we considered more convenient to use only the former in the analysis. They were not combined to fully avoid any risk of pseudoreplication. However, the two Turkish data sets were significantly different (Chi square, $P = 0.013$), although they shared the same haplotypes (CC-A2 and CC-A3). These sets came from nests collected from two different and distant areas within Turkey and, hence, they were considered independent and treated as different units in the analysis.

Although all populations shared haplotype CC-A2 (Table 1), pairwise genetic distances revealed highly significant differences between some of the nesting sites (overall $\gamma_{st} = 0.212$, $P < 0.001$, Table 2A for pairwise comparisons). The nesting sites at Zakynthos, Lakonikos and Kyparissia exhibited haplotypes CC-A2 and CC-A6 with highly similar percentages (Table 1) and differences found between them were not statistically significant (Table 2A). Consequently, these locations were all pooled as Greece (GRE) in subsequent analysis. Once the Greek populations were grouped, statistically significant differences were observed both with eastern Turkey and Israel (Table 2B). The nesting sites of Cyprus, Crete and Lebanon exhibited only haplotype CC-A2 (Table 1) and could be considered homogeneous, however these populations were not grouped as analysis with nuclear DNA (see next section) show differences between some of these populations. Genetic diversity was very different among nesting areas both in terms of haplotype diversity ($h = 0.000–0.498$) and nucleotide diversity ($\pi = 0.000–0.00131$) (Table 3). Estimates of gene flow for mtDNA were also highly variable and ranged from $N_m = 3.8–55.1$ (Table 4).

Microsatellites

All loci were highly polymorphic; allele numbers overall ranged from 6 (Cm72) to 15 (Cc7), with an average of 10.86 alleles per locus (Appendix Table 5). Some microsatellites (Cc141, Ccar176 and Ei8) failed to amplify in some specimens, probably due to the degraded state of several embryos. Thus, the sample size for these three markers in some populations was lower. Amplification problems were particularly severe for locus Ei8 as no sample amplified in Zakynthos

Fig. 2 Estimated parsimony network of mtDNA haplotypes. Each pie graph represents one haplotype and its frequency in each population. The size of each pie graph depends on its absolute frequency. Solid lines connect haplotypes by a single mutational change with a probability higher than 95%. Line (a) represents an ambiguity that could be resolved (see text for details)

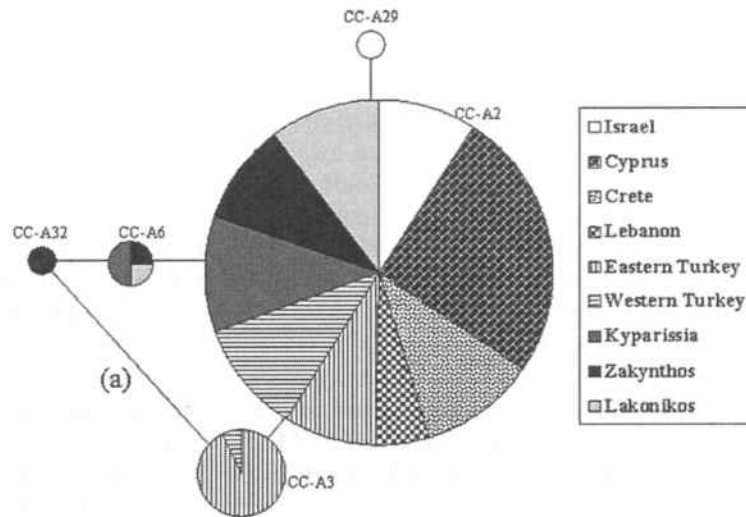


Table 2 Genetic structure of the Mediterranean nesting populations

	ZAK	KYP	LAK	CRE	WTU	ETU	CYP	LEB	ISR
<i>(A) Nesting populations before grouping</i>									
ZAK	-		0.004	-0.003	0.022*	-	0.015*	0.014	0.022*
KYP	0.034	-							
LAK	0.034	0.007	-	-0.002	0.004	-	-0.006	-0.002	0.015*
CRE	0.046	0.048	0.027	-	0.011*	-	0.004*	-0.004	0.007
WTU	0.022	0.041	0.030	0.035	-	-	0.005	0.008*	0.015**
ETU	0.096**	0.188**	0.188**	0.203**	0.127*	-	-	-	-
CYP	0.094*	0.067*	0.037	0.000	0.047	0.286***	-	0.004	0.013*
LEB	0.030	0.031	0.018	0.000	0.023	0.131*	0.000	-	0.010
ISR	0.061	0.073	0.070	0.086	0.067	0.181**	0.116**	0.057	-
<i>(B) Nesting populations after grouping ZAK, KYP and LAK as GRE</i>									
	mtDNA GRE	nDNA GRE							
CRE	0.021	-0.005							
WTU	0.009	0.008*							
ETU	0.165***	-							
CYP	0.037	0.001**							
LEB	0.012	0.004*							
ISR	0.043**	0.016***							

Cells above the diagonal show genetic distances based on nDNA (F_{st} values), and those below the diagonal show genetic distances based on mtDNA (γ_{st} values). (-) no data is available. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Table 3 Genetic variability in the Mediterranean loggerhead turtle nesting beaches

	mtDNA		nDNA			Nests per season ^a	N
	<i>h</i>	π	H_e	H_o	<i>k</i>		
GRE	0.19	6.6×10^{-4}	0.63	0.56	7.00	2,073 (1,250–3,184)	3,068 (1,850–4,712)
CRE	0	0	0.66	0.62	6.43	387 (315–516)	572 (466–764)
WTU	0.13	3.3×10^{-4}	0.65	0.68	5.71	124 (88–158)	183 (130–234)
ETU	0.50	1.31×10^{-3}	-	-	-	$\cong 100$	$\cong 148$
CYP	0	0	0.72	0.71	5.86	572 (404–775)	846 (598–1,147)
LEB	0	0	0.72	0.63	6.43	35 (33–37)	52 (49–55)
ISR	0.28	7.4×10^{-4}	0.70	0.67	7.00	33 (10–52)	49 (15–78)

Haplotype diversity (*h*), nucleotide diversity (π), gene diversity (H_e), observed heterozygosity (H_o) and mean allele number per locus (*k*). (N) Population size calculated from records of nests per season, as explained in the text. In brackets are shown the maximum and minimum registered values. Acronyms are defined in Table 1. (-) no data available

^aData from Margaritoulis et al. (2003) and Khalil et al. (in press)

Table 4 Estimates of gene flow between Mediterranean populations based either on mtDNA or nDNA and using different methods

	mtDNA		nDNA			
	γ_{st}	N_m	F_{st}	MIGRATE		
			N_m	M_{1-2}	M_{2-1}	M
GRE-CRE	23.3	–	–	18.7 (4.9)	7.7 (2.5)	26.4
GRE-WTU	55.1	–	31.0	15.9 (4.2)	8.8 (1.9)	24.8
GRE-CYP	12.7	–	249.7	14.3 (8.2)	4.4 (1.6)	18.7
GRE-LEB	41.2	–	62.2	2.4 (0.5)	2.2 (8.8)	4.6
GRE-ISR	11.1	–	15.4	22.2 (7.1)	12.8 (3.7)	35.0
CRE-WTU	13.8	–	22.5	21.1 (7.0)	15.6 (6.6)	36.7
CRE-CYP	–	–	62.2	9.8 (5.4)	6.5 (3.5)	16.2
CRE-LEB	–	–	–	1.5 (0.6)	7.5 (2.1)	9.1
CRE-ISR	5.3	–	35.5	10.2 (3.2)	11.4 (5.4)	21.6
WTU-CYP	10.1	–	10.1	10.6 (7.1)	8.8 (2.4)	19.4
WTU-LEB	21.2	–	31.0	3.8 (1.4)	9.0 (4.0)	12.8
WTU-ISR	7.0	–	16.4	10.2 (2.6)	6.1 (3.2)	16.3
CYP-LEB	–	–	–	1.5 (1.0)	5.5 (5.0)	7.0
CYP-ISR	3.8	–	19.0	6.5 (4.6)	8.4 (8.9)	14.9
ISR-LEB	8.3	–	24.7	2.0 (0.8)	9.8 (4.7)	11.8

(–) N_m was not calculated due to negative or null genetic distances. Results from MIGRATE are given as the migration rate from the first population to the second (M_{1-2}), from the second population to the first (M_{2-1}) and total migration rate (M). Standard Deviation across the five runs is given in brackets

(data not shown) and, for this reason, all the statistical tests were performed twice, with and without this locus. No differences were found in all the pair-wise comparisons involving Zakynthos with these two analyses. Hence, this locus was maintained as is informative for comparisons not involving Zakynthos.

No departure from Hardy–Weinberg equilibrium was detected for any population (Chi square, $P > 0.05$ in all cases). Furthermore, no linkage disequilibrium was found between loci pairs (Chi square, $P > 0.05$ in all cases) and hence, independence of loci was assumed. Observed heterozygosity was highly variable, ranging from $H_o = 0.03$ (cm72 in Greece) to $H_o = 0.94$ (cc7 in Israel) (Appendix Table 5). Gene diversity was also highly variable ranging from $H_e = 0.03$ (cm72 in Greece) to $H_e = 0.87$ (cc7 in Israel). However, mean values of H_e , H_o as well as mean number of alleles (k) were not different among populations (Friedman ANOVA, $P > 0.05$) despite the great differences in the reported size of the female populations (Table 3). Moreover, no recent bottleneck events were detected for any population under the TPM model (Wilcoxon test $P > 0.05$ in all cases).

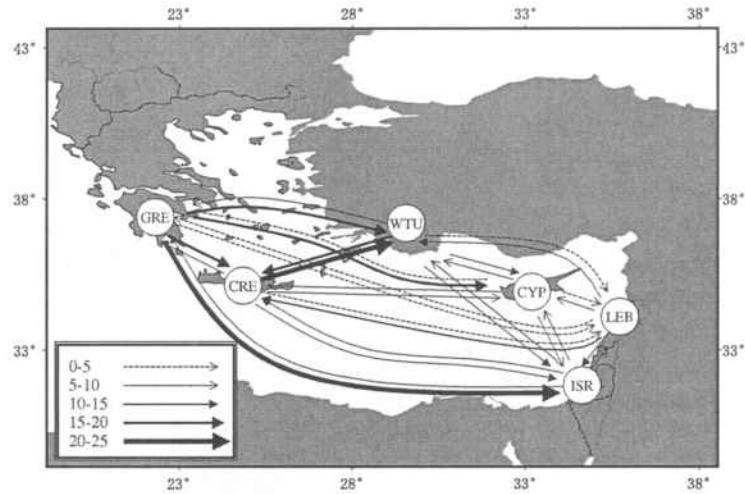
Significant genetic structure was observed among all populations (overall $F_{st} = 0.005$, $P < 0.001$); but genetic differentiation between population pairs was only statistically significant for 9 out of 21 pair-wise comparisons (Table 2A). Cyprus and Crete exhibited significant differences based on microsatellites despite having the same mtDNA haplotype at 100% frequency (Table 2). The Greek populations were grouped since they were not genetically differentiated either with microsatellites or mtDNA. In addition the grouping

did not depart from the Hardy–Weinberg equilibrium (Chi square, $P > 0.05$). Israel, Turkey, Greece and Cyprus were different from each other with the exception of Cyprus from Turkey. Lebanon was distinct from Greece and Turkey. Crete was different from Turkey and Cyprus but not from the rest (Table 2). Isolation by distance is an unlikely explanation for the genetic differences here observed, as no correlation exists between geographic location and genetic distance (Mantel test, $P = 0.080$). Genetic pairwise distances were significantly higher in the Mediterranean (present study) than those reported by Bowen et al. (2005) for the Atlantic (T -Student, $P < 0.001$).

Gene flow (N_m) between populations was highly variable (Table 4). Gene flow estimated from nDNA data was always significantly higher than that calculated from mtDNA (Wilcoxon signed rank test, $P < 0.001$). Gene flow calculated using the coalescent approach as implemented in MIGRATE (Table 4, Fig. 3) do not correlate with F_{st} estimates of gene flow (Mantel test, $P = 0.66$) as found in previous studies with marine turtles (Bowen et al. 2005). Hence, some population pairs that showed deep genetic differentiation using F_{st} methods, showed high levels of migration using the coalescent approach of MIGRATE (e.g. Greece and Israel).

Without using prior information on sampling location, the most probable number of populations estimated using STRUCTURE is 4 ($\text{Pr}(X/K) = 0.95$ for $K = 4$). However, the ΔK ad hoc statistic (Evanno et al. 2005) suggested that the most probable number of populations is 2 with a secondary peak on $K = 5$. This

Fig. 3 Migration rate (M) between each pair of populations calculated using coalescent methods as implemented in MIGRATE. Each arrow width is proportional to MIGRATE values as detailed in Table 4



is the result expected for a Contact Zone model where populations (4 or 5) are partially connected (Evanno et al. 2005). When prior information of populations assuming the four units described by the F_{st} was used, all individuals of Greece, Cyprus, Israel and Turkey were reassigned to its origin population while samples of Crete and the Lebanon were not assigned to any of the former populations.

Discussion

Previous results on the genetic structure of two species of sea turtles have revealed a similar scenario: female philopatry generating a deep structuring for mitochondrial markers and male-mediated gene flow that assures wide dispersal of nuclear genes between populations (Bowen et al. 2005; FitzSimmons et al. 1997b). In other words, the loss a nesting beach would mean a loss of mitochondrial diversity and a loss of habitat, but nuclear diversity will be eroded only if a large number of nesting sites are lost (Bowen et al. 2005). The present study aimed to fill that void in knowledge about the loggerhead sea turtle in the Mediterranean and to improve its conservation there.

Population structure

The observed low variability of the mtDNA control region compared with that of the Atlantic populations (Bowen et al. 2005 and references therein) is probably due to the recent origin of the Mediterranean populations, which were founded by a few Atlantic migrants about 12,000 years ago (Bowen et al. 1993). Those colonizers are thought to carry with them only one or

two of the several haplotypes found in the Atlantic populations. The haplotype CC-A2 was certainly one of them and was likely present from the beginning in all Mediterranean nesting beaches. The new haplotypes CC-A6 and CC-A29 evolved from it, but remained restricted to small regions within the eastern Mediterranean due to the philopatry of the females. The origin of haplotype CC-A3 is uncertain, as it may come from the Atlantic or may have evolved independently in the Mediterranean from haplotype CC-A2. Although there is no way to assess in the present study which is the right scenario, the transitional substitution that differentiates CC-A3 from CC-A2 took place at least twice: in the Atlantic it created haplotype CC-A3 from haplotype CC-A2 and in Greece it created haplotype CC-A32 from haplotype CC-A6, hence becoming the first example of homoplasy reported for the mtDNA control region in marine turtles. Thus, independent evolution of haplotype CC-A3 in the Atlantic and Turkey is a plausible hypothesis that might be addressed in the future using longer sequences. Whatever the origin of haplotype CC-A3, restricted gene flow, caused by the philopatry of females, limited the geographic expansion of haplotypes CC-A3, CC-A6, CC-A32 and CC-A29 within the Mediterranean.

Genetic differentiation based on mtDNA revealed the existence of at least four independent units within the eastern Mediterranean, most of them characterized by one exclusive haplotype: (1) the nesting beaches located on mainland Greece and the adjoining Ionian islands, characterized by haplotype CC-A6; (2) eastern Turkey, characterized by haplotype CC-A3; (3) Israel, characterized by haplotype CC-A29 and (4) Cyprus, comprising only the widespread CC-A2. The only

non-significant pairwise comparison between these units is that involving Cyprus and Greece although the P -value was very close to significance ($P = 0.06$) and non-grouped results showed differences between Cyprus and both Zakynthos and Kyparissia, the more distant Greek sampling areas. Probably, that difference will become statistically significant with a higher sample size and hence we consider this result as marginally significant. The existence of a single evolving unit including mainland Greece and the Ionian islands is also supported by tagging experiments demonstrating exchange of females between Greek nesting beaches (Margaritoulis 1998). Conversely, no evidence exists for female exchange between nesting beaches of the four above-reported units.

The data from the nDNA also support the status of the Greek, Israeli and Cyprian populations as independent units and indicates that the population from western Turkey is also a different unit, although closely related to that from Cyprus. Schroth et al. (1996) suggested, on the basis of nDNA (RAPDs) and mtDNA (control region) data, that Turkish rookeries differ from other Mediterranean rookeries and that an east-west cline exists along the Turkish coastline. Our results support such a hypothesis because differences for mtDNA have been found between eastern and western rookeries. Furthermore, western Turkey differs also for nDNA from most of the remaining Mediterranean nesting areas. However, as samples from eastern Turkey were not available for the present work, we cannot determine whether a cline exists also for microsatellite markers. Sampling in eastern Turkey would be advisable to clarify the status and the relationships of the loggerhead populations in the northeast shore of the Mediterranean. The genetic status of Crete among the rookeries is puzzling. The fact that Crete differs only from eastern Turkey with mtDNA but differs from Cyprus and western Turkey with nDNA may indicate that Crete is a stepping stone linking the nesting populations in the latitudinal extremes of the eastern Mediterranean, i.e. Greece and Israel. Small sample size impedes resolving the relations of the Lebanese population, but it probably forms a unit with the nearby Israeli coast, as (1) no difference exists either for mtDNA or nDNA, (2) both differ from the remaining populations and (3) the El-Mansouri beach, in Lebanon, is close to the Israeli border. The absence of the haplotype CC-A29 from the Lebanese population is likely an artifact due to small sample size.

The small size of some populations (Margaritoulis et al. 2003; Khalil et al. in press) is the main problem when sampling nesting sites of the loggerhead sea turtles in the Mediterranean, as it is not feasible to

obtain the desired number of samples without jeopardizing sample independence. A further difficulty is poor sample quality, because tissues from nesting beaches are typically collected from dead embryos once live hatchlings had emerged. This sampling procedure is less invasive, but specimens are sometimes partially degraded and the genomic extraction or the DNA amplification for some loci is occasionally unsuccessful. In this study, problems in amplification were severe at Zakynthos for locus Ei8, as emergence events on this island are more scattered through time and, in order to maximize nest success, we excavated nests later than in other areas. For the green turtles (*Chelonia mydas*) in the Atlantic and the Pacific, Roberts et al. (2004) suggested that low sample size would lead to a lack of statistical power in detecting differentiation. Hence, we can be sure that the significant differences observed with low sample size are real, but the existence of non-significant values should not be considered to prove a lack of isolation because those results might be an artifact due to low sample size. For all these reasons, results for populations with low sample size (as Lebanon for both markers, or Cyprus for nDNA) should be taken with caution.

Regardless of those shortcomings and unresolved questions, the F_{st} values are an order of magnitude higher than those found between the North Atlantic nesting areas, indicating that the level of nDNA differentiation in the eastern Mediterranean is much higher than that previously reported for the North Atlantic nesting areas (Bowen et al. 2005).

Implications for conservation

The population structuring in the eastern Mediterranean has strong implications for the management of loggerhead sea turtles in the region. At a first glance, mtDNA data (Bowen 2003 and the present study) as well as the information on the number of nesting females (Margaritoulis et al. 2003) might indicate the existence of two groups of populations that might be subject to genetic depression: (1) the extremely small populations from Lebanon and Israel (Margaritoulis et al. 2003; Khalil et al. in press) and (2) the populations from Crete and Cyprus, where only the ancestral CC-A2 haplotype has been found (Laurent et al. 1998; Kaska 2000; present study). Populations with similar low levels of mtDNA diversity have also been observed in the Atlantic population of North Carolina, where only haplotype CC-A1 was detected (Encalada et al. 1998). Bowen (2003) hypothesized that this was due the recent northward expansion of the nesting effort along the North-American coastline, which was in turn

caused by the increase in temperature that occurred throughout the Holocene. However, a different hypothesis is needed for justifying the low diversity of the populations from Cyprus and Crete, as the latitude of the nesting beaches in both islands is lower than that of the more genetically diverse nesting beaches in Greece and Turkey. Interestingly, the coastlines of both Cyprus and Crete are rough and steep and the continental shelf around them is extremely narrow and is not connected to the shelf of the mainland (Hofrichter et al. 2004). As a consequence, the availability of suitable nesting beaches in these islands may have been dramatically affected by the sea level fluctuations that occurred throughout the Holocene (Tichy et al. 2004) and that likely caused a number of local extinctions which may have potentially lead to the low mtDNA genetic diversity observed. However, that pattern cannot be generalized to those islands surrounded by a wide continental shelf linking them to the mainland, like Zakynthos, in Greece. That island has one of the highest mtDNA genetic diversities recorded in the Mediterranean, probably because the fluctuations of the sea level are less likely to affect the availability of the nesting sites there due to the width of the continental shelf and the connection with the mainland.

Remarkably, all the above reported populations exhibit a high nuclear variability, either in terms of observed heterozygosity, gene diversity and allele number, which is statistically similar to that observed in the larger or more mtDNA diverse populations from Greece and Turkey. Moreover, nDNA did not reveal any recent bottleneck, either for the populations of Israel and Lebanon or for those of Cyprus and Crete. That result is striking considering that the populations in the Levantine shore of the Mediterranean, Israel and Lebanon, suffered a recent and huge reduction of their size due to intense harvest from World War I to mid 30s (Sella 1982). This paradox may have two non-exclusive explanations. The first one invokes that population decline in Israel and Lebanon is too recent to allow us to detect changes in genetic diversity, as only a few generations have passed for the long living turtles. This is an unlikely explanation, as allele numbers are expected to decline faster than heterozygosity after a bottleneck (Nei et al. 1975), but no differences in allele numbers or as heterozygosity was found between the populations that were harvested (Israel and Lebanon) and those that were not (Greece, Turkey or Crete). The alternative hypothesis is a male-mediated gene exchange with Crete (both Israel and Lebanon) and Cyprus (Lebanon only). Such a hypothesis is supported by the moderate migration rate revealed by MIGRATE and the indication by

STRUCTURE that the eastern Mediterranean is a Contact Zone formed by several populations partially connected. In this scenario, Crete would play a central role, as it ensures gene flow between the large Ionian populations (Greece) and the tiny Levantine ones (Israel and Lebanon). Conversely, the population from Cyprus would link the Lebanese and the Turkish populations. Such a gene flow may be sex biased as nDNA gene flow is significantly higher than mtDNA gene flow. This is not unprecedented, as in every case published to date genetic structuring of sea turtles is deeper with mtDNA than with nDNA (FitzSimmons et al. 1996; Schroth et al. 1996; Bowen et al. 2005). This pattern can be partially explained by the haploid inheritance of mtDNA, imparting a four-fold lower effective population size relative to diploid nuclear loci (Birky et al. 1983). However, other factors must be invoked when values of population differentiation differ by an order of magnitude or more (Roberts et al. 2004; Bowen et al. 2005) as in this case. All these evidences indicate the existence of male-mediated gene flow between different mtDNA-defined populations on that the philopatry of males is less stringent than that of females. Similar scenarios have been reported for the same species in the western Atlantic Ocean (Bowen et al. 2005) and for the green sea turtle (*Chelonia mydas*) in Australia (FitzSimmons et al. 1996, 1997a, b).

Pulliam (1988) and Pulliam and Danielson (1991) first proposed the idea that populations with a positive growth rate (known as sources) may supply with recruits adjoining populations with a negative growth rate (sinks), thus generating a gene flow from the former to the latter. Shanker et al. (2004), on the basis of mtDNA, suggested a population structure for the olive ridley marine turtle (*Lepidochelys olivacea*) including source populations in the Indian Ocean and sink populations in the Pacific and Atlantic Oceans. These results here reported for the loggerhead sea turtles in the Mediterranean suggest that Greece acts as a source of nuclear genes for other populations through Crete, perhaps because of the size of the Greek population and stability of the beaches in evolutionary time. However, female exchange between nesting units seems unlikely on the basis of the available mtDNA data, hence indicating that nuclear genes, but not individuals, move from Greece to the remaining populations.

These conclusions highlight the relevance of detailed genetic analysis to ensure proper management of threatened species, as biases may have negative consequences. The application of genetic data to biodiversity conservation is often coarse, and populations without private alleles or haplotypes are thought to

deserve lower attention (Ruckelshaus et al. 2003). Indeed, if only mtDNA data were available, conservation efforts would focus on the nesting beaches that support populations with exclusive haplotypes, i.e. Greece, Turkey and Israel. On the other hand, if only nDNA data were available, the conservation of the rookeries in Greece, Israel, Turkey and, perhaps, Cyprus, would be considered enough to preserve the genetic variability of the loggerhead sea turtle in the Mediterranean as a whole. None of these alternatives would focus on the conservation of the nesting sites in Crete because they contain only a widespread mtDNA haplotype and share almost all nDNA alleles with other sites (Appendix Table 5). This would be a mistake, because this island, as well as Cyprus, might link the Levantine and Ionian populations by means of male-mediated gene flow, a conclusion that emerges only when multiple genetic approaches are combined.

For all those reasons, the genetic variability of the loggerhead sea turtle in the eastern Mediterranean will be preserved only if (1) all the mitochondrial variability is preserved, (2) all the nuclear variability is preserved and (3) the stepping stones connecting populations are preserved. We can thus conclude that (1) Greece, Turkey, and Israel should be preserved as they are different units in terms of mtDNA, (2) the same populations as well as Cyprus are not expendable because they are units in terms of nDNA, and (3) Crete and Cyprus should also be a priority because

they link at least two of the former units. The relevance of the Lebanese population is a non-resolved issue due to small sample size but probably it forms a panmictic unit with Israel. Clearly, further research is needed to clarify the status of that population.

As a final remark we can extract that different markers should be used in order to get a deep knowledge of population structure and hence assess which ones form different units. Furthermore, not only genetically different populations deserve protection but also those allowing gene flow between them. In this way, negative effects of population reduction due to stochastic phenomena will be minimized and the genetic variability of the species will be preserved.

Acknowledgements The *Fundació pel Desenvolupament Sostenible* provided logistic support for the fieldwork. This study was funded by the EU project “*Protección de Praderas de Posidonia en LICs de Baleares*” LIFE00NAT/E/7303, the project BOS2003-05904 of the Spanish Government (CICYT) and the Regional Activity Center for Specially Protected Areas (RAC/SPA) of the Mediterranean Action Plan (United Nations Environment Programme) in Tunis. Samples from Lebanon were collected under the aegis of MEDASSET 2004 sea turtle conservation project. We thank S. Roques for her comments to the manuscript and Daniel Cebrián (RAC/SPA) for his involvement in the project. AFR and DM thank Sonja Baker, Christina Davy and Sandra Muller for sample collection in Greece. We also thank two anonymous referees for their helpful comments.

Appendix

Table 5 Relative frequencies of alleles, number of chromosomes (*N*), number of alleles (*k*), gene diversity (*H_e*) and observed heterozygosity (*H_o*) in each population and for each locus

	Allele	GRE	CRE	WTU	CYP	ISR	LEB	Mean
cc141								
<i>N</i>		56	30	28	18	24	16	
<i>k</i>		7	6	6	6	9	9	7.167
	179	0	0	0	0	0	0.063	
	187	0.054	0.1	0.143	0	0.042	0	
	195	0	0	0	0	0.042	0.063	
	197	0.375	0.333	0.429	0.333	0.208	0.438	
	199	0.089	0.1	0.179	0.167	0.292	0.063	
	201	0.179	0.267	0.036	0.111	0.125	0.125	
	203	0.196	0.167	0.179	0.222	0.125	0.063	
	205	0.089	0.033	0	0.056	0.083	0.063	
	207	0.018	0	0	0	0.042	0	
	211	0	0	0	0	0	0.063	
	213	0	0	0.036	0.111	0.042	0.063	
<i>H_o</i>		0.643	0.6	0.857	0.778	0.917	0.625	0.737
<i>H_e</i>		0.784	0.795	0.757	0.83	0.862	0.817	0.807
cm72								
<i>N</i>		74	36	30	20	38	16	
<i>k</i>		2	2	2	3	3	3	2.5

Table 5 continued

	Allele	GRE	CRE	WTU	CYP	ISR	LEB	Mean
	223	0.986	0.972	0.9	0.8	0.947	0.813	
	233	0	0	0.1	0	0	0	
	241	0	0.028	0	0.15	0.026	0.125	
	243	0.014	0	0	0	0	0	
	245	0	0	0	0.05	0	0	
	247	0	0	0	0	0.026	0.063	
H_o		0.027	0.056	0.2	0.4	0.105	0.375	0.194
H_e		0.027	0.056	0.186	0.353	0.104	0.342	0.178
cm84								
N		68	36	28	20	34	18	
k		6	6	5	5	7	8	6.167
	311	0	0	0	0	0	0.056	
	313	0.529	0.500	0.357	0.5	0.294	0.222	
	315	0.191	0.250	0.429	0.25	0.235	0.333	
	317	0.029	0	0.036	0	0.088	0.056	
	319	0.015	0	0	0	0	0.056	
	321	0.118	0.194	0.071	0.1	0.147	0.056	
	323	0.118	0.056	0.107	0.1	0.176	0.167	
	325	0	0.028	0	0.05	0.029	0.056	
	327	0	0	0	0	0.029	0	
H_o		0.618	0.556	0.857	0.7	0.765	0.667	0.694
H_e		0.664	0.727	0.696	0.7	0.82	0.843	0.742
cc7								
N		78	36	32	20	32	18	
k		12	8	7	9	11	8	9.167
	167	0.103	0.278	0	0.1	0.063	0.056	
	171	0.103	0.111	0.188	0.1	0.281	0.056	
	173	0.231	0.139	0.25	0.35	0.125	0.222	
	175	0	0	0.031	0	0	0	
	177	0.026	0	0.063	0	0.031	0	
	179	0.013	0	0	0	0	0	
	183	0.192	0.056	0.25	0.1	0.063	0.056	
	185	0.026	0	0	0.1	0	0	
	187	0.064	0.083	0	0.05	0.188	0.056	
	189	0	0.028	0	0	0.031	0.111	
	191	0.013	0	0	0.05	0.031	0	
	193	0.013	0.028	0.031	0	0.125	0.056	
	197	0.205	0.278	0.188	0.1	0.031	0.389	
	199	0	0	0	0.05	0.031	0	
	201	0.013	0	0	0	0	0	
H_o		0.821	0.722	0.75	0.9	0.938	0.778	0.818
H_e		0.851	0.825	0.825	0.863	0.869	0.817	0.842
ccar176								
N		56	32	28	20	32	18	
k		8	8	4	7	6	6	6.5
	168	0	0	0	0.05	0	0	
	170	0	0	0	0.05	0.031	0	
	172	0	0	0	0	0.031	0	
	176	0.143	0.188	0.179	0	0.25	0.111	
	178	0	0.063	0	0.05	0.063	0.056	
	184	0.036	0.031	0.179	0.3	0	0	
	186	0.625	0.563	0.607	0.45	0.531	0.667	
	190	0.018	0.031	0	0	0	0	
	192	0.018	0	0	0	0	0.056	
	196	0.054	0.031	0.036	0.05	0.094	0.056	
	198	0.089	0	0	0	0	0.056	
	200	0	0	0	0.05	0	0	
	206	0	0.031	0	0	0	0	
	212	0.018	0.063	0	0	0	0	
H_o		0.5	0.813	0.643	0.7	0.688	0.556	0.65

Table 5 continued

	Allele	GRE	CRE	WTU	CYP	ISR	LEB	Mean
H_e		0.586	0.657	0.587	0.732	0.661	0.562	0.631
cc117								
N		76	36	26	20	38	18	
k		7	8	8	5	8	5	6.833
	231	0.039	0.111	0.077	0	0	0	
	234	0	0	0	0	0.026	0	
	235	0.487	0.444	0.5	0.5	0.395	0.333	
	237	0.053	0.083	0.077	0.05	0.105	0.056	
	239	0.092	0.028	0.038	0.05	0.026	0.111	
	241	0.171	0.111	0.077	0.15	0.211	0.278	
	243	0	0.028	0.038	0	0	0	
	246	0	0	0.038	0	0.026	0	
	247	0.145	0.139	0.154	0.25	0.184	0.222	
	253	0.013	0.056	0	0	0.026	0	
H_o		0.605	0.778	0.615	0.6	0.789	0.667	0.676
H_e		0.709	0.768	0.732	0.695	0.772	0.791	0.745
Ei8								
N		30	30	28	14	24	16	
k		7	7	8	6	5	6	6.5
	178	0	0.067	0.107	0.071	0.167	0.063	
	180	0.2	0.233	0.107	0.286	0.125	0.313	
	184	0.133	0.067	0.071	0	0	0	
	186	0.033	0.1	0.071	0.143	0	0.125	
	188	0.267	0.267	0.393	0.143	0.292	0.188	
	190	0.067	0	0.036	0	0	0.125	
	192	0.3	0.267	0.107	0.286	0.333	0.188	
	194	0	0	0.107	0.071	0.083	0	
H_o		0.733	0.8	0.857	0.857	0.5	0.75	0.75
H_e		0.818	0.825	0.817	0.846	0.786	0.85	0.824

References

- Baldwin R, Hughes GR, Prionce RIT (2003) Loggerhead turtles in the Indian Ocean. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) Loggerhead sea turtles. Smithsonian Books, Washington D.C., pp 218–232
- Beerli P (2002) MIGRATE version 1.7.6.1 – Documentation and Program. Available at <http://evolution.genetics.washington.edu/lamark.html>
- Beerli P, Felsenstein J (1999) Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152:763–773
- Birky CWJ, Maruyama T, Fuerst P (1983) An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* 103:513–527
- Bolten AB, Bjorndal KA, Martins HR, Dellinger T, Biscoito MJ, Encalada SE, Bowen BW (1998) Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecol Appl* 8:1–7
- Bowen BW (2003) What is a loggerhead turtle? The genetic perspective. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) Loggerhead sea turtles. Smithsonian Books, Washington D.C., pp 7–27
- Bowen BW, Meylan AB, Ross JP, Limpus CJ, Balazs GH, Avise JC (1992) Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution* 46:865–881
- Bowen BW, Avise JC, Richardson JI, Meylan AB, Margaritoulis D, Hopkins-Murphy SR (1993) Population structure of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the Northwestern Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Conserv Biol* 7:834–844
- Bowen BW, Clark AM, Abreu-Grobois FA, Chaves A, Reichart HA, Ferl RJ (1998) Global phylogeography of the ridley sea turtles (*Lepidochelys* spp.) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 101:179–189
- Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen RJ (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Mol Ecol* 14:2389–2402
- Broderick AC, Glen F, Godley BJ, Hays GC (2002) Estimating the number of green and loggerhead turtles nesting annually in the Mediterranean. *Oryx* 36:227–235
- Cabin RJ, Mitchell RJ (2000) To Bonferroni or not to Bonferroni: when and how are the questions. *Bull Ecol Soc Am* 81:246–248
- Carreras C, Pont S, Maffucci F, Pascual M, Barceló A, Bentivegna F, Cardona L, Alegre F, SanFélix M, Fernández G, Aguilar A (2006) Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns. *Mar Biol* 149:1269–1279
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9:1657–1660
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014

- Cuadras CM (1983) Problemas de probabilidad y estadística. PPU, Barcelona
- Delaugerre M, Cesarini C (2004) Confirmed nesting of the loggerhead turtle in Corsica. *Mar Turtl Newslett* 104:12
- Ehrhart LM, Bagley DA, Redfoot WE (2003) Loggerhead turtles in the Atlantic Ocean. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Books, Washington D.C., pp 157–174
- Encalada SE, Lahanas PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Miyamoto MM, Bowen BW (1996) Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Mol Ecol* 5:473–483
- Encalada SE, Bjorndal KA, Bolten AB, Zurita JC, Schroeder B, Possardt E, Sears CJ, Bowen BW (1998) Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Mar Biol* 130:567–575
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- FitzSimmons NN, Moritz C, Moore SS (1995) Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol Biol Evol* 12:432–440
- FitzSimmons NN, Moritz C, Limpus CJ et al (1996) Comparative genetic structure of green, loggerhead, and flatback populations in Australia based on variable mtDNA and nDNA regions. In: Bowen BW, Witzell WN (eds) *Proceedings of the international symposium on sea turtle conservation genetics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. National Technical Information Service, Springfield, Virginia, pp 25–32
- FitzSimmons NN, Limpus CJ, Norman JA, Goldizen AR, Miller JD, Moritz C (1997a) Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8912–8917
- FitzSimmons NN, Moritz C, Limpus CJ, Pope L, Prince R (1997b) Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics* 147:1843–1854
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. University Press, Cambridge
- Groombridge B (1990) Marine turtles in the Mediterranean: distribution, population status, conservation. *Nat Environ Ser (Council of Europe)* 48:1–98
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hofrichter R, Kern W, Beckel L, Domnig I, Zankl A, Hein A (2004) Geografía y clima. In: Hofrichter R (ed) *El Mar Mediterráneo. Parte general*. Ediciones Omega, Barcelona, pp 102–195
- IUCN (2006) 2004 IUCN red list of threatened species
- Karl SA, Bowen BW, Avise JC (1992) Global population genetic structure and male mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci. *Genetics* 131:163–173
- Kaska Y (2000) Genetic structure of Mediterranean sea turtle populations. *Turk J Zool* 24:191–197
- Khalil M, Syed H, Aureggi M, Venizelos L (in press) Marine turtle nesting at El Monsouri, South Lebanon. In: *Proceedings of the second Mediterranean conference on marine turtles*. Antalya, Turkey 4–7 May 2005
- Laurent L, Lescure J, Excoffier L et al (1993) Genetic studies of relationships between Mediterranean and Atlantic populations of loggerhead turtle *Caretta caretta* with a mitochondrial marker. *C R Acad Sci Vie III Sci Vie* 316:1233–1239
- Laurent L, Casale P, Bradai MN et al. (1998) Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Mol Ecol* 7:1529–1542
- Llorente GA, Carretero MA, Pascual X, Perez A (1992) New record of a nesting loggerhead turtle *Caretta caretta* in western Mediterranean. *Br Herp Soc Bull* 42:14–17
- Margaritoulis D (1998) Interchange of nesting loggerheads among Greek beaches. In: Epperly SP, Braun J (eds) *Proceedings of the seventeenth annual sea turtle symposium*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-415. National Marine Fisheries Service, Southeast Fisheries Science Center, Orlando, FL, pp 225–227
- Margaritoulis D, Argano R, Baran I et al (2003) Loggerhead turtles in the Mediterranean Sea: present knowledge and conservation perspectives. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Books, Washington D.C., pp 175–198
- Meylan AB, Bowen BW, Avise JC (1990) A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Science* 248:724–727
- Miller JD (1997) Reproduction in sea turtles. In: Lutz PL, Musick JA (eds) *The biology of sea turtles*. CRC Press, Boca Raton, pp 51–81
- Moore MK, Ball RM (2002) Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Mol Ecol* 11:281–288
- Moran MD (2003) Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies. *Oikos* 100(2):403–405
- Nei M (1982) Evolution of human races at the gene level. In: Bone-Tamir B, Cohen T, Goodman RM (eds) *Human genetics part A: the unfolding genome*. Alan R Liss, New York, pp 167–181
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1–10
- Norman JA, Moritz C, Limpus CJ (1994) Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Mol Ecol* 3:363
- Perneger TV (1998) What's wrong with Bonferroni adjustments. *Br Med J* 316:1236–1238
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- Pulliam HR (1988) Sources, sinks and population regulation. *Am Nat* 132:652–661
- Pulliam HR, Danielson BJ (1991) Sources, sinks and habitat selection: a landscape perspective on population dynamics. *Am Nat* 137:S50–S66
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248–249
- Roberts MA, Schwartz TS, Karl S (2004) Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green sea turtle (*Chelonia mydas*): Analysis of microsatellite loci. *Genetics* 166:1857–1870
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496–2497

- Ruckelshaus M, McElhany P, Ford MJ (2003) Recovering species of conservation concern – are populations expendable? In: Kareiva P, Levin SA (eds) The importance of species. Perspectives on expendability and triage. Princeton University Press, Princeton Oxford, pp 305–329
- Schroth W, Streit B, Schierwater B (1996) Evolutionary hand-icap for turtles. *Nature* 384:521–522
- Sella I (1982) Sea turtles in the eastern Mediterranean and northern Red Sea. In: Bjorndal KA (ed) Biology and conservation of sea turtles. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 417–423
- Shanker K, Ramadevi J, Choudhury BC, Singh L, Aggarwal RK (2004) Phylogeography of the olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) on the east coast of India: implications for conservation theory. *Mol Ecol* 13:1899–1909
- Takahata N, Palumbi SR (1985) Extranuclear differentiation and gene flow in the finite island model. *Genetics* 109:441–457
- 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* 132:619–633
- Tichy G, Tomek C, Hsü KJ, Hofrichter R (2004) Geología y genesis. In: Hofrichter R (ed) El Mar Mediterráneo. Parte general. Ediciones Omega, Barcelona, pp 56–101
- Tomas J, Mons JL, Martin JJ, Bellido JJ, Castillo JJ (2002) Study of the first reported nest of loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, in the Spanish Mediterranean coast. *J Mar Biol Assoc UK* 82:1005–1007
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal $1/(4Nm+1)$. *Heredity* 82:117–125
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eug* 15:323–354
- Zaykin DV, Pudovkin AI (1993) Two programs to estimate significance of X^2 values using pseudo-probability tests. *J Hered* 84:152

**Artículo 2: DNA microsatellites reveal genetic isolation of the
Mediterranean loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*)**

"No me digáis que este problema es difícil.

Si no fuese difícil, no sería un problema".

Ferdinand Foch (1851-1929); mariscal francés.

Resumen:

Las poblaciones nidificantes de tortuga boba del Mediterráneo han sufrido un declive importante, por lo que sus tamaños poblacionales son mucho menores que los de las poblaciones atlánticas que las originaron. Estudios previos basados en el uso del ADN mitocondrial han revelado que las poblaciones nidificantes de tortuga boba (*Caretta caretta*) del Mediterráneo oriental están aisladas de las del Atlántico. Sin embargo, los marcadores usados son de herencia maternal y en consecuencia, la contribución de los machos no se tuvo en consideración. En las zonas de alimentación del Mediterráneo occidental se encuentran individuos juveniles de ambas poblaciones, aunque la migración desde el Atlántico parece sesgada hacia los machos. En estas condiciones, es posible la existencia de flujo génico mediado por machos desde el Atlántico al Mediterráneo, evitándose así el aislamiento de las poblaciones Mediterráneas. En caso de confirmarse dicho el aislamiento, las poblaciones del Mediterráneo podrían haber sufrido un descenso de la variabilidad genética debido a la reducción de sus poblaciones.

Para probar esta hipótesis, se seleccionaron 53 individuos de 5 zonas de alimentación del Mediterráneo occidental que portaban el haplotipo CC-A1 del ADN mitocondrial, que es exclusivo de las poblaciones nidificantes del Atlántico. Para estos individuos se genotiparon 7 microsatélites y se compararon los resultados con un total de 112 individuos pertenecientes a las poblaciones del Mediterráneo oriental.

No se encontró ninguna diferencia entre las poblaciones en cuanto a diversidad génica (H_e), heterozigosidad (H_o), diversidad alélica (k) o el coeficiente de consanguinidad (F_{is}) (Kruskal wallis; $P > 0.01$), demostrándose así que la variabilidad es similar en todas las poblaciones. Sin embargo, las poblaciones del Mediterráneo y del Atlántico son genéticamente distintas ($F_{st} = 0,025$, $p < 0,001$), por lo que se descarta un flujo génico significativo mediado por machos entre las poblaciones del Atlántico y el Mediterráneo.

Estos resultados demuestran que las poblaciones del Mediterráneo son una unidad genética independiente del Atlántico, lo que la hace más vulnerable a las

pérdidas de variabilidad que típicamente se derivan de una reducción importante del tamaño poblacional. Sin embargo, la reducción que han sufrido estas poblaciones no ha disminuido la variabilidad de estas poblaciones, posiblemente debido el flujo existente entre las poblaciones Mediterráneas. Por todo ello es recomendable frenar el descenso de las poblaciones Mediterráneas antes de que la variabilidad genética se vea comprometida.

Además, el elevado grado de diferenciación entre estas dos áreas (Atlántico y Mediterráneo) sugiere que los microsatélites pueden ser buenos marcadores para asignar los individuos encontrados en zonas de alimentación a sus poblaciones de origen allí donde el ADN mitocondrial no lo permita.

DNA microsatellites reveal genetic isolation of the Mediterranean loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*)

Carreras C^{1,2}, Pascual M³, Cardona L¹, Aguilar A¹, Marco A², Rico C², Bellido JJ⁴, Castillo JJ⁴, Tomas J⁵, Raga JA⁵, SanFélix M⁶, Fernández G⁷, Margaritoulis D⁸, Rees AF⁸, Turkozan O⁹, Levy Y^{10,11}, Gasith A¹¹, Aureggi M¹², Khalil M¹³

1 Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avda. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain.

2 Estación Biológica de Doñana-CSIC-Apdo. 1056-E-41013-Sevilla-SPAIN

3 Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avda. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain.

4 CREMA (Centro de Recuperación de Especies Marinas Amenazadas, Aula del Mar de Málaga - Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía) Avda. Manuel Agustín Heredia nº 35, 29001 Málaga, SPAIN

5 Marine Zoology Unit, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, Aptdo. 22085, E-46071 Valencia, SPAIN

6 Marine Biology Laboratory, Department of Zoology, Faculty of Biology, University of Valencia, C/ Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot (Valencia), Spain

7 Fundación Marineland, C/Garcilaso de la Vega, 9 E-07181 Costa d'en Blanes, Calvià, Spain

8 ARCHELON. The Sea Turtle Protection Society of Greece. Solómuou 57 GR-104 32 Athens. Greece

9 University of Adnan Menderes 09010 Aydin. Turkey

10 The Israel Sea Turtle Rescue Centre. Nature & Parks Authority. Mevoot Yam. Mikhmoret 40297 Israel

11 Department of Zoology, Faculty of Life Sciences, Tel-Aviv University, Israel

12 Naucrates, Via Corbetta, 11 - 22063 Cantù (CO) - ITALY

13 MEDASSET- P.O. Box 19, Tyre, Lebanon

Keywords: *Caretta caretta*, mitochondrial DNA, microsatellite DNA, Mediterranean, Atlantic, gene flow, isolation

Corresponding author:

Carreras C

Estación Biológica de Doñana-CSIC-Apdo. 1056-E-41013-Sevilla-SPAIN

FAX: (+34) 954.62.11.25

E-mail: carreras@ebd.csic.es

Abstract

Previous studies using mitochondrial DNA revealed that the Mediterranean nesting populations of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) are isolated from the Atlantic ones. However, the marker used in these studies is maternally inherited and hence, males contribution was not considered. Juveniles of both Mediterranean and Atlantic populations are found in the feeding grounds in the western Mediterranean, and Atlantic juvenile migration is known to be male biased. Under this scenario male mediated gene flow is possible to occur from the Atlantic to the Mediterranean in these common feeding grounds hence preventing isolation. To test this hypothesis we selected 53 individuals from five feeding grounds in the western Mediterranean bearing haplotype CC-A1 of the mtDNA D-loop, that is exclusive of the Atlantic nesting beaches. We genotyped these Atlantic individuals with 7 microsatellites and compared them to a total of 112 individuals from the Mediterranean nesting beaches. No differences were found in terms of gene diversity (H_e), heterozygosity (H_o), allele diversity (k) or inbreeding coefficient (F_{is}) (Kruskal wallis; $P > 0.01$) supporting that the variability is similar in both. Nevertheless, Mediterranean and Atlantic populations were genetically differentiated ($F_{st} = 0,025$, $p < 0,001$) and hence, significant male mediated gene flow between Atlantic and Mediterranean nesting areas should be excluded. The differentiation between these two areas suggests that microsatellites might be powerful markers for assigning individuals found in feeding grounds to their origin nesting area when mtDNA fails to identify them.

Introduction

The loggerhead turtle (*Caretta caretta*) is the most common turtle nesting in the Mediterranean (Broderick *et al.* 2002, Margaritoulis *et al.* 2003). However, the species is considered endangered worldwide and it has been included in most international wildlife conservation treaties (Hykle 2000). The possible genetic isolation of Mediterranean nesting populations from the Atlantic ones was not addressed until the 1990s (Bowen *et al.* 1993, Encalada *et al.* 1998, Laurent *et al.* 1993, Laurent *et al.* 1998). These studies found a deep differentiation between Atlantic and Mediterranean nesting areas based on the mitochondrial DNA (mtDNA). Moreover, they found that genetic variability in the Mediterranean was much lower than in the Atlantic. Hence, these studies hypothesized that Mediterranean populations originated from the Atlantic ones but become isolated at the beginning of the Holocene (Bowen *et al.* 1993, Encalada *et al.* 1998). This colonisation was probably carried out by a few individuals as only haplotype CC-A2, shared with the Atlantic, comprises most of the samples (Carreras *et al.* 2006a)

The Mediterranean populations are not only genetically less diverse than those in the Atlantic, but much smaller (Margaritoulis *et al.* 2003). Most of the Mediterranean populations have been recently reduced due to direct exploitation, degradation of nesting and potentially interesting habitats and incidental catch, while the effect of other threats such as pollution and boat collisions are yet poorly known (Margaritoulis *et al.* 2003). For instance, it is estimated that from the end of World War I until the mid 1930s at least 30,000 turtles, including loggerhead and green turtles, were caught on what is now Israel (Sella 1982). For all these reasons Groomridge (1990) recommended that the species should be considered critically endangered in the Mediterranean. The isolation of populations combined with a small population size is one of the major threats to the preservation of populations from the genetic point of view (Frankham *et al.* 2002). This situation might lead to a loss of genetic variability, to an increase of homozygotes and cause inbreeding depression (Haliburton 2004). Based on this results one should arrive to the conclusion that conservation of the Mediterranean from the genetic point of view is highly compromised. This is specially relevant if we consider that is isolated from the Atlantic, that genetic diversity is actually very low, that actually supports many threats, and that some Mediterranean populations are extremely reduced (Margaritoulis *et al.* 2003, Khalil *et al.* 2005). However only (mtDNA) maternally inherited markers were used in these studies and thus, a possible male mediated gene flow was not considered. Recent studies have shown that both nuclear DNA (nDNA) and mtDNA markers are needed in order to assess the genetic structure and gene flow in loggerhead turtle populations (Bowen *et al.* 2005, Carreras *et al.* 2006a). This is because female philopatry usually causes strong mtDNA genetic structuring whilst males can connect populations for nDNA.

These male mediated connections are proposed to occur in shared feeding grounds or in shared mating areas (Bowen *et al.* 2005). Both north Atlantic and Mediterranean juveniles meet in the western Mediterranean during its developmental migration (Laurent *et al.* 1993, Laurent *et al.* 1998, Casale *et al.* 1998, Carreras *et al.* 2006b). This admixture is not uniform as turtles coming from the Atlantic and the Mediterranean nesting populations are present in different frequencies in the western Mediterranean feeding grounds in accordance with the water currents (Carreras *et al.*

2006b). However, turtles from both origins are present in most of the areas studied and although most of the turtles are immature individuals, some of them are large enough to be adults (Carreras *et al.* 2006b, Mayol *et al.* 1988).

Females of the loggerhead turtle are philopatric (Bowen *et al.* 1993, Encalada *et al.* 1998, Laurent *et al.* 1998) and mating is thought to occur not far from nesting sites (Schroeder *et al.* 2003). Using a combination of genetic markers and hormonal sex determination Casale *et al.* (1998) showed that the incoming of Atlantic individuals into the Mediterranean is male biased. Direct gonad examination of stranded and captured animals in Mediterranean feeding ground showed a higher proportion of males than nesting areas hence reinforcing this findingd (Casale *et al.* In press.). If those Atlantic males mate with Mediterranean females there could be a male mediated gene flow from the Atlantic to the Mediterranean. This hypothesis should be addressed in order to determine the genetic status of Mediterranean nesting populations.

The aim of the present work is to test using nuclear markers 1) if differences exists between Atlantic and Mediterranean populations in terms of genetic variability that reflects differences in conservation status and 2) the degree of isolation of Mediterranean nesting populations.

Material and Methods

Sampling and DNA extraction:

A total of 169 samples were collected from loggerhead sea turtles at five feeding grounds in the western Mediterranean and the adjoining Atlantic (Figure 1, Table 1) including south-western Spain (SWS: west of Gibraltar strait), south-eastern Spain (SES: from east of Gibraltar strait to Palos Cape), mid-eastern Spain (MES): from Palos Cape to Ebro Delta), the Pitiüses islands (PIT: south Balearic Islands) and Gimnesies Islands (GIM: north Balearic Islands). Samples were collected from live and dead individuals from 2002 to 2004. Live animals were caught accidentally by fishermen or collected while basking by scuba divers (Ehrhart & Ogren 2000). To avoid pseudoreplication, all living turtles were tagged whenever possible with external flipper tags or subcutaneous PIT tags. These procedures are expected to ensure independency of the collected samples. From each individual, muscle or skin samples were collected and stored in 95% ethanol. DNA was extracted using the QIAamp extraction kit (QIAGEN®) following the manufacturer's instructions.

Atlantic individuals were selected from the samples of the western Mediterranean feeding grounds by amplifying a fragment of 391 bp of the control region of the mitochondrial DNA as described elsewhere (Carreras *et al.* 2006b). Haplotype CC-A1 has been only reported in the north Atlantic nesting beaches (Bowen *et al.* 1993, Encalada *et al.* 1998) consequently, only individuals exhibiting that haplotype were selected from the feeding grounds to be analyzed as representatives of the Atlantic nesting beaches. These selected samples were genotyped for seven microsatellites previously used in the species: Cm84, Cc117, Cm72 and Ei8 (FitzSimmons *et al.* 1995); Cc141 and Cc7 (FitzSimmons *et al.* 1996); and Ccar176 (Moore and Ball 2002). However the reverse primer of the locus Ccar176 was redesigned (Carreras *et al.* 2006a) using the sequence of the original clone found in GenBank (accession number AF333763) in order to improve amplification reaction and allele sizing (Carreras *et al.* 2006a). One primer for each pair was fluorescently labeled with NED, PET, VIC or 6-FAM. Each loci was amplified using a PCR with a typical cycle of 95°C for 2 min 30s followed by 30 cycles at 95° for 45s, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension of 72°C for 5 min. Allele length was determined on an ABI 3730 automated DNA Analyzer (Applied Biosystems). Allele sizes were assigned using the Genemapper package (ABI PRISM® GeneMapper™ Software Version 3.0.).

The selected individuals were compared to 112 individuals genotyped with the same seven microsatellite loci and sampled from 7 nesting areas in the eastern Mediterranean (Fig. 1) during 2003 and 2004 nesting seasons to study the genetic structuring of the Mediterranean nesting populations (Carreras *et al.* 2006a). These previous study comprises the following populations: Greece (GRE: samples from Zakyntos and Lakonikos Bay); Crete (CRE: Rethymno); western Turkey: (WTU: Fethiye, in the southwest); northern Cyprus (CYP); Lebanon: (LEB: El Mansouri); and nesting sites scattered along de Israeli coastline (ISR) (Figure 1).

Data analyses

Different measures of variability as gene diversity (H_e), heterozigosity (H_o) or number of alleles (k) were calculated with GENECLASS (Piry *et al.* 2004). Departure of Hardy-Weinberg equilibrium and inbreeding coefficient (F_{is}) were calculated for

each locus and population using FSTAT (Goudet 1995). As normality is not accomplished, differences in these parameters in all sampling sites was assessed using the non parametric Kruskal-Wallis test using the program STATISTICA 6.0. To test loci independency linkage disequilibrium between loci pairs were tested. We also conducted tests for pairwise population differentiation (F_{st}) and p-values for genetic differentiation were calculated with a Markov chain randomization (Guo and Thompson 1992). Fisher's method, which assumes statistical independence across loci, was used to combine test results for allelic counts among the populations for all seven loci (Raymond and Rousset 1995). All these statistical analyses were conducted using Genepop 3.4 (Raymond and Rousset 1995).

Population structure was also assessed using the programme STRUCTURE v2.1 (Pritchard *et al.* 2000), which implements a Bayesian clustering method to identify the most likely number of populations (K) without using a priori information on sampling location. The program groups individuals in K populations so as to achieve Hardy-Weinberg and linkage equilibrium. Following the search strategy described in Evanno *et al.* (2005) 20 runs were carried out for each value of K (from 1 to 10) Most of the parameters were set to their default values but we use the correlated allele frequencies option as recommended in cases of low population structure (Falush *et al.* 2003) and we allow the program to infer alpha from the data. We set the length of the burn-in and MCMC (Markov Chain Monte Carlo) to 100.000 as preliminary tests showed that the results did not change substantially with longer burn-in. We use the ad hoc statistic ΔK (Evanno *et al.* 2005) to detect the number of clusters in our sample but we also calculated $Pr(X/K)$ as described in the manual of the program. Once, the number of populations was assessed, prior information was used to test if the individuals are correctly reassigned to each population.

Estimates of gene flow

The number of migrants between each population pair (Nm) was calculated from the F_{st} values using the formula $Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{st}} - 1 \right)$ (Wright 1951). Differences of gene flow within the Mediterranean and between Mediterranean and Atlantic were assessed.

Estimates of gene flow based on F_{st} rely on the island model assumptions of equal population sizes and symmetric migration rates; however, these assumptions rarely hold in natural populations (Whitlock and McCauley 1999). Therefore we also estimated gene flow using a maximum-likelihood method based on a coalescent approach (Beerly & Felsenstein, 1999) implemented in MIGRATE vers. 1.7.6.1. (Beerli 2002). For all analyses, the default settings of migrate were used except that the number of short and long Markov chains and the number of trees sampled were increased (20 short chains sampling 10,000 trees and five long chains sampling 100,000 trees, following an initial 'burn in' period of 10,000 trees). Analyses were performed under the 'allele model' rather than the 'microsatellite model' because allele frequency distributions of these loci did not fit strict expectations of the SMM. Since convergence problems are common with Markov chain estimations, we performed each analysis five times, and the values presented herein are the mean of the five replicate runs. For each pair of populations we calculated the migration rate (M), that indicates how much more

important migration is to bring new variants than mutation, as well as the estimated number of migrants per generation (Nm).

Finally, we used the program GENECLASS vs 2.0 to assess first generation migrants (Piry *et al.* 2004). This option computes a likelihood ratio from the population where the individual was sampled over the highest likelihood value among all population samples including the population where the individual was sampled. We used a frequency-based method to calculate the likelihood ratios. Probability values were again determined using the Monte-Carlo resampling method, simulating 1,000 individuals and with a threshold of 0.05 (Paetkau *et al.* 2004).

Results

A total of 53 individuals from the western Mediterranean feeding grounds presented the Atlantic haplotype CC-A1 (Table 1) and hence the microsatellite data of these samples were considered as representative of the Atlantic individuals entering the Mediterranean. No statistical differences between feeding grounds were found when comparing mtDNA based Atlantic individuals using the seven microsatellite loci (Overall $F_{st} = -0.013$ $p > 0.05$).

Population structure

No departure from the Hardy-Weinberg equilibrium (Chi square, $p > 0.05$) was detected for any single population (Table 1). When we consider one group of all the Atlantic samples and another group with all the Mediterranean samples, overall Hardy-Weinberg disequilibrium was found, as expected, between all Mediterranean samples as the group is composed for several different populations (Carreras *et al.* 2006b). However, Hardy-Weinberg equilibrium was found within the Atlantic samples and hence these samples were grouped as ATL (Table 2). Furthermore, no linkage disequilibrium was found between all loci pairs (Chi square, $p > 0.05$) and hence, independence of loci was assumed. Observed heterozygosity per locus was highly variable, ranging from $H_o = 0.027$ (cm72 in Greece) to $H_o = 0.938$ (cc7 in Israel). However, mean expected heterozygosity per location was not so variable and ranged from $H_e = 0.634$ (Greece) to $H_e = 0.718$ (Atlantic group) (Table 1 and Table 2). Significant genetic structure was observed among all populations (overall $F_{st} = 0.029$, $p < 0.001$). All the comparisons involving the Atlantic individuals and one Mediterranean population yield the highest and more significant F_{st} values of all comparisons (Table 3). The pairwise comparison between the Atlantic samples and Cyprus was not significant despite they exhibited a high F_{st} value and the p -value was very close to significance. However, this Mediterranean population has one of the lowest sample sizes, and hence, results may be spurious. The group of all Mediterranean populations was significantly different from all Atlantic individuals ($F_{st} = 0.025$, $p < 0.001$).

Analyses with the software STRUCTURE without including any prior information about origin of samples indicated that the greatest likelihood was for $K=1$ population (mean Ln Prob of Data = -3228.89) and the post hoc statistics ΔK showed no significant peaks. As results were not very conclusive and traditional F_{st} methods showed very deep structuring between the Atlantic and the Mediterranean, prior information was used to check for reassignment assuming two groups. All Atlantic

individuals (100.0%) join to cluster 1 with a probability higher than 80% and all but 4 Mediterranean individuals (96.4%) join to cluster 2 with a probability higher than 80%. Only two Mediterranean individuals (one from Cyprus and one from Israel) were assigned to cluster 1 with higher probability than cluster 2. Data probabilities are plotted in Figure 2.

Despite differences among locus, no significant differences were found between all sampling sites in terms of mean gene diversity (H_e), mean heterozygosity (H_o), the inbreeding coefficient (F_{is}) or allele diversity (k) for all markers (Kruskal-Wallis; $P > 0.01$ in all cases) hence supporting that all these parameters are similar in all sampling sites and hence, in both basins (Table 1 and Table 2). Private alleles were also found both in the Atlantic and Mediterranean samples (Table 2) but at low frequencies (Figure 3).

Estimates of gene flow

Traditional F_{st} estimates of gene flow (Nm) ranged from 2,67 to 356,69 migrants per generation (data not shown). Gene flow within the Mediterranean was significantly higher than gene flow between the Atlantic and the Mediterranean (Mann-Whitney U test; $Z=3.11$; $p < 0.01$). Estimates of number of migrants per generation obtained from the coalescent approach ranged from $Nm = 0.50$ to $Nm=9.03$ (Table 4) while migration rate ranged from $M=2.97$ to $M=20.03$. Values of gene flow obtained from MIGRATE do not agree with F_{st} approach as the higher migration rates were obtained between the Atlantic groups and several Mediterranean populations (Table 4, Figure 4). Furthermore, estimates of gene flow based on F_{st} statistics showed no correlation with those obtained from the coalescent approach (Spearman R; $R=0.37$, $p > 0.01$).

GENECLASS 2.0 detected 5 first generation Atlantic migrants among Mediterranean nesting samples, including the two that STRUCTURE failed to assign to their origin population, the other two that were assigned to the Mediterranean cluster with a probability lower than 80% and one assigned with higher probability. No first generation migrants were detected among the Atlantic samples.

Discussion

The preservation of genetic diversity is one of the three global conservation priorities as recognized by the IUCN (McNeely *et al.* 1990). This consideration arises from two principles: 1) Environmental change is a continuous process and genetic diversity is required for populations to adapt to such change and 2) Loss of genetic diversity is often associated with inbreeding and reduction of reproductive fitness (Frankham *et al.* 2002). However, if genetic diversity of isolated and genetically different units is not compromised, isolation should be maintained in order to avoid a loss of genetic variability at species level and loss of local adaptability due to outbreeding depression (Frankham *et al.* 2002). For this reasons, the degree of isolation of populations and their genetic variability are crucial information for a proper management of populations of endangered species as the loggerhead sea turtle in the Mediterranean.

The Atlantic juveniles of loggerhead sea turtles are proposed to arrive to the Mediterranean following the Gulf Stream and enter the basin through the Gibraltar strait following magnetic cues (Lohmann and Lohmann 2003). When they reach the western Mediterranean they mainly use those feeding grounds along the Algerian current while eastern Mediterranean individuals are proposed to enter the western basin through the Strait of Messina or the Sicily channel and mainly use the feeding grounds along the Liguro-Provençal current. However, most western Mediterranean feeding grounds have significant contribution of turtles from both origins (Carreras *et al.* 2006b). Almost all the Atlantic individuals found in the Mediterranean feeding grounds come from the nesting areas of South Florida with minor contributions of other north Atlantic nesting areas (Carreras *et al.* 2006b). However, while Mitochondrial DNA reveals a deep structuring of North-American rookeries, this pattern vanishes when nuclear DNA is considered (Bowen *et al.* 2005). This is probably because an intense male mediated gene flow hinders at the nuclear level any structure generated at the mitochondrial level due to female phylopatry. For this reason, north Atlantic nesting sites are homogeneous in terms of nDNA and should be considered as a single unit for microsatellites. Consequently, Atlantic individuals collected in the present study at different Mediterranean feeding grounds proved to be at HW equilibrium, as expected, and could be grouped and considered as a single population in terms of nDNA. However, for the Mediterranean nesting populations, structuring was found with both markers hence suggesting that although male mediated gene flow exists, it is limited (Carreras *et al.* 2006a). For this reason Mediterranean populations were treated as separated units when Mediterranean and Atlantic populations were compared.

The comparison of microsatellite frequencies in the Atlantic and the Mediterranean populations, as above outlined, reveals a clear deep genetic isolation of the Mediterranean from the Atlantic. Genetic distances between the fraction of the Atlantic population inhabiting the western Mediterranean feeding grounds and the populations nesting in the eastern Mediterranean were in the same order of magnitude than those previously found between the populations nesting in North-America and that nesting in the distant nesting beaches from southern Brasil (Bowen *et al.* 2005). Furthermore, several private alleles were found for any of the two populations, which suggests independent evolution since the Mediterranean was colonised by loggerhead

sea turtles from the northern Atlantic (Bowen *et al.* 1993). Such a deep level of differentiation agrees also with that revealed by mtDNA (Bowen *et al.* 1993, Encalada *et al.* 1998, Laurent *et al.* 1998) and hence, although some migration has been detected, significant male mediated gene flow between Atlantic and Mediterranean populations should be discarded, regardless the existence of shared feeding grounds in the western Mediterranean.

Despite all these evidences, results reported by the coalescent approach of MIGRATE seem to point in the opposite direction as the highest gene flow values were found between the most differentiated populations. This is not unprecedented in marine turtles, as measures of gene flow under coalescent approaches have not corresponded to traditional F_{st} based analysis (Bowen *et al.* 2005, Carreras *et al.* 2006a). We know that Mediterranean populations originated from a migration of individuals from Atlantic populations at the beginning of the Holocene, between 12,000 and 18,000 years ago (Bowen *et al.* 1993). Several studies based on mtDNA revealed that due to this colonisation, most of the individuals exhibited haplotypes originated and in the Atlantic and a fewer exhibited new haplotypes originated in the Mediterranean (Encalada *et al.* 1998, Carreras *et al.* 2006a). Hence, the differentiation between Atlantic and Mediterranean rookeries, and inside the Mediterranean, rely in differences in frequencies of common haplotypes and the apparition of few exclusive haplotypes. The nDNA yield the same result, as private alleles are found, but at low frequencies, and differences are produced in changes on common allele frequencies (Figure 3). In this scenario, a coalescent approach would reflect past migration events, that originated Mediterranean populations, instead of actual isolation, that produces high genetic differentiation. Thus, values of gene flow reported by MIGRATE show how past migration from the Atlantic has been important to bring the genetic variants found in the Mediterranean.

Previous studies on the Atlantic nesting areas have revealed that those populations of sea turtles sharing common feeding grounds are usually homogeneous at the nDNA level, although they may differ at the mtDNA level due to male mediated gene flow (Bowen *et al.* 2005). However this is clearly not the case in the western Mediterranean feeding grounds as individuals either from the Atlantic and Mediterranean nesting areas share the same geographic areas but both groups of populations remain genetically isolated. At least two reasons may explain such a paradox. The first one is that the individuals coming from the Atlantic do not homogeneously mix with those from eastern Mediterranean nesting sites. A recent study has revealed that the relative abundance of Atlantic and Mediterranean turtles is indeed highly variable between several western Mediterranean feeding grounds, although turtles from both origins occur everywhere (Carreras *et al.* 2006b). Hence, the probability that two individuals of different origin met is lower than previously suggested (Laurent *et al.* 1993, Laurent *et al.* 1998, Casale *et al.* 2002), although it should exist. The second reason why gene flow doesn't exist is that most of the individuals found at those shared feeding grounds are juveniles. Although individuals as large as 100 cm of Straight Carapace Length (SCL) could be found in the feeding grounds, mean values are around 50 cm SCL (Carreras *et al.* 2006b) and hence most of the individuals should be considered as immature juveniles (Margaritoulis *et al.* 2003). Moreover, previous studies with mtDNA showed that large juvenile and adults caught in bottom trawlers (and hence presumably adults and subadults in a neritic stage) were originated exclusively in Mediterranean nesting areas (Laurent *et al.* 1998). Under this

scenario, almost all the Atlantic individuals might leave the area before reach maturity and, hence, the probability that two mature individuals of different origin met and mate in western Mediterranean feeding grounds would be also very low. The combination of these two factors would prevent a significant gene flow between Atlantic and Mediterranean individuals although they share feeding grounds. The presence of Mediterranean hatchlings with high assignment values to the Atlantic population suggests the presence of some hybrids and, hence, some gene flow between the Atlantic and Mediterranean might exist. However, the deep level of genetic isolation found in the present study reveals that this interchange is far enough to prevent high genetic differentiation.

Surprisingly, this high degree of genetic isolation, joined to a low population size of Mediterranean nesting populations compared to that of Atlantics, seems not to affect genetic variability in terms of nDNA despite previous studies show an extremely low level of genetic variability in terms of mtDNA in the Mediterranean (Bowen *et al.* 1993, Encalada *et al.* 1998, Laurent *et al.* 1998, Carreras *et al.* 2006a). Probably the fact that haploid mtDNA effective population size is fourfold lower than that of diploid nDNA loci (Birky *et al.* 1983) made the former marker to be more affected by the loss of diversity produced by the bottleneck that presumably followed the colonisation of the Mediterranean nesting areas by Atlantic individuals. Moreover the higher mutation rate of the microsatellites compared to the D-loop (D-loop 2×10^{-8} (Encalada *et al.* 1998); microsatellites (2×10^{-3}) (Ellegren 2000)) probably allowed a faster diversification of those nuclear markers until reach a variability similar to the Atlantic, and the apparition of several private alleles that made the Mediterranean populations unique in terms of nDNA. Mediterranean turtles are known to be significantly smaller than other populations in the world, including the Atlantic ones (Margaritoulis *et al.* 2003). These differences in size may have an ecological explanation, as the Mediterranean is known to have a productivity, much lower than, for instance, the Atlantic. However, given this level of genetic differentiation, a genetic component should not be discarded for such biometric differences and it might be another reason to protect the genetic uniqueness of the Mediterranean nesting areas. An increase of the gene flow between Mediterranean and Atlantic nesting areas would compromise the genetic exclusivity of each area and may cause outbreeding depression due to loss of local adaptability (Frankham *et al.* 2002).

The Mediterranean populations of the endangered loggerhead sea turtles have been proposed to be considered critically endangered based on information on contemporary threats, reduced population size or apparent decline in the last decades (Groomridge 1990). However, no genetic studies were included in this recommendation to assess if the Mediterranean populations are isolated or if the recent reductions of population size have affected the genetic diversity of those populations. The present study provide results that have strong implications for the conservation of the loggerhead sea turtle in the Mediterranean. The first evident implication is that the Mediterranean should be considered an independent Evolutionary Significant Unit (ESU: Moritz 1994), as it presents exclusive alleles for microsatellites (present study), exclusive mitochondrial haplotypes, all of them originated from the same ancestral common haplotype CC-A2 (Bowen *et al.* 1993, Encalada *et al.* 1998, Laurent *et al.* 1998, Carreras *et al.* 2006a) and it is isolated from the nearest populations (present study). This classification implies a high priority in conservation for the species as probably represent a significant contribution to the global genetic diversity of the

species (Moritz *et al.* 1994). The second implication is that the founder effect, that it is supposed to originate the populations, as well as contemporary reductions in population sizes have not yet affected the global variability and the degree of inbreeding of Mediterranean populations. This are good news for the species but conservationists may be aware as a continuation of the reduction of population sizes may have disastrous consequences, not only for Mediterranean populations but also for the overall genetic diversity of the species. Finally the third implication is that isolation of Mediterranean populations is needed in order to maintain the differentiation between the two areas and to avoid possible outbreeding depression.

As a final remark, the deep differentiation found between the Atlantic and Mediterranean individuals with microsatellites and the presence of private alleles showed that these markers may be very powerful to ascertain the origin of the individuals found in western Mediterranean feeding grounds. The mtDNA is a powerful marker to assess the composition of western Mediterranean mixed stocks (e.g. Carreras *et al.* 2006b) but the high presence of common haplotypes make very difficult to assign individuals in the feeding grounds to their breeding population, and only individuals with certain haplotypes (as CC-A1) are easily assigned as Atlantic or Mediterranean individuals. Microsatellites offer the possibility of individual assignments as most of individual samples were correctly assigned to its origin populations in the present study using the assignation test implemented in STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000). Certainly this issue should be addressed in future studies. However, as no differences have been found between North Atlantic nesting populations in terms of nDNA, it will be no possible to exactly assign the population of origin and probably only a general assignation to Mediterranean or Atlantic populations will be possible with these nuclear markers.

Acknowledgments

The *Fundació pel Desenvolupament Sostenible* provided logistic support for the fieldwork. This study was funded by the EU project “*Protección de Praderas de Posidonia en LICs de Baleares*” LIFE00NAT/E/7303, the project BOS2003-05904 of the Spanish Government (CICYT) and the Regional Activity Center for Specially Protected Areas (RAC/SPA) of the Mediterranean Action Plan (United Nations Environment Programme) in Tunis. The samples from turtles on the Balearic archipelago were provided by the BMA tissue bank, with the support of the Pew Fellows Program in Marine Conservation and Earthtrust. Samples from Lebanon we collected under the aegis of MEDASSET 2004 sea turtle conservation project. We thank Alnitak and the Volunteer Stranding Network of the Andalusian Coast for their help in sampling in the South Spain. AR and DM thank Sonja Baker, Christina Davy and Sandra Muller for sample collection in Greece.

References

- Berli P (2002) MIGRATE version 1.7.6.1 - Documentation and Program. Available at <http://evolution.genetics.washington.edu/lamark.html>.
- Berli P, Felsenstein J (1999) Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152, 763-773.
- Birky CWJ, Marayama T, Fuerst P (1983) An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, **103**, 513-527
- Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen RJ (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Mol. Ecol.*, **14** 2389-2402
- Bowen B, Avise JC, Richardson JJ, Meylan, AB, Margaritoulis, D, Hopkins-Murphy, SR (1993) Population structure of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the Northwestern Atlantic Ocean and Mediterranean sea. *Conserv. Biol.*, **7** (4), 834-844 .
- Broderick AC, Glen F, Godely BJ, Hays GC (2002) Estimating the number of green and loggerhead turtles nesting annually in the Mediterranean. *Oryx*, **36**(3), 227-235.
- Carreras C, Pascual M, Cardona L, Aguilar A, Margaritoulis D, Rees A, Turkozan O, Levy Y, Gasith A, Aureggi M, Khalil M (2006a) The genetic structure of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in the Mediterranean as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications. *Conservation Genetics* in press
- Carreras C, Pont S, Maffucci F, Pascual M, Barceló A, Bentivegna F, Cardona L, Alegre F, SanFélix M, Fernández G, Aguilar A (2006b) Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns. *Marine Biology* **149**: 1269-1279.
- Casale P, Laurent L, Gerosa G, Argano R (2002) Molecular evidence of male-biased dispersal in loggerhead turtle juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **267**, 139-145
- Casale P, Lazar B, Pont S, Tomás J, Zizzo N, Alegre F, Badillo J, Di Summa A, Freggi D, Lackovi G, Raga JA, Rositani L, Tvrtkovi N. (in press) Sex ratios of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*
- Dutton PH (1995) Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies In: *Proceedings of the International Symposium on Sea turtle Conservation Genetics* (eds. Bowen BW, Witzell WN), pp. 17-24. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. National Technical Information Service, Springfield, Virginia.
- Ehrhart, LM, Ogren H (2000) Estudios en hábitos de alimentación: captura y manejo de tortugas. In: Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois FA, Donnelly M (eds) *Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas. Specialist Group on Sea Turtles IUCN/CSE* Pub. No **4**, pp 70-74
- Encalada SE, Bjorndal KA, Bolten AB, *et al.* (1998) Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA D-loop sequences. *Marine Biology*, **130** (4), 567-575.

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611-2620.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567-1587.
- FitzSimmons NN, Moritz C, Limpus CJ, Miller JD, Parmenter CJ, Prince RI (1996) Comparative genetic structure of green, loggerhead, and flatback population in Australia based on variable mtDNA and nDNA regions In: *Proceedings of the International Symposium on Sea turtle Conservation Genetics* (eds. Bowen BW, Witzell WN), pp. 25-32. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-396. National Technical Information Service, Springfield, Virginia.
- FitzSimmons NN, Moritz C, Moore SS (1995) Conservation and Dynamics of Microsatellite Loci over 300 Million Years of Marine Turtle Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **12** (3), 432-440.
- Frankham R, Ballou JD and Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. University Press, Cambridge
- Goudet J (1995) FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485-486.
- Groombridge B (1990) Marine turtles in the Mediterranean: distribution, population status, conservation. *Nature and Environment Series (Council of Europe)*, **48**, 1-98.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361-372.
- Haliburton R. (2004) Introduction to populations genetics. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River
- Ilykle D. (2000) Tratados internacionales de Conservación. In: Eckert K.L., Bjørndal K.A., Abreu-Grobois F.A., Donnelly M (eds) *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE* (Traducción al Español) Publicación No.4
- Khalil M, Syed H, Aureggi M and Venizelos L (2005) Marine Turtle nesting at El Mansouri, South Lebanon. *Book of abstracts of the II Mediterranean Conference on Marine Turtles*, Turkey 28.
- Laurent L, Casale P, Bradai MN, *et al.* (1998) Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Molecular Ecology*, **7**, 1529-1542.
- Laurent L, Lescure J, Excoffier L, *et al.* (1993) Genetic studies of relationships between Mediterranean and Atlantic populations of loggerhead turtle *Caretta caretta* with a mitochondrial marker. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de la Vie. Sciences de la Vie Paris*, **316**, 1233-1239.
- Lohmann KJ, Lohmann CMF (2003) Orientation Mechanisms of Hatchlings Loggerheads. In: *Loggerhead Sea Turtles* (eds. Bolten AB, Witherington BE) pp. 44-62. Smithsonian Books, Washington D.C
- Margaritoulis D, Argano R, Baran I, *et al.* (2003) Loggerhead Turtles in the Mediterranean sea : Present Knowledge and Conservation Perspectives. In: *Loggerhead Sea Turtles* (eds. Bolten AB, Witherington BE) pp. 175-198. Smithsonian Books, Washington D.C.
- Mayol J, Muntaner J, Aguilar R (1988). Incidencia de la Pesca Accidental sobre las Tortugas Marinas en el Mediterráneo Español. *Butlletí de la Societat d'Història Natural de les Balears*, **32**, 19-31. Palma de Mallorca.

- McNeely JA Miller KR Reid WV Mittermeier RA and Werner TB (1990) Conserving the world's biodiversity. IUCN, world Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington DC
- Moore MK, Ball RM (2002) Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **11**, 281-288.
- Moritz C (1994) Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology* **3**, 401-411
- Mrosovsky N (2006) Does the Mediterranean Green Turtle exists? *Marine turtle Newsletter*. **111**, 1-2
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, **13**, 55-65.
- Perneger TV (1998) What's wrong with Bonferroni adjustments. *British Medical Journal*, **316**, 1236-1238.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, *et al.* (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Schroeder BA, Foley AM and Bagley DA (2003) Nesting patterns, Reproductive Migrations, and adult Foraging grounds of loggerhead turtles. In: *Loggerhead Sea Turtles* (eds. Bolten AB, Witherington BE) pp. 175-198. Smithsonian Books, Washington D.C.
- Sella I (1982). Sea turtles in the eastern Mediterranean and northern Red Sea. In. *Biology and Conservation of Sea turtles* (Bjorndal KA eds.), 417-423 Washington DC Smithsonian Institution Press.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal $1/(4Nm+1)$. *Heredity*, **82**, 117-125.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**, 323-354

Table 1: Sampling locations, sample size (n), origin of the turtles, code used in all tables and figures, inbreeding coefficient (F_{is}), heterozygosity (H_o), gene diversity (H_e) and mean number of alleles per locus (k).

Location	n	Origin	Code	F_{is}	H_o	H_e	k
Foraging grounds							
South Western Spain	12 (40)*	Atlantic	SWS	0.118	0.69	0.75	6.86
South Eastern Spain	14 (31)*	Atlantic	SES	0.143	0.63	0.73	7.14
Eastern Spain	7 (35)*	Atlantic	ES	-0.150	0.83	0.73	5.29
Pitiuses	9 (32)*	Atlantic	PIT	0.133	0.62	0.73	5.14
Gimnesies	11 (31)*	Atlantic	GIM	-0.047	0.72	0.75	5.86
Nesting areas							
Greece	39	Mediterranean	GRE	0.109	0.56	0.63	7.00
Crete	18	Mediterranean	CRE	0.074	0.62	0.66	6.43
Western Turkey	16	Mediterranean	WTU	-0.040	0.68	0.66	5.71
Cyprus	10	Mediterranean	CYP	0.018	0.70	0.72	5.86
Lebanon	9	Mediterranean	LEB	0.127	0.63	0.72	6.43
Israel	20	Mediterranean	ISR	0.026	0.67	0.70	7.00

* Number in parenthesis indicate the total number of samples analysed in order to select the Atlantic individuals. See text for details.

Table 2: Summary statistics of all Atlantic and Mediterranean samples.

	Atlantic individuals in feeding grounds						Mediterranean nesting sites					
	N	k	Ho	He	F _{is}	p.a.	N	k	Ho	He	F _{is}	p.a.
Cc141	86	13	0,860	0,871	0,015	4	172	11	0,721	0,799	0,099*	2
Cm72	98	5	0,286	0,261	-0,108	0	214	6	0,131	0,126	-0,041	1
Cm84	92	10	0,587	0,796	0,252*	2	204	10	0,676	0,727	0,073	1
Cc7	104	14	0,808	0,852	0,032	2	216	15	0,815	0,862	0,056	3
Ccar176	62	11	0,645	0,797	0,191*	4	186	14	0,634	0,631	-0,006	7
Cc117	90	9	0,822	0,761	-0,092	2	214	9	0,673	0,732	0,081	2
Ei8	56	9	0,679	0,675	-0,006	3	142	8	0,746	0,814	0,090*	2
Mean		10.3	0.670	0.716	0.056	2.43		10.3	0.628	0.670	0.063*	2.57

Number of genes (N), number of alleles (k), observed heterozygosity (Ho), gene diversity (He), the inbreeding coefficient (F_{is}) and number of private alleles (p.a.) of each group. * Significant departure of Hardy-Weinberg equilibrium based on exact test (P<0.01)

Table 3: Below the diagonal F_{st} values between each population pairs, above de diagonal, significance of pairwise comparisons.

		CYP	ISR	LEB	CRE	WTU	GRE
ATL		0.0686	0.0002	0.0046	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CYP	0.0128		<i>0.0186</i>	0.5583	<i>0.0425</i>	0.0634	0.0034
ISR	0.0143	<i>0.0131</i>		0.1849	0.1206	0.0084	0.0005
LEB	0.0258	-0.0036	0.0097		0.2289	<i>0.0386</i>	<i>0.0230</i>
CRE	0.0384	<i>0.0044</i>	0.0065	-0.0038		<i>0.0158</i>	0.4819
WTU	0.0403	0.0052	0.0152	<i>0.0075</i>	<i>0.0109</i>		<i>0.0237</i>
GRE	0.0339	0.0007	0.0158	<i>0.0037</i>	-0.0052	<i>0.0079</i>	

Significant values ($0.01 < P < 0.05$) are in italics, highly significant values ($P < 0.01$) are in bold.

Table 4: Number of migrants per generation (Nm) from columns (source) to rows (recipient) the using the coalescent approach implemented in MIGRATE.

	ATL	CYP	ISR	LEB	CRE	WTU	GRE
ATL		1,83	5,45	2,13	2,83	3,07	9,03
CYP	2,83		0,76	0,63	1,25	0,82	2,49
ISR	5,38	1,12		1,26	2,10	1,11	2,61
LEB	2,47	1,69	1,79		1,18	1,73	1,26
CRE	2,69	0,50	1,12	0,96		2,05	2,70
WTU	4,18	1,42	1,71	0,95	1,93		3,43
GRE	6,79	3,20	1,92	1,05	2,55	1,94	

Figure 1: Sampling locations. Shaded circles represent feeding grounds. Abbreviations are defined in table 1.

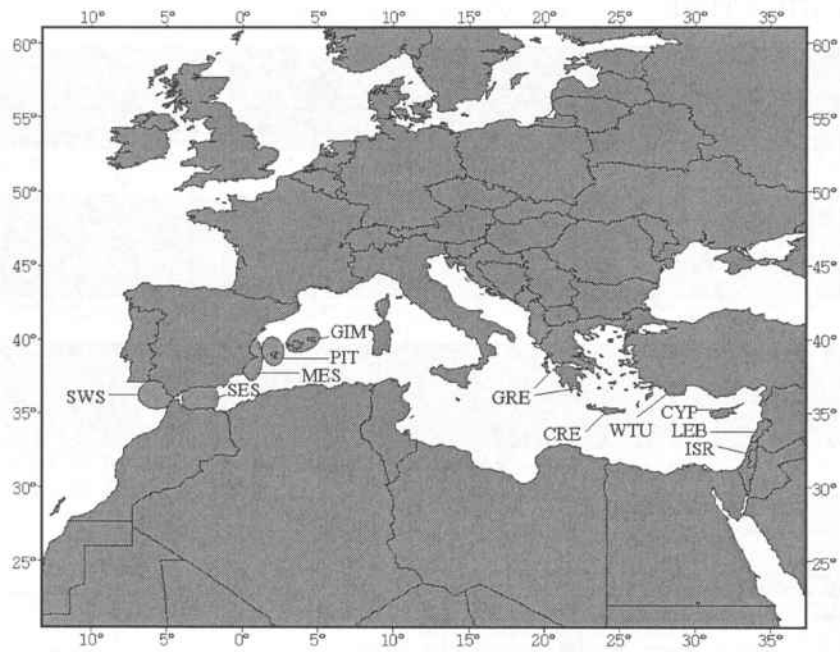
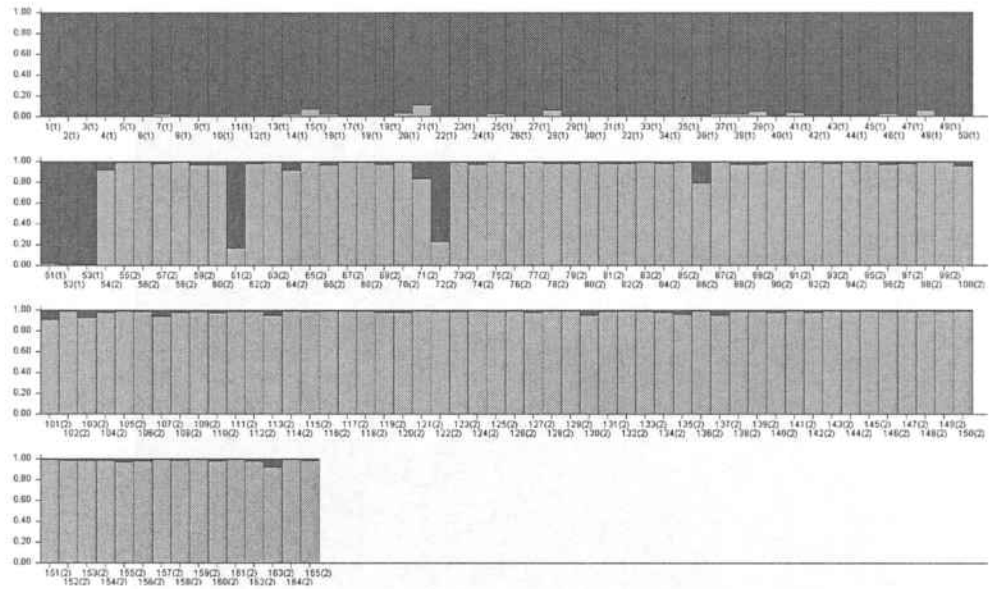


Figure 2: Summary of the clustering results using the two populations defined by the program STRUCTURE.



Each bar shows the estimated probability of one individual of belong to one of the two clusters defined by the program. Each individual number is followed by the population of origin in parenthesis: (1) Atlantic individuals (from individual 1 to individual 53) (2) Mediterranean individuals (from individual 54 to individual 165).

Figure 3: Alelic frequencies of the seven microsatellites in the Atlantic individuals (ATL) and the Mediterranean populations (MED).

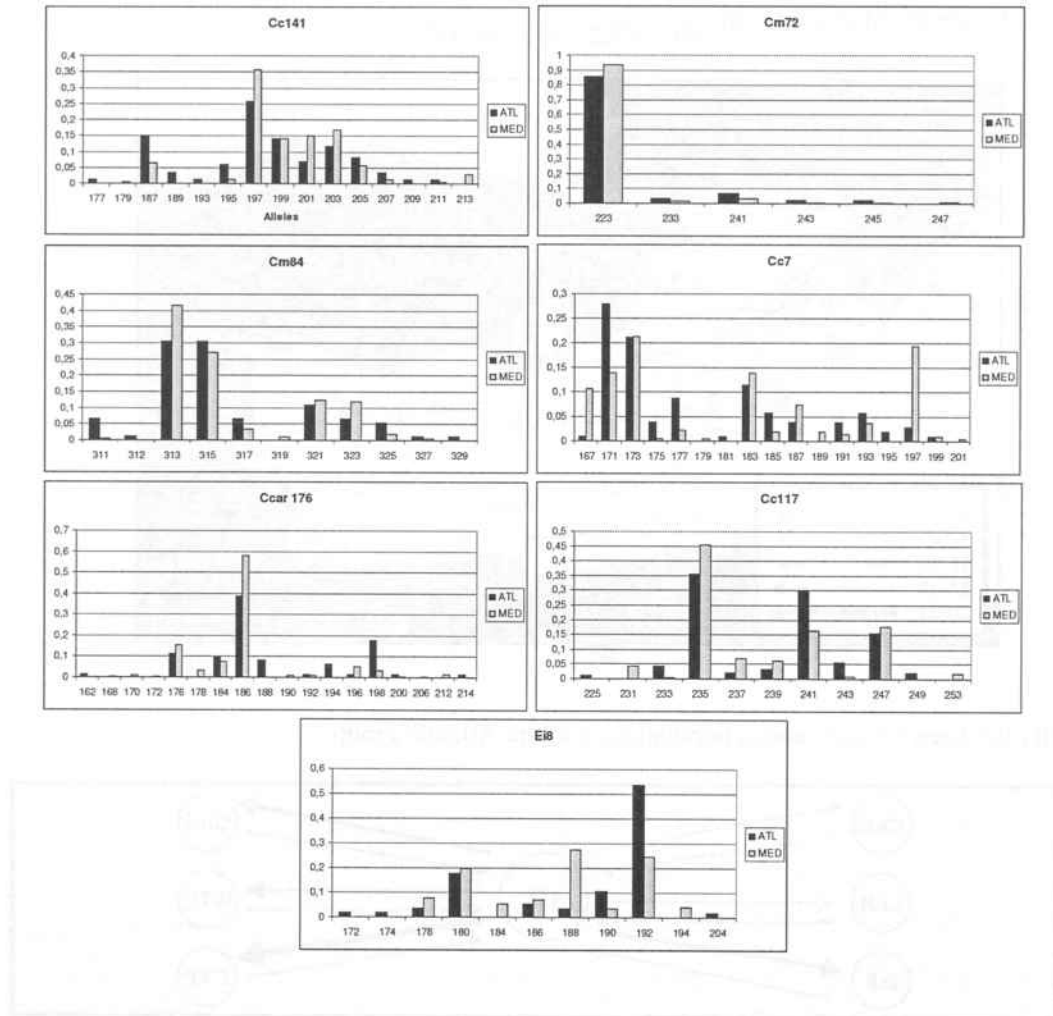
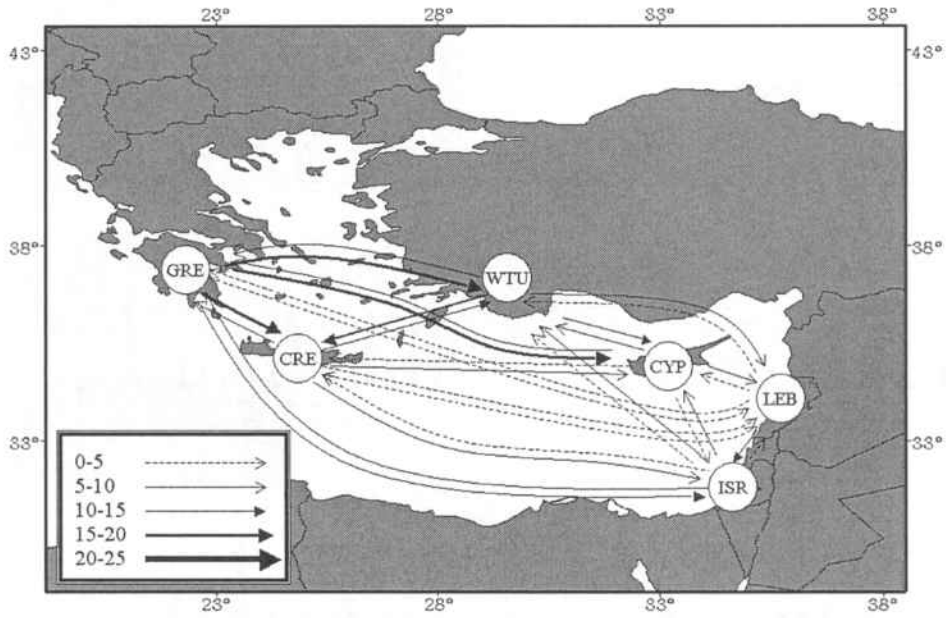
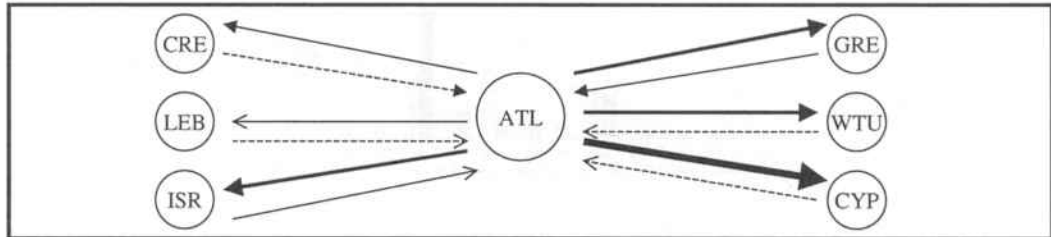


Figure 4: Migration rate (M) between each pair of populations calculated using coalescent methods as implemented in MIGRATE.

(A) Inside the Mediterranean



(B) Between Mediterranean populations and the Atlantic group.



Artículo 3: Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns

"Toda idea nueva pasa inevitablemente por tres fases: primero es ridícula, después es peligrosa, y después... ¡todos la sabían!".

Henry George (1839-1897); economista estadounidense.

Resumen:

El Mediterráneo occidental es una área de alimentación de juveniles de tortuga boba (*Caretta caretta*) provenientes tanto de las playas de nidificación del Atlántico como del Mediterráneo. Cada año miles de tortugas son capturadas de forma accidental por artes de pesca como el trasmallo, las redes de deriva o el palangre sin que se sepa con exactitud a qué zona de nidificación afecta esta mortalidad.

Para determinarlo se han realizado análisis de un fragmento del *D-loop* del ADN mitocondrial a un total de 282 juveniles capturados en ocho zonas de alimentación del Mediterráneo y de el Atlántico y se realizaron comparaciones entre pares de zonas de alimentación así como un Análisis de Agregados Mixtos para determinar el origen de las tortugas de cada zona.

Las comparaciones entre zonas de alimentación revelaron una profunda estructuración genética dentro del Mediterráneo occidental, demostrando así que la distribución de tortugas de origen atlántico y mediterráneo es heterogénea en la cuenca. Según el Análisis de Agregados Mixtos, las zonas de alimentación del norte de África y de las islas Gimnesias están habitadas principalmente por tortugas de las poblaciones Atlánticas, mientras que las zonas de alimentación de la costa europea del Mediterráneo occidental están habitadas principalmente por tortugas de las zonas de nidificación del Mediterráneo oriental. Esta estructuración no está relacionada con la distancia entre zonas de alimentación, sino con el patrón de corrientes superficiales y la distribución de las masas de agua. Parece, pues, que los inmaduros de tortuga boba procedentes del Atlántico y el Mediterráneo oriental permanecen ligadas a masas de agua particulares, con un intercambio limitado de tortugas.

Como el norte del Mediterráneo occidental comprende, principalmente individuos de las altamente amenazadas poblaciones del Mediterráneo oriental, los planes de conservación tienen que priorizar sobre estas zonas para reducir la mortalidad incidental causada por las artes de pesca en esas zonas.

Carlos Carreras · Sara Pont · Fulvio Maffucci
Marta Pascual · Anna Barceló · Flegra Bentivegna
Luis Cardona · Ferràn Alegre · Manuel SanFélix
Gloria Fernández · Alex Aguilar

Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns

Received: 6 October 2005 / Accepted: 6 February 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The analysis of mitochondrial DNA in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from eight foraging grounds in the Mediterranean and the adjoining Atlantic revealed deep genetic structuring within the western Mediterranean. As a consequence, the foraging grounds off the North-African coast and the Gimnesies Islands are shown to be inhabited mainly by turtles of the Atlantic stocks, whereas the foraging grounds off the European shore of the western Mediterranean are shown to be inhabited mainly by turtles from the

eastern Mediterranean rookeries. This structuring is explained by the pattern of sea surface currents and water masses and suggests that immature loggerhead sea turtles entering the western Mediterranean from the Atlantic and the eastern Mediterranean remain linked to particular water masses, with a limited exchange of turtles between water masses. As the north of the western Mediterranean comprises mostly individuals from the highly endangered eastern Mediterranean rookeries, conservation plans should make it a priority to reduce the mortality caused by incidental by-catch in these areas.

Communicated by S.A. Poulet, Roscoff

C. Carreras · L. Cardona (✉) · A. Aguilar
Department of Animal Biology, Faculty of Biology,
University of Barcelona, Avda. Diagonal 645,
E-08028, Barcelona, Spain
E-mail: luis.cardona@ub.edu
Tel.: +34-934021453
Fax: +34-934034426

S. Pont · F. Alegre
Marine Animal Rescue Center (CRAM),
Camí Ral 239, E-08330, Premià de Mar, Spain

F. Maffucci · F. Bentivegna
Stazione Zoologica "A. Dorhn",
Villa Comunale I, 80121 Naples, Italy

M. Pascual
Department of Genetics, Faculty of Biology,
University of Barcelona, Avda. Diagonal 645,
E-08028, Barcelona, Spain

A. Barceló
Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Faculty of Veterinary Science, Barcelona Autonomous University,
E-08193, Bellaterra, Spain

M. SanFélix
Marine Biology Laboratory, Department of Zoology,
Faculty of Biology, University of Valencia,
C/Dr. Moliner 50, E-46100, Burjassot (Valencia), Spain

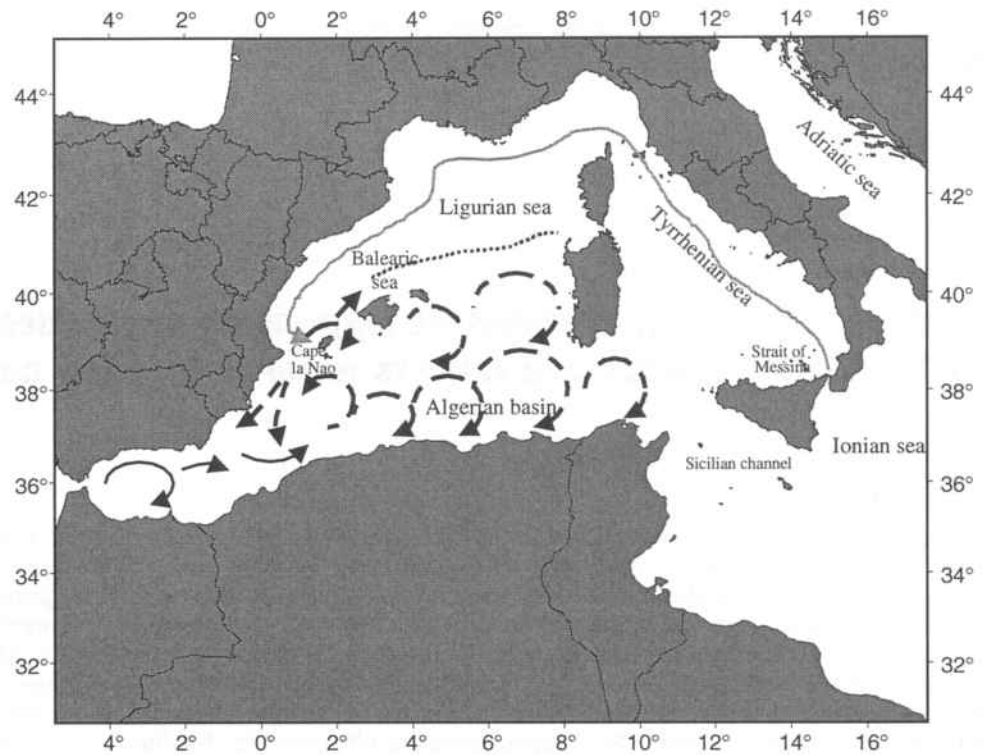
G. Fernández
Fundación Marineland, C/ Garcilaso de la Vega 9,
E-07181, Costa d'en Blanes, Calvià, Spain

Introduction

After hatching, the juveniles of most species of sea turtles spend several years offshore, dispersing over extremely large areas (Bowen and Karl 1997). The loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) is the most common turtle in the Mediterranean Sea (Broderick et al. 2002). The specimens inhabiting the western Mediterranean come from the western Atlantic and the eastern Mediterranean nesting areas, as nesting sites do not exist in the western Mediterranean (Laurent et al. 1993, 1998; Casale et al. 2002). The individuals born in the Atlantic are thought to travel along the Gulf Stream, pass close to the Azores and Madeira and enter the western Mediterranean through the Strait of Gibraltar (Bolten 2003). The route followed by those coming from the eastern Mediterranean rookeries remains unknown. Once in the western Mediterranean, little is known about how eastern Mediterranean and Atlantic juvenile turtles mix before returning to their beaches of origin for breeding (Laurent et al. 1998).

The western Mediterranean is topographically heterogeneous and is divided in a number of sub-basins characterized by different water masses and connected by two major surface currents (Fig. 1). The Algerian basin is filled with low-salinity water that entered recently from the Atlantic and flows eastwards along the

Fig. 1 Major current systems within the western Mediterranean in agreement with Millot et al. (1987). *Black arrows* indicate the routes followed by the Atlantic water (Algerian current) and *grey arrows* the routes of the Eastern Mediterranean water (Liguro-Provençal current). *Dashed lines* indicate temporal eddies and the *dotted line* a permanent front between the two systems



North African coast (Millot 1987, 2001; Pinardi and Masetti 2000). Conversely, the Liguro-Provençal current flows cyclonically along the European shore, thus filling the Tyrrhenian Sea, the Ligurian Sea and the Balearic Sea with saltier Mediterranean water (Millot 1987, 2001; Pinardi and Masetti 2000). This heterogeneity is known to affect the distribution of plankton, as the abundance of Atlantic species decreases counter-clockwise within the western basin (Estrada et al. 1985). However, the possible effect of major surface currents has not been considered in previous stock analyses of young loggerhead sea turtles in the Mediterranean (Laurent et al. 1993, 1998).

As loggerhead sea turtles of the Atlantic and the Mediterranean stocks gain access to the western Mediterranean using two different routes, and current systems are thought to play a relevant role in the dispersal of immature loggerhead sea turtles (Davenport and Clough 1986; Bolten 2003), a heterogeneous distribution of both type of loggerhead sea turtles within the western Mediterranean is expected, in agreement with the existence of two major water masses and current systems. Satellite tracking has revealed that loggerhead sea turtles in the Tyrrhenian Sea migrate to the eastern Mediterranean (Bentivegna 2002) but seldom enter the adjoining Algerian basin, thus avoiding Atlantic water. Conversely, loggerhead sea turtles in the Algerian basin sometimes enter the southern and eastern parts of the adjoining Balearic Sea, filled with Mediterranean water, but not the Tyrrhenian Sea (Cardona et al. 2005). Thus, exchange between sub-basins seems to be limited on the

short run. Unfortunately, satellite tags allow turtle tracking only for a few months. Here we use genetic markers to estimate loggerhead sea turtle dispersal on the long run within the western Mediterranean.

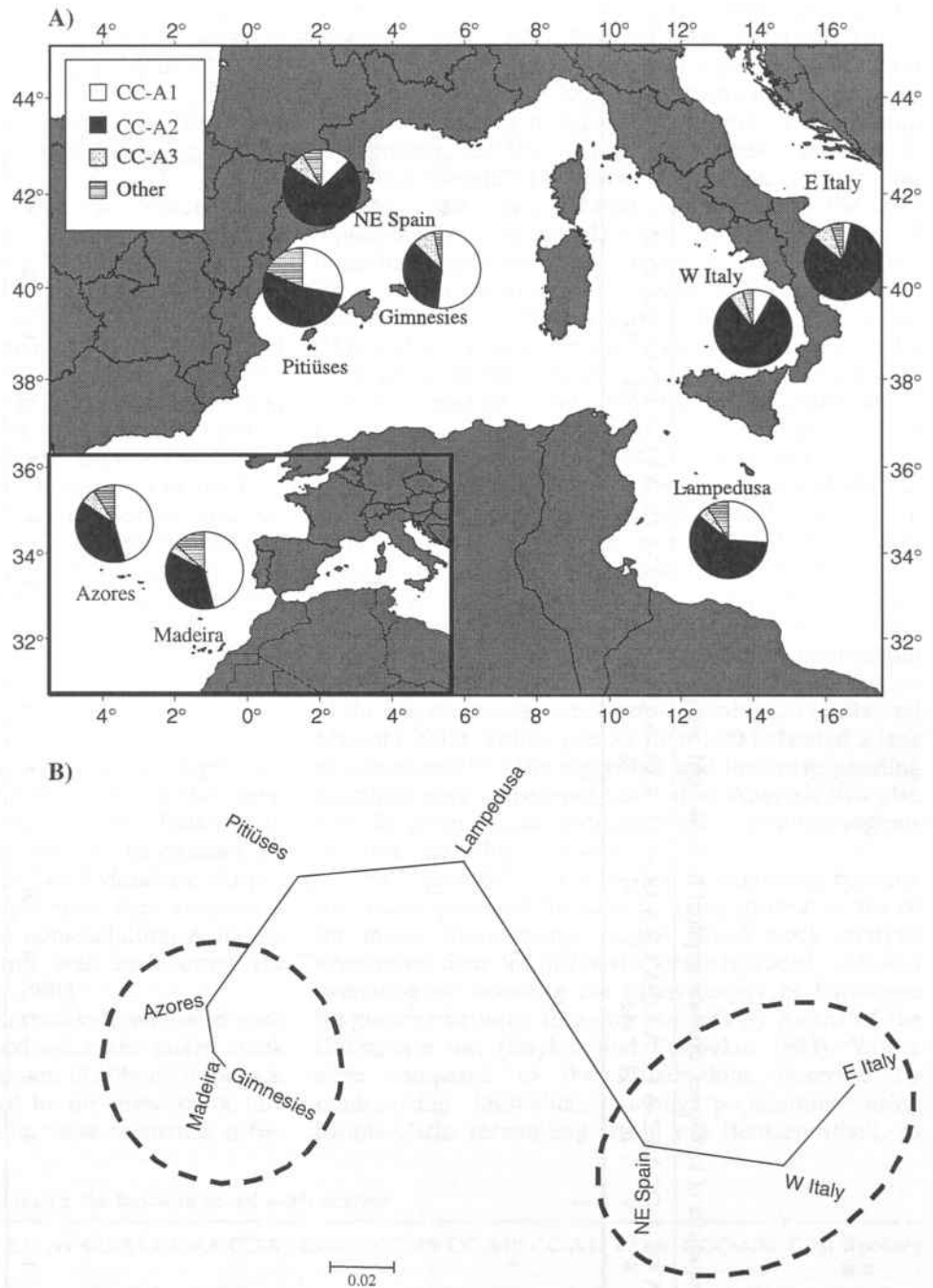
Material and methods

Material

Published data from foraging grounds off Lampedusa (LAM: Casale et al. 2002) and the Azores and Madeira (AZO and MAD: Bolten et al. 1998) were included in the study since they are located between the western Mediterranean and the putative Atlantic and eastern Mediterranean nesting areas where the juveniles were born. Thus, they are possibly intermediate points in turtle migration to the western Mediterranean. In addition to these data, blood and tissue samples from 282 juvenile loggerhead turtles were collected from five locations in the western Mediterranean: Gimnesies Islands (GIM: NE Balearic Islands), Pitiüses Islands (PIT: SW Balearic Islands), north-eastern Spain (NES: from Ebro delta to the French border), western Italy (WIT: from the Strait of Messina to Cape Circeo) and eastern Italy (EIT: from the Strait of Messina to Campomarino) (Fig. 2a, Table 1). Samples were collected from live and dead individuals during four consecutive summers (from 1999 to 2003).

Live animals were caught accidentally by fishermen or collected by scuba divers while the turtles were

Fig. 2 a Haplotype frequencies in each foraging ground. Haplotypes other than CC-A1, CC-A2 or CC-A3 were grouped due to its low frequency. **b** Neighbour-joining unrooted tree showing the genetic relationships between the foraging grounds and clusters defined in Table 1



basking (Ehrhart and Ogren 2000). All turtles were tagged with metal flipper tags or subcutaneous PIT tags before release to avoid pseudoreplication. Furthermore independency of samples can be assumed considering the size of the involved populations (Ehrhart et al. 2003; Margaritoulis et al. 2003), the high mortality of turtles before they reach the size of the sampled individuals (Crouse et al. 1987) and the long distance between the putative nesting areas and the sampled sites.

Blood was taken from the dorsal cervical sinus of live turtles (Owens and Ruiz 1980) and stored at -20°C or

preserved in lithium heparin at 4°C . Muscle or skin samples were collected from stranded animals and stored in a 20% DMSO NaCl 5 M solution or stored at -20°C . Standard straight carapace length (SCL) was measured for each turtle.

Laboratory methods

DNA was extracted from blood samples either using the QIAamp blood mini kit (QIAGEN®), following the

Table 1 Foraging grounds, absolute frequencies of haplotypes, carapace length of the turtles and references

	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	CC-A	n	SCL (cm)	References					
	1	2	3	5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	26	27	28	29	30	31	32						
LAM	17	39	3		1		1		1	1	1	1				2							65	26–55 ^a	Casale et al. (2002)			
AZO	36	31	5			1				2	2	1	1											79	7–66 ^a	Bolten et al. (1998)		
MAD	24	19	2				3	1	1	1	1	1			1									52	18–51 ^a	Bolten et al. (1998)		
GIM	16	11	3														1							31	50.0 ^a	(9.6)	Present study	
PIT	9	17		1			1		1	1	2													32	49.6 ^a	(9.0)	Present study	
NES	14	81	8	1	1		1								2	2	1	2	1					112	44.1 ^a	(14.9)	28–66	Present study
WIT	4	40	3														1							49	49.7 ^a	(13.7)	20–100	Present study
EIT	2	48	5																					58	36.8 ^b	(12.5)	25–72	Present study
Total	122	286	29	2	2	1	2	4	1	1	4	6	1	1	1	7	1	1	2	1	1	1	2	478				

Length information is given as mean (bold), range (italics) and standard deviation (brackets) of the straight carapace length (SCL) in centimetres

Average length values with different superscript are statistically different (see text for details)

^aData originally collected as curved carapace length (CCL) and transformed to SCL using the equation $CCL = 1.388 + (1.053) SCL$ (Bjorndal et al. 2000)

manufacturer's instructions, or by proteinase K/SDS digestion and ethanol precipitation. DNA was extracted from tissue either using the QIAamp extraction kit (QIAGEN®) or by incubating a small piece of tissue (0.5–1 g) for 3 h at 56°C with 1 ml of 6 M Guanidine chloride (Sigma) followed by a purification using Wizard DNA Clean-Up System (Promega).

A fragment of the D-loop of the mitochondrial control region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer pairs TCR1-TCR2, TCR5-TCR6 (Norman et al. 1994) or L71-H599 (Laurent et al. 1998). The PCR protocol was 94°C for 5 min, followed by 30–35 cycles at 94° for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min with a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were visualized in a 1% agarose gel and purified with the QIAquick kit (QIAGEN®). Purified products were sequenced with the BigDye™ Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) or the DY-Enamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham) and analysed on an ABI 3700 or ABI 373 automated DNA Analyser (Applied Biosystems). New haplotypes were sequenced in both forward and reverse directions to ensure accuracy.

Data analysis

Sequences were aligned using the BioEdit programme version 5.0.9 (Hall 1999) and compared with the previously found haplotypes (Laurent et al. 1998; Bolten et al. 1998; Encalada et al. 1998), described in the Archie Carr Center of Sea Turtle Research DNA database (<http://www.acctr.ufl.edu/>). New haplotypes were assigned a code following the established nomenclature. A haplotype maximum parsimony tree was built using the Mega3 package (Kumar et al. 2001).

The nesting populations that provide turtles to each foraging grounds were assessed using the mixed stock analysis. The traditional maximum likelihood approach has been reported to be biased by the presence of rare haplotypes such as singletons or those occurring at fre-

quencies lower than 5%, a shortcoming overcome by Bayesian approaches (Pella and Masuda 2001). This is crucial in this study as the control region of the D-loop of the mtDNA in the loggerhead turtle is characterized by the presence of rare haplotypes both in the nesting populations and the foraging grounds. Hierarchical Bayesian models also allow to combine genetic and ecological data, like rookery size, to avoid the over representation of extremely small populations typical of other Bayesian approaches (Okuyama and Bolker 2004). Thus, the programme Bayes (Pella and Masuda 2001) was run in two different ways. The Bayesian model BM1 did not consider rookery size, whereas the model BM2 weighted the contribution of each rookery by the size of the nesting population. Haplotype frequencies of the Atlantic nesting sites of north-western Florida (NWFL), South Florida (SFL), north-east Florida–North Carolina (NEFL–NC), Dry Tortugas and Mexico were obtained from Encalada (1998) and Bowen (2005), while haplotypes frequencies of the Mediterranean nesting sites at Greece and Turkey were obtained from Laurent et al. (1998) (Table 2). Nesting population sizes were obtained from Margaritoulis et al. (2003) and Ehrhart et al. (2003) (Table 2). The Gelman-Rubin shrink factor was used to test for anomalous realizations of the Bayes predictive posterior distribution (Pella and Masuda 2001). Values greater than 1.20 indicated a lack of convergence in the algorithm and the corresponding estimates were considered unreliable. Analysis was also done by grouping the nesting populations in two regions (Atlantic and Mediterranean).

The impossibility of statistical comparisons between the results provided for each foraging ground is one of the major shortcomings of the mixed stock analysis when more than one mixed stocks are included. This was overcome by assessing the heterogeneity of haplotype frequencies between foraging grounds by means of the Chi-square test (Zaykin and Pudovkin 1993). Values were compared to the distributions observed by randomizing individuals among populations using Monte-Carlo resampling (Rolf and Bentzen 1989), as

Table 2 Source nesting populations used in the Bayesian mixed stock analysis

	CC-A1	CC-A2	CC-A3	CC-A4	CC-A5	CC-A6	CC-A7	CC-A8	CC-A9	CC-A10	CC-A11	CC-A14	CC-A20	Total	Rookery size
NWFL	38	7	2				2							49	600
SFL	52	45	4	1			3				1	2	1	109	67,100
NEFL-NC	104	1												105	6,200
Dry Tortugas	4	50						2	2					58	217
Mexico		11	2					1	1	5				20	1,800
Greece		78				2				1				81	3,660
Turkey		19	13											32	1,366
Brasil				11										11	2,400
Total	198	211	21	11	1	2	5	1	3	8	1	2	1		

Mediterranean data are from Laurent et al. (1998)

Atlantic data are from Encalada et al. (1998) and Bowen et al. (2005) Population sizes are obtained from Ehrhart et al. (2003) and Margaritoulis et al. (2003)

Population codes are described in the text

implemented in the CHIRXC programme (Zaykin and Pudovkin 1993). With this method, haplotypes occurring at low absolute frequencies had not to be grouped. Moreover, the Snn test (Hudson 2000) was also used because it incorporates sequence divergence information to the analysis, as implemented in DNAsp programme version 4.0 (Rozas et al. 2003). Genetic distance (Gammast) between foraging grounds was also calculated using the DNAsp, and used to reconstruct a neighbour-joining tree. A Mantel test, with GENEPOP (Raymond and Rousset 1995) was performed in order to assess whether the genetic distance between foraging grounds and the geographic distance was correlated. To test whether the Liguro-Provençal current influences the genetic structure of the foraging grounds under its influence, non-parametric correlation (Spearman Rho) was calculated between the relative abundance of haplotype CC-A2 (shared by Atlantic and Mediterranean nesting sites, but with a much higher frequency at the later) and the distance to the foraging ground found in eastern Italy. Two independent tests were conducted, one using the shortest geographic distance and the other one using the geographic distance as measured along the Liguro-Provençal current. A similar analysis was conducted to test the contribution of the Algerian current to the relative abundance of the haplotype CC-A1 (found only at Atlantic nesting sites) of those foraging grounds under its influence. Here, the shortest distance and the distance as measured along the current are almost the same and hence just one test was conducted.

One-way ANOVA, followed by a post hoc Student Newman-Keuls test, was conducted to test for the existence of differences in the average SCL of the five foraging grounds sampled in the present study. SCL data of Madeira, the Azores and Lampedusa were not included in this analysis as data were not available from the reference sources.

Results

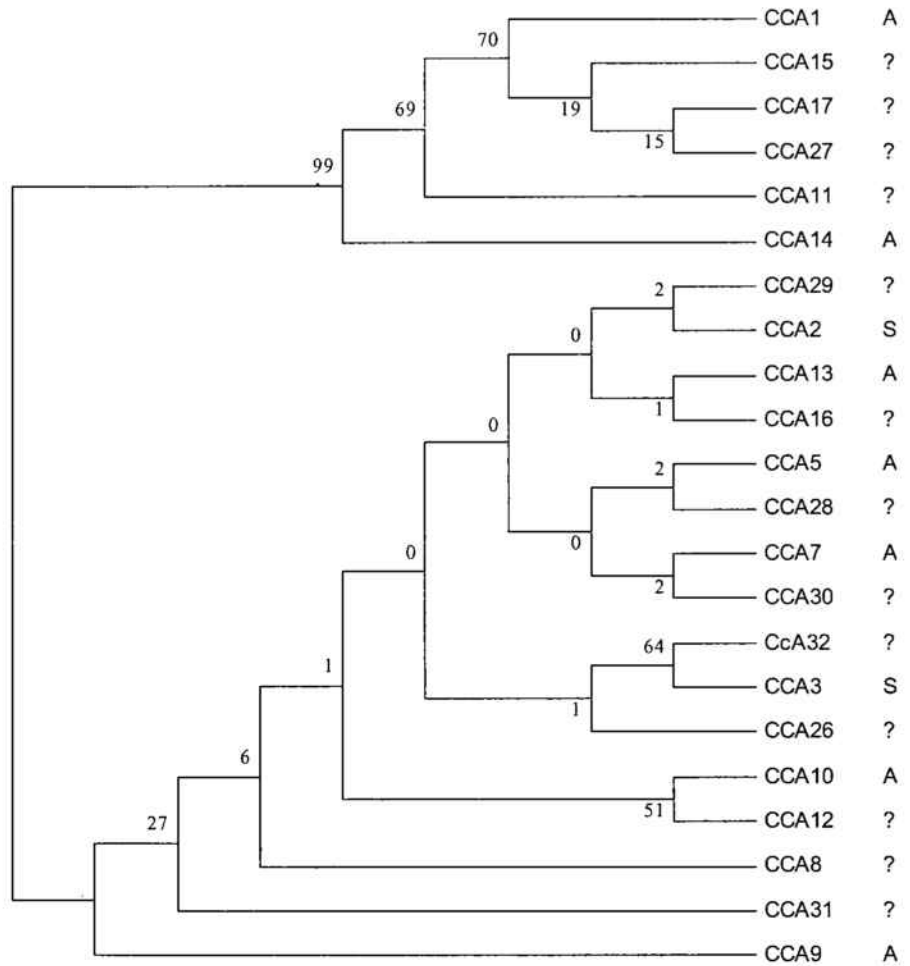
A total of 15 distinct haplotypes were detected in the present study (Table 1), six of them not described previously (CC-A27 to CC-A32, Genbank accession numbers AY742908 to AY742913). However, these new haplotypes were rare, with frequencies lower than 5%. A total of 22 haplotypes were considered in the present work after including published data from foraging grounds (Table 1). Maximum parsimony was used to reconstruct a MP tree (Fig. 3) considering all sites of the sequences, including gaps. Two distant clades with significant bootstrap values were found, with 17 fixed differences between them. Haplotypes reported previously from Atlantic rookeries only (CC-A1, CC-A5, CC-A7, CC-A9, CC-A10, CC-A13 and CC-A14) were found in 53 individuals and hence these turtles were considered to have an Atlantic origin. The only endemic Mediterranean haplotype, CC-A6, described from the Greek nesting sites (Encalada et al. 1998), was not detected, a

hardly surprising result considering its low (6.4%) frequency of occurrence, even in these rookeries. Most of the analysed turtles (216 individuals) had one of the two haplotypes shared by Atlantic and eastern Mediterranean rookeries (CC-A2 and CC-A3) and therefore could not be assigned to any nesting population. Finally, 13 turtles had haplotypes that were not found at any nesting site, indicating that data on the nesting populations whose juveniles exploit the western Mediterranean are still incomplete. Indeed, only a few samples from the Libyan and Israeli rookeries have been analysed to date (Laurent et al. 1998) and there is no published information from the Cape Verde rookeries, although juveniles from all three areas may use the western Mediterranean foraging grounds.

Unweighted mixed stock analysis (BM1) suggested that the contribution of Atlantic and Mediterranean nesting sites to the turtle stock found at each of the eight considered foraging grounds was highly variable (Table 3), as most of them (Azores, Madeira, Gimnesies, Pitiüses and Lampedusa) were mainly inhabited by turtles from the Atlantic rookeries, but those along the European shore (E Italy, W Italy and NE Spain) were inhabited mainly by turtles from the Mediterranean rookeries. Most of the Atlantic turtles come from the populations of SFL, NEFL-NC and Dry Tortugas, while those born in the Mediterranean come both from Greece or Turkey (Table 3). However, the high contribution of the small population from Dry Tortugas (Table 2) to some of the considered foraging grounds (Table 3) seems unrealistic on the ground of the small size of that nesting populations. When the data were weighted in agreement with population size (BM2), the mixed stock analysis yielded a similar scenario (Table 3, Fig. 4), but the contribution of Dry Tortugas to most of the considered foraging grounds was reduced dramatically, but for Lampedusa. Conversely, the contribution of the larger SFL population increased.

The results of the Chi-square and the Snn tests also supported the existence of deep heterogeneity in the composition of the eight considered foraging grounds (Chi-square and Snn tests; $P < 0.05$). Differences still remained significant after the removal of the Atlantic foraging grounds of Azores and Madeira (Chi-square and Snn; $P < 0.05$), thereby demonstrating strong genetic structuring within the Mediterranean. Pairwise comparison of all foraging grounds, either by the neighbour-joining tree (Fig. 2b) or by the Chi-square and Snn tests (Table 4), revealed two clusters. One included the foraging grounds off Madeira, the Azores and the Gimnesies Islands, and the other those located off the shores of Italy and north-eastern Spain. The members of the former cluster exhibited a higher prevalence of the haplotypes reported for Atlantic rookeries only (mainly CC-A1), while turtles in the latter group showed a higher prevalence of CC-A2, known from the two main nesting areas, but occurring at higher frequencies in the Mediterranean rookeries.

Fig. 3 Maximum parsimony tree of haplotypes and nesting area in which each haplotype was described (*A* Atlantic, *S* shared by the Atlantic and Mediterranean nesting areas and ? unknown nesting area). Bootstrap values are shown in each branch



The foraging grounds off Lampedusa and the Pitiüses islands were in an intermediate position (Table 4, Fig. 2), thus revealing the existence of a cline in the frequency of these two haplotypes. The CC-A1 Atlantic haplotype decreased eastwards and, as a consequence, the CC-A2 haplotype increased in the same direction (Fig. 2). However, this cline did not reflect a simple geographical trend in variability. The Gimnesies Islands, located at the centre of the western Mediterranean, clustered with the Atlantic islands of the Azores and Madeira, while the north-eastern Iberian Peninsula, roughly located at the same longitude, clustered with the two grounds off the Italian peninsula. Finally, the foraging grounds off the Pitiüses Islands, situated only 150 km south of the Gimnesies Islands, occupied an intermediate position in the tree.

As a consequence, no correlation exists between genetic and geographic distances (Mantel test; $P > 0.05$). Furthermore, there is no correlation between the relative abundance of CC-A2 at the foraging grounds influenced by the Liguro-Provençal current (eastern Italy, western Italy, north-eastern Spain, Pitiüses islands and Gimnesies islands) and the shortest distance to eastern Italy (Spearman Rho = -0.6 ; $P > 0.05$), although the corre-

lation becomes highly significant when the distance as measured along the current is used (Spearman Rho = -1.0 ; $P < 0.001$). Conversely, there is no significant correlation between the relative occurrence of the haplotype CC-A1 at the foraging grounds influenced by the Algerian current (Azores, Madeira, Pitiüses islands, Gimnesies islands and Lampedusa) and the distance to Azores (Spearman Rho = -0.3 ; $P > 0.624$).

Despite general agreement between the two methods here used (mixed stock analysis and pairwise comparison by means of the Chi-square and Snn tests), the relative contributions of Atlantic and Mediterranean nesting sites to the foraging grounds off Pitiüses and Lampedusa are controversial. On the one hand, the mixed stock analysis, either BM1 or BM2, revealed an extremely high occurrence of Atlantic turtles off Pitiüses and Lampedusa (Table 3, Fig. 4). On the other hand, none of them was completely clustered with those inhabited mainly by Atlantic turtles (Azores, Madeira and Gimnesies) (Table 4, Fig. 2b).

Finally, the mean SCL of the turtles was not homogeneous within the five Mediterranean foraging grounds sampled in the present study (ANOVA; $df = 4$; $F = 8.512$ $P < 0.001$), as turtles found off eastern Italy were

Table 3 Relative contribution of each rookery to the considered foraging grounds as revealed by two different Bayesian mixed stock analysis models

	Azores	Madeira	Gimnesies	Pitiüses	Lampedusa	NE Spain	W Italy	E Italy
NWFL	0.0661 (0.117) 0.0009 (0.009)	0.0785 (0.135) 0.0060 (0.034)	0.1238 (0.195) 0.0043 (0.031)	0.0219 (0.055) 0.0007 (0.006)	0.0592 (0.102) 0.0018 (0.016)	0.0221 (0.042) 0.0010 (0.009)	0.0303 (0.049) 0.0012 (0.011)	0.0108 (0.022) 0.0005 (0.005)
SFL	0.7407 (0.204) 0.9372 (0.074)	0.6104 (0.232) 0.8165 (0.143)	0.6451 (0.282) 0.9476 (0.099)	0.6233 (0.179) 0.8421 (0.165)	0.4636 (0.205) 0.6470 (0.162)	0.1963 (0.098) 0.3044 (0.093)	0.0394 (0.070) 0.2203 (0.113)	0.0169 (0.035) 0.0857 (0.062)
NEFL-NC	0.0540 (0.097) 0.0182 (0.047)	0.0866 (0.128) 0.0368 (0.081)	0.0784 (0.130) 0.0277 (0.071)	0.0180 (0.042) 0.0081 (0.026)	0.0167 (0.036) 0.0074 (0.025)	0.0116 (0.025) 0.0055 (0.017)	0.0225 (0.037) 0.0068 (0.020)	0.0099 (0.019) 0.0042 (0.012)
Dry tortugas	0.0175 (0.043) 0.0003 (0.004)	0.0533 (0.096) 0.0028 (0.028)	0.0196 (0.046) 0.0004 (0.006)	0.2648 (0.174) 0.0899 (0.155)	0.3130 (0.185) 0.2249 (0.204)	0.2795 (0.280) 0.0114 (0.078)	0.2730 (0.332) 0.0186 (0.113)	0.1867 (0.267) 0.0063 (0.063)
Mexico	0.0455 (0.058) 0.0336 (0.046)	0.1305 (0.094) 0.1277 (0.088)	0.0122 (0.035) 0.0024 (0.015)	0.0163 (0.037) 0.0396 (0.071)	0.0184 (0.045) 0.0167 (0.051)	0.0115 (0.031) 0.0049 (0.029)	0.0178 (0.064) 0.0059 (0.043)	0.0133 (0.042) 0.0047 (0.032)
Greece	0.0294 (0.058) 0.0054 (0.022)	0.0185 (0.044) 0.0081 (0.035)	0.0234 (0.052) 0.0056 (0.023)	0.0409 (0.081) 0.0170 (0.058)	0.0855 (0.138) 0.0941 (0.154)	0.2867 (0.255) 0.5302 (0.131)	0.4357 (0.317) 0.6441 (0.201)	0.4476 (0.299) 0.5979 (0.239)
Turkey	0.0449 (0.068) 0.0040 (0.020)	0.0192 (0.046) 0.0015 (0.011)	0.0929 (0.119) 0.0111 (0.046)	0.0101 (0.027) 0.0019 (0.014)	0.0417 (0.071) 0.0076 (0.039)	0.1910 (0.111) 0.1424 (0.11)	0.1788 (0.142) 0.1024 (0.17)	0.3121 (0.200) 0.3001 (0.23)
Brazil	0.0018 (0.005) 0.0005 (0.003)	0.0029 (0.008) 0.0006 (0.004)	0.0046 (0.012) 0.0009 (0.005)	0.0048 (0.013) 0.0007 (0.004)	0.0020 (0.005) 0.0005 (0.003)	0.0013 (0.004) 0.0003 (0.002)	0.0027 (0.008) 0.0007 (0.004)	0.0027 (0.008) 0.0005 (0.003)

In the first one (italics), rookery size was not considered, whereas in the second one (bold types) the contribution of every rookery was weighted by the size of the nesting population. Standard errors are shown in brackets.

statistically shorter than those found in the foraging grounds of the western Mediterranean (western Italy, north-eastern Spain, the Pitiüses islands and the Gimnesies islands; Table 1).

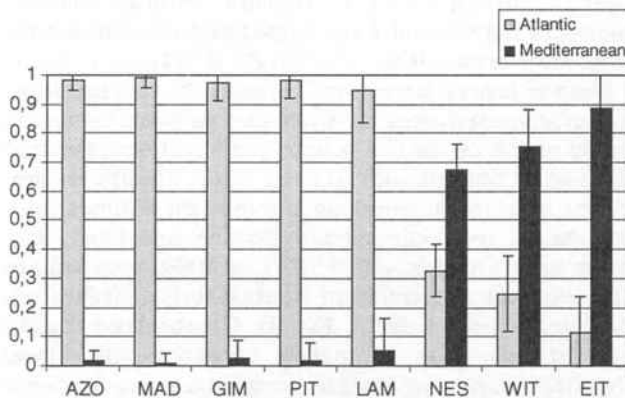


Fig. 4 Estimated contribution of Atlantic and Mediterranean nesting beaches to each foraging ground as suggested by the weighted mixed stock analysis (BM2; see text for details). Vertical bars show standard errors. Foraging grounds codes are defined in the text.

Discussion and conclusions

The mixed stock analysis is a powerful technique for deciphering the contribution of several source areas to mixed stocks sharing habitats like foraging grounds. Unfortunately, it may lead unrealistic results when genetic diversity in the source populations differ greatly and small and distant sources that are just subsets of a more diverse population are included in the analysis (Engstrom et al. 2002). The Bayesian approach for mixed stock analysis try to overcome that situation, but it is still extremely sensitive to the occurrence of rare haplotypes and may also yield biased results (Bass et al. 2004), unless sources were weighted in agreement with population size (Okuyama and Bolker 2004). This is clearly demonstrated by the differences in the output of the unweighted (BM1) and weighted (BM2) mixed stock analyses of the foraging grounds here considered, as an unrealistic high contribution of the tinny population nesting at Dry Tortugas to some of the considered foraging grounds was suggested when unweighted data were used. That contribution decreased dramatically

Table 4 Pairwise genetic distance (Γ_{st}) between locations

	Gimnesies	Azores	Madeira	Pitiüses	Lampedusa	NE Spain	W Italy
Azores	<i>0.001</i>						
Madeira	<i>0.003</i>	<i>0.001</i>					
Pitiüses	0.041 ^{a,b}	0.027	0.017				
Lampedusa	0.067 ^b	0.059 ^a	0.170 ^{a,b}	0.006			
NE Spain	0.168^{a,b}	0.167^{a,b}	0.151^{a,b}	0.055 ^{a,b}	0.032		
W Italy	0.256^{a,b}	0.215^{a,b}	0.170^{a,b}	0.108 ^{a,b}	0.056	<i>0.004</i>	
E Italy	0.340^{a,b}	0.287^{a,b}	0.231^{a,b}	0.173 ^{a,b}	0.101 ^{a,b}	<i>0.022</i>	<i>0.010</i>

The cluster of Azores, Madeira and Gimnesies is well differentiated from the cluster of NE Spain, W Italy and E Italy. Italic types show comparisons within clusters. Bold types highlight statistically significant differences between members of different clusters

^aChi-square test ($P < 0.05$)

^b S_{nn} test ($P < 0.05$)

when data were weighted, thus producing a more likely scenario.

A second source of uncertainty is the possible existence of temporal variations in the haplotype frequencies at the considered foraging grounds that may confuse with differences in the relative contribution of the considered rookeries. This had not been a source of concern if all the foraging grounds had been sampled simultaneously; However, this was not the case, as samples were collected from 1999 to 2003 but at different time spans at each foraging ground. Bass et al. (2004) found no annual differences in the genetic composition of a foraging ground at the Pamlico-Albermale Estuarine Complex in North Carolina during a 3-year sampling period, thus suggesting that temporal differences in the genetic composition of foraging grounds might occur only at a much higher temporal scale. However, one or two nesting season failures at a particular rookery due to stochastic phenomena (e.g. as a result of hurricanes) may cause significant changes to the production of nesting areas that might affect the composition of the foraging grounds. There is no way to be sure that the data here used are not biased by non-simultaneous collection of samples, although the range of turtle length from every foraging ground is large enough to guarantee that several cohorts are being sampled and hence that the effects of recruitment failure in a few years will be smoothed by successful recruitment in other periods. Nevertheless, haplotype frequencies at each foraging grounds and the relative contribution of each rookery to every foraging ground should not be considered as fixed values, but are expected to fluctuate due to stochastic changes in the haplotype frequencies at nesting sites and also due to annual variations in the reproductive success at each rookery.

Regardless of those shortcomings, there is no doubt that mixing of Atlantic and Mediterranean turtles within the western Mediterranean is not homogeneous in the light of the statistically significant differences observed in the genetic structure of several western Mediterranean foraging grounds. Furthermore, the Gimnesies Islands clustered with the Azores and Madeira, and not with the Pitiüses Islands, the north-eastern Spain and the Italian foraging grounds, as might be expected if the western Mediterranean was genetically homogenous. Processes as

genetic drift or isolation by distance cannot be invoked to explain the above-reported genetic structuring, as there is no reproduction in the foraging grounds and hence these sampling units cannot be treated as populations. Differences in habitat selection between oceanic and neritic stage turtles cannot be either invoked to explain the structuring within the western Mediterranean as foraging grounds in the western Mediterranean differing in haplotype frequencies do not differ in average turtle length. Conversely, foraging grounds not differing in haplotype frequencies differ in average length (eastern Italy when compared with western Italy and north-eastern Spain).

Thus, differences in haplotype composition within the western Mediterranean are proposed to be generated by phenomena affecting the mixing of Atlantic and eastern Mediterranean juveniles after they reach the foraging grounds through the Strait of Gibraltar and the Strait of Messina and the Sicilian channel. A simple diffusion pattern from these points fails to generate the above-reported structuring, as there is no significant correlation between genetic and geographic distances. Conversely, the pattern of surface sea currents and the distribution of water masses explain successfully the reported genetic heterogeneity.

High-salinity water from the Tyrrhenian Sea flows along the western coast of Italy until it reaches the Ligurian Sea (Millot 1987, 2001; Pinardi and Masetti 2000). There, the Liguro-Provençal current originates and flows westwards, carrying water from the Ionian Sea to the south-eastern Iberian Peninsula. At Cape la Nao, a branch of this current is deflected towards the south-western Balearic Islands (the Pitiüses) and supplies these islands with Mediterranean water (Millot 1987, 2001; Pinardi and Masetti 2000). The percentage of turtles with the haplotype CC-A2 significantly decreases downstream along the Liguro-Provençal current, although there is no correlation when the geographic distance is used, hence demonstrating that turtles disperse mainly along the Liguro-Provençal current. Actually, the Liguro-Provençal current would appear to be a shortcut that accelerates the transport of eastern Mediterranean turtles along the European shore to the western Mediterranean.

The Algerian current flows eastwards from the Strait of Gibraltar to the Sicilian channel (Fig. 1; Millot 1987,

2001; Pinardi and Masetti 2000), thus transporting Atlantic water with a low salinity along the African coast. Temporary eddies leave the Algerian current and supply the Balearic Islands (López-Jurado 1990) and Sardinia with Atlantic water. However, the relative abundance of the haplotype CC-A1 at the foraging grounds influenced by this current does not decrease significantly eastward. This may be explained by the Liguro-Provençal current having a stronger effect on the Pitiüses islands (SW Balearic Islands) than on the Gimnesies islands (NE Balearic Islands) (López-Jurado et al. 1990) and no effect at all on Lampedusa (Malanotte-Rizzoli et al. 1997). A possible consequence is that the supply of eastern Mediterranean turtles carrying the CC-A2 haplotype and the resulting "dilution" of the CC-A1 haplotype is unrelated to the distance to the source of Atlantic turtles.

As a result of this current pattern, and consistent with a scenario in which immature loggerhead sea turtles remain linked to their original water masses (Fig. 1), the foraging grounds off the north African coast and the north-eastern Balearic archipelago (the Gimnesies Islands) would be inhabited mainly by turtles of the Atlantic stocks, as these regions are not affected by currents from the eastern Mediterranean. Conversely, the foraging grounds off the European shore of the western basin, and those in the eastern basin, would be mainly inhabited by turtles from the eastern Mediterranean rookeries, as little Atlantic water reaches these regions (Millot 1987; López Jurado 1990).

Every year, several thousand immature individuals are caught accidentally by a variety of fishing activities in the western basin (Aguilar et al. 1995; Carreras et al. 2004). This mortality poses a threat both to the Atlantic and the eastern Mediterranean populations (Margaritoulis et al. 2003; NMFS-SEFSC 2001), as juveniles from both nesting areas use foraging grounds in the western Mediterranean. The stock of turtles nesting in the eastern Mediterranean (Margaritoulis et al. 2003) is much more reduced than that in the Atlantic rookeries (Ehrhart et al. 2003). Given that immature turtles from the former region that enter the western Mediterranean concentrate in the foraging grounds off the European shore, a reduction in turtle by-catch and mortality in this area should be considered a priority to protect the eastern Mediterranean population.

A further point that deserves discussion is the possible occurrence of loggerhead sea turtles from Mediterranean rookeries off Madeira and the Azores, as suggested by the mixing stock analysis. Considering the permanent eastward flow of surface water at the Strait of Gibraltar (Millot 1987) and the limited swimming and diving competence of immature loggerhead sea turtles shorter than 40 cm SCL (Bolten 2003), passage from the Mediterranean to the Atlantic is thought to be possible only for larger specimens. Although the average length of loggerhead sea turtles off the Azores is about 30 cm, much larger animals have been recorded there (Bjorndal et al. 2000) and elsewhere in the eastern Atlantic (Hays and Marsh

1997). However, size does not prove that they come from the Mediterranean, as tagging has revealed an extremely limited passage of turtles from the western Mediterranean to the adjoining Atlantic (Margaritoulis et al. 2003). Furthermore, those large specimens found in the mid-Atlantic foraging grounds might be Atlantic specimens coming back to their natal beaches after the oceanic phase. Clearly, this topic deserves further research.

Acknowledgements The samples from turtles on the Balearic archipelago were provided by the BMA tissue bank, with the support of the Pew Fellows Program in Marine Conservation and Earthtrust. These samples were analysed under the Life project "Protección de Praderas de Posidonia en LICs de Baleares" LIFE 2000/NAT/E/7303 and the project BOS2003-05904 of the Spanish Government (CICYT). We also thank the lab of Molecular Evolution of the Stazione Zoologica and specially the Professor Bernardi for his assistance in the analysis of the Italian samples. Moreover, the analysis of the samples from NE Spain was supported by the "Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya". The study complies with the current laws of Spain and Italy.

References

- Aguilar R, Mas J, Pastor X (1995) Impact of the Spanish swordfish longline fisheries on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* population in the western Mediterranean. In: Richardson JJ, Richardson TH (eds) Proceedings of the 12th annual workshop on sea turtle biology and conservation. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-361, pp 1-6
- Bass AL, Epperly SP, Braun-McNeill J (2004) Multi-year analysis of stock composition of a loggerhead turtle (*Caretta caretta*) foraging habitat using maximum likelihood and Bayesian Methods. *Conserv Genet* 5:783-796
- Bentivegna F (2002) Intra-mediterranean migration of loggerhead sea turtles monitored by satellite telemetry. *Mar Biol* 141:795-800
- Bjorndal KA, Bolten AB, Martins HR (2000) Somatic growth model of juvenile loggerhead sea turtle *Caretta caretta*: duration of pelagic stage. *Mar Ecol Prog Ser* 202:265-272
- Bolten AB (2003) Active swimmers-passive drifters: the oceanic juvenile stage of loggerheads in the Atlantic system. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) Loggerhead sea turtles. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 63-78
- Bolten AB, Bjorndal KA, Martins HR, Dellinger T, Biscoito MJ, Encalada SE, Bowen BW (1998) Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecol Appl* 8:1-7
- Bowen BW, Karl SA (1997) Population genetics, phylogeography, and molecular evolution. In: Lutz PL, Musick JA (eds) The biology of sea turtles. CRC Press, Boca Raton, pp 29-50
- Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen J (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Mol Ecol* 14:2389-2402
- Broderick AC, Glen F, Godely BJ, Hays GC (2002) Estimating the number of green and loggerhead turtles nesting annually in the Mediterranean. *Oryx* 36:227-235
- Cardona L, Revelles M, Carreras C, San Félix M, Gazo M., Aguilar A (2005) Western Mediterranean immature loggerhead turtles: habitat use in spring and summer assessed through satellite tracking and aerial surveys. *Mar Biol* 147:583-591
- Carreras C, Cardona L, Aguilar A (2004) Incidental catch of loggerhead turtles *Caretta caretta* off the Balearic Islands (western Mediterranean). *Biol Conserv* 117:321-329
- Casale P, Laurent L, Gerosa G, Argano R (2002) Molecular evidence of male-biased dispersal in loggerhead turtle juveniles. *J Exp Mar Biol Ecol* 267:139-145

- Crouse DT, Crowder LB, Caswell H (1987) A stage-based population model for loggerhead sea turtles and implications for conservation. *Ecology* 68:1412–1423
- Davenport J, Clough W (1986) Swimming and diving in young loggerhead sea turtles (*Caretta caretta* L.). *Copeia* 1986:53–57
- Ehrhart LM, Ogren H (2000) Estudios en hábitos de alimentación: captura y manejo de tortugas. In: Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois FA, Donnelly M (eds) Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas. Specialist Group on Sea Turtles IUCN/CSE Pub. No 4, pp 70–74
- Ehrhart LM, Bagley DA, Redfoot WE (2003) Loggerhead turtles in the Atlantic Ocean: geographic distribution, abundance and population status. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) Loggerhead sea turtles. Smithsonian Books, Washington DC, pp 157–174
- Encalada SE, Bjorndal KA, Bolten AB, Zurita JC, Schroeder B, Possardt E, Sears CJ, Bowen BW (1998) Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Mar Biol* 130:567–575
- Engstrom TN, Meylan PA, Meylan AB (2002) Origin of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in a tropical developmental habitat in Caribbean Panamá. *Anim Conserv* 5:125–133
- Estrada M, Vives F, Alcaraz M (1985) Life and productivity in the open sea. In: Margalef R (ed) The western Mediterranean. Pergamon Press, London, pp 148–197
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hays GC, Marsh R (1997) Estimating the age of juvenile loggerhead sea turtles in the North Atlantic. *Can J Zool* 75:40–46
- Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155:2011
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17:1244–1245
- Laurent L, Lescure J, Excoffier L, Bowen B, Domingo M, Hadjichristophorous M, Kornaraki L, Trabuchet G (1993) Genetic studies of relationships between Mediterranean and Atlantic populations of loggerhead turtle *Caretta caretta* with a mitochondrial marker. *C r Acad Sci III-Vie* 316:1233–1239
- Laurent L, Casale P, Bradai MN, Godley BJ, Gerosa G, Broderick AC, Schroth W, Schierwater B, Levy AM, Freggi D, Abd El-Mawla EM, Hadoud DA, Gomati HE, Domingo M, Hadjichristophorous M, Kornaraki L, Demirayak F, Gautier CH (1998) Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Mol Ecol* 7:1529–1542
- López-Jurado JL (1990) Masas de agua alrededor de las Islas Baleares. *Bol Inst Esp Ocean* 6:3–20
- Malanotte-Rizzoli P, Manca BB, d'Alcala MR, Theocharis A, Bergamasco A, Bregant D, Budillon G, Civitarese G, Georgopoulos D, Michelato A, Sansone E, Scarazzato P, Souvermezoglou E (1997) A synthesis of the Ionian Sea hydrography, circulation and water mass pathways during POEM Phase 1. *Prog Oceanogr* 39:153–204
- Margaritoulis D, Argano R, Baran I, Bentivegna F, Bradai MN, Camiñas JA, Casales P, De Metrio G, Demetropoulos A, Gerosa G, Godley BJ, Haddoud DA, Houghton J, Laurent L, Lazar B (2003) Loggerhead turtles in the Mediterranean sea: present knowledge and conservation perspectives. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) Loggerhead sea turtles. Smithsonian Books, Washington DC, pp 175–198
- Millot C (1987) Circulation in the western Mediterranean Sea. *Ocean Acta* 10:143–149
- Millot C (2001) Mesoscales and seasonal variabilities of the circulation in the western Mediterranean. *Dynamic Atmos Ocean* 15:179–214
- NMFS-SEFSC (National Marine Fisheries Service–South East Fisheries Science Center) (2001) Stock Assessments of loggerhead and leatherback sea turtles and assessment of the impact of the pelagic longline fishery on the loggerhead and leatherback sea turtles of the western North Atlantic. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, 455, 343pp
- Norman JA, Moritz C, Limpus CJ (1994) Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. *Mol Ecol* 3:363
- Okuyama T, Bolker BM (2004) Combining genetic and ecological data to estimate sea turtle origins. *Ecol Appl* 15:315–325
- Owens D, Ruiz GW (1980) New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica* 1:17–20
- Pella J, Masuda M (2001) Bayesian methods for analysis of stock mixtures from genetic characters. *Fish Bull* 99:151–167
- Pinardi N, Masetti E (2000) Variability of the large-scale general circulation of the Mediterranean sea from observations and modelling: a review. *Palaeogeogr Palaeoclimat Palaeoecol* 158:153–173
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86:248–249
- Rolf DA, Bentzen P (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X2 and the problem of small samples. *Mol Biol Evol* 6:539–545
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496–2497
- Zaykin DV, Pudovkin AI (1993) Two programs to estimate significance of X2 values using pseudo-probability tests. *J Heredity* 84:152

**Artículo 4: Using mtDNA and microsatellites for origin
assessment in marine turtles feeding grounds**

"Una tonelada de ciencia no vale más que una gota de sabiduría".

Pitágoras (570-500 a. C.); filósofo y matemático griego.

Resumen:

Hasta el momento, el ADN mitocondrial ha sido el único marcador genético utilizado para determinar el origen de los individuos de especies amenazadas como la tortuga boba (*Caretta caretta*). Sin embargo, la reciente aparición de nuevos marcadores, como los microsatélites, permite pensar que pueden ser útiles para mejorar este tipos de análisis. Para evaluar la utilidad de estos marcadores, comparamos la eficacia de un marcador de ADN mitocondrial (mtDNA; n=584) y de siete microsatélites (nDNA: n=169) para determinar el origen de los juveniles de tortuga boba que habitan las zonas de alimentación del Mediterráneo occidental y el Atlántico próximo

Ambos marcadores revelaron una profunda estructuración genética (mtDNA, $\gamma_{st}=0.168$, $p<0.001$; nDNA, $F_{st}=0.009$, $p<0.001$) y el Análisis de Agregados Mixtos reveló que los individuos atlánticos usan, principalmente las zonas de alimentación situadas a lo largo de la Corriente Argelina mientras que los individuos mediterráneos habitan aquellas zonas influenciadas por la corriente Liguro-Provenzal a lo largo de la costa europea. Aunque los resultados proporcionados por los dos marcadores fueron muy similares, los microsatélites produjeron unos intervalos de confianza más estrechos. Además, los microsatélites demostraron ser unos marcadores adecuados para realizar asignaciones individuales, ya que la gran mayoría de individuos se asignaron bien a las zonas de nidificación atlánticas o a las mediterráneas. Estas asignaciones individuales no sólo corroboraron los resultados del Análisis de Agregados Mixtos, sino que demostraron la presencia de individuos mediterráneos en el Atlántico.

Estos resultados indican que los microsatélites pueden ser buenos marcadores para complementar los resultados que proporciona el ADN mitocondrial a la vez que abren nuevas interesantes perspectivas de investigación en las zonas de alimentación de la tortuga boba en el Mediterráneo occidental.

Using mtDNA and microsatellites for origin assessment in marine turtles feeding grounds

Carreras, C.^{1,2} Pascual, M.³, Cardona, L.¹ Aguilar, A.¹
Marco A², Rico C², Mons JL⁴, Martín JJ⁴, Tomas J⁵, Raga JA⁵, Fernández, G.⁶ San
Félix M⁷

1 Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avda. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain. carreras@ub.edu

2 Estación Biológica de Doñana-CSIC-Apdo. 1056-E-41013-Sevilla-SPAIN

3 Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avda. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain.

4 CREMA (Centro de Recuperación de Especies Marinas Amenazadas, Aula del Mar de Málaga - Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía) Avda. Manuel Agustín Heredia nº 35, 29001 Málaga, SPAIN

5 Marine Zoology Unit, Cavanilles Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, Apto. 22085, E-46071 Valencia, SPAIN

6 Fundación Marineland, C/Garcilaso de la Vega, 9 E-07181 Costa d'en Blanes, Calvià, Spain

7 Department of Zoology, Faculty of Biology, University of Valencia, C/ Dr. Moliner 50 E -46100 Burjasot (Valencia), Spain

Abstract

We used mitochondrial DNA (mtDNA; n=584) and seven microsatellites (nDNA: n=169) to assess the origin of the juveniles inhabiting several feeding grounds in the western Mediterranean and the eastern Atlantic. Both markers revealed deep genetic structuring within the western Mediterranean (mtDNA, $\gamma_{st}=0.168$, $p<0.001$; nDNA, $F_{st}=0.009$, $p<0.001$) and indicated that Atlantic individuals prevailed in the feeding grounds along the Algerian current whereas Mediterranean individuals prevailed in the feeding grounds influenced by the Liguro-Provençal current along the European shore. Mixed Stock Analysis yielded similar results whatever the marker, but microsatellites assessed the contribution of each nesting sites with narrower confidence intervals. Furthermore, microsatellites proved to be powerful markers that allowed individual assignment either to the Atlantic or Mediterranean populations with a low error. Individual assignment demonstrated that all feeding grounds hosted both Atlantic and Mediterranean specimens and that the contribution of the Mediterranean population to the feeding grounds in the eastern Atlantic is not an artefact of the Mixed Stock Analysis.

Introduction

Most species of marine turtles are listed as endangered or critically endangered (IUCN 2006) and included in international treaties for its protection (Hykle *et al.* 2000). These animals have complex life cycles (Miller 1997), often with long migrations between distant basins (Bolten 2003), and hence conservation strategies should involve several countries and huge marine areas. Often, juveniles from distant populations share common foraging grounds (Laurent *et al.* 1993, 1995 y 1998; Casale *et al.* 2002, Carreras *et al.* 2006c), in some cases under strong fishing pressure or other threads (Aguilar *et al.* 1995; Witzell 1999; Camiñas & Valeiras 2003, Camiñas 1998).

Assessing the contribution of each source population to shared feeding grounds is an essential task to identify the populations most affected by the incidental catch of juveniles. The most popular approach is performing Mixed Stock Analysis, a method developed more than two decades ago (Grant *et al.* 1980) but now improved to incorporate demographic data such as nesting population size and adopt a Bayesian perspective (e.g. Bass *et al.* 2004, Reece *et al.* 2006, Carreras *et al.* 2006c). The only marker used in marine turtles to date has been the control region of the D-loop of the mitochondrial DNA (mtDNA) (e.g. Laurent *et al.* 1993, 1998, Casale *et al.* 1998, Encalada *et al.* 1998). This hypervariable and maternally inherited marker revealed a deep genetic structuring in the nesting beaches of several species of marine turtles, as the females of all them are highly philopatric (Meylan *et al.* 1990, Bowen *et al.* 2005, Carreras *et al.* 2006b). However, in some cases, those differences are due to variations in the frequencies of a few common haplotypes and not due to the presence of exclusive ones (Bowen 2003). For this reason, Mixed Stock Analysis can be hindered by extremely wide confidence intervals and sometimes contribution were detected in cases

that it is evident that doesn't exist (Ergstrom *et al.* 2002). Moreover, individual assignment to any of the source populations is seldom possible, as most of the individuals from shared feeding grounds present widespread haplotypes (e.g. Encalada *et al.*, 1998, Casale *et al.* 2002, Carreras *et al.* 2006c).

Microsatellites are biparentally inherited, highly variable codominant nuclear markers (nDNA) (Selkoe & Toonen 2006) used previously to study male mediated gene flow in marine turtles (e.g. FitzSimmons *et al.* 1997, Roberts *et al.* 2004, Bowen *et al.* 2005, Carreras *et al.* 2006a, 2006b), but not to conduct Mixed Stock Analysis for foraging grounds, to our knowledge. Furthermore, these markers can be used to assess the origin of each individual if several loci are analyzed and the variability of the source populations is high enough (Pritchard *et al.* 2000). The aims of this paper are (1) to test the performance of microsatellites in Mixed Stock Analysis as alternative markers to the control region of the D-loop of the mitochondrial DNA, and (2) to test the reliability of microsatellites for identifying the origin (source population) of individuals from shared feeding grounds.

Material and Methods

A total of 169 samples were collected either from stranded and captured individuals from feeding grounds off south-western Spain (SWS), south-eastern Spain (SES), mid-eastern Spain (MES), Pitiuses (PIT) and Gimnesies (GIM). Samples were collected during consecutive summers from 2002 to 2004. Additionally, published data of mtDNA were obtained from the feeding grounds of the Azores (AZO) and Madeira (MAD) (Bolten *et al.* 1998), Lampedusa (LAM) (Casale *et al.* 2002), E Italy (EIT), W Italy (WIT) and NE Spain (NES) (Carreras *et al.* 2006c) (Figure 1, Table 1).

Live animals were caught accidentally by fishermen or collected by scuba divers while the turtles were basking (Ehrhart & Ogren 2000). All living turtles were tagged with metal flipper tags or subcutaneous PIT tags before release to avoid pseudoreplication. Furthermore independency of samples can be assumed considering the size of the involved populations (Ehrhart *et al.* 2003; Margaritoulis *et al.* 2003), the high mortality of turtles before they reach the size of the sampled individuals (Crouse *et al.* 1987) and the long distance between the putative nesting areas and the sampled sites.

Blood was taken from the dorsal cervical sinus of live turtles (Owens and Ruiz 1980) and stored at -20°C . Muscle or skin samples were collected from stranded animals and stored in a 20% DMSO NaCl 5M solution, ethanol or at -20°C . Standard Straight Carapace Length (SCL) was measured for each turtle.

Laboratory Methods

DNA was extracted from blood samples using the QIAamp blood mini kit (QIAGEN®), following the manufacturer's instructions. DNA was extracted from tissue using the QIAamp extraction kit (QIAGEN®). A fragment of the D-loop of the

mitochondrial control region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer pairs TCR1-TCR2 following the PCR conditions described elsewhere (Carreras *et al.* 2006c). PCR products were visualized in a 1% agarose gel and purified with the QIAquick kit (QIAGEN®) or Montage PCR (Millipore®). Purified products were sequenced with the BigDye™ Primer Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) and analyzed on an ABI 3700 or ABI 3100 automated DNA Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were aligned using the BioEdit programme version 5.0.9 (Hall 1999) and compared with the previously found haplotypes (Laurent *et al.* 1998, Bolten *et al.* 1998, Encalada *et al.* 1998, Carreras *et al.* 2006b, 2006c), described in the Archie Carr Center of Sea Turtle Research DNA database (<http://accstr.ufl.edu/>). Furthermore, seven previously described microsatellite loci for sea turtles were used in this study: Cm84, Cc117, Cm72 and Ei8 (FitzSimmons *et al.* 1995); Cc141 and Cc7 (Bowen *et al.* 2005); and Ccar176 (Moore and Ball 2002). To improve the amplification reaction and allele sizing, the reverse primer of the locus Ccar176 was redesigned (Carreras *et al.* 2006b). One primer for each pair was fluorescently labeled with NED, PET, VIC or 6-FAM and locus were amplified using the PCR conditions described elsewhere (Carreras *et al.* 2006 b). Allele length was determined on an ABI 3730 or ABI 3100 automated DNA Analyzer (Applied Biosystems). Allele sizes were assigned using the Genemapper package (ABI PRISM® GeneMapper™ Software Version 3.0.).

Data Analysis

Haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) in each feeding ground, as revealed by mtDNA, were calculated using the program DNAsp (Rozas *et al.* 2003). Gene diversity (H_e), heterozygosity (H_o) and the number of alleles (k) in microsatellites were calculated with GENECLASS v2.0 (Piry *et al.* 2004).

We used the Chi-square test (Zaykin & Pudovkin 1993) to check for differences in the frequency of mtDNA haplotypes in the considered feeding grounds. Actual frequencies were compared to the distributions generated by randomizing the sampled individuals among the feeding grounds using Monte-Carlo resampling (Rolf & Bentzen 1989), as implemented in the CHIRXC program (Zaykin & Pudovkin 1993). With this method, haplotypes occurring at low absolute frequencies had not to be grouped. The Snn test (Hudson 2000) was also used, as implemented in DNAsp program version 4.0 (Rozas *et al.* 2003), because it incorporates sequence divergence information to the analysis. Genetic distance (Γ_{st} ; γ_{st} ; Nei 1982) between foraging grounds was also calculated using also the DNAsp programme.

Differentiation tests were conducted for the microsatellites (F_{st}) and linkage disequilibrium between loci pairs was also assessed. P-values for population differentiation were calculated with a Markov chain randomization (Guo & Thompson 1992). Fisher's method, which assumes statistical independence across loci, was used to combine test results for allelic counts among the populations for all seven loci (Raymond & Rousset 1995). Hardy-Weinberg disequilibrium was not assessed, as the units treated here are not populations but feeding aggregations of juveniles, most of them are composed by individuals coming from different populations. All these analysis were done with the aid of Genepop v3.4 (Raymond & Rousset 1995).

Mixed Stock Analysis

The nesting populations that supplied with turtles each of the considered foraging grounds were assessed by means of a Mixed Stock Analysis. The traditional Maximum Likelihood approach has been reported to be biased by the presence of rare haplotypes and alleles, such as singletons or those occurring at frequencies lower than 5%, a shortcoming overcome by Bayesian approaches (Pella & Masuda 2001).

Hierarchical Bayesian models also allow to combine genetic and ecological data, like rookery size, to avoid the over representation of extremely small populations typical of other Bayesian approaches (Okuyama & Bolker 2004). Thus, the program Bayes (Pella & Masuda 2001) was run using the Bayesian model BM2 that weighted the contribution of each rookery by the size of the nesting population and has been proposed to be more accurate (Bass *et al.* 2004, Carreras *et al.* 2006c). The frequencies of mtDNA haplotypes in the Atlantic nesting sites of North-Western Florida (NWFL), South Florida (SFL), North-East Florida and North Carolina (NEFL-NC), Dry Tortugas and Mexico were obtained from Encalada *et al.* (1998) and Bowen *et al.* (2005), while haplotypes frequencies of the Mediterranean nesting sites at Greece, Turkey, Israel and Cyprus were obtained from Laurent *et al.* (1998) and Carreras *et al.* (2006b) (Table 2). Microsatellites allelic frequencies from Mediterranean nesting sites and in a samples of Atlantic individuals from the western Mediterranean – identified by the presence of the haplotype CC-A1- were obtained from Carreras *et al.* (2006a). Nesting population sizes were obtained from Margaritoulis *et al.* (2003) and Ehrhart *et al.* (2003) (Table 2). The Gelman-Rubin shrink factor was used to test for anomalous realizations of the Bayes predictive posterior distribution (Pella and Masuda 2001). Values greater than 1.20 indicated a lack of convergence in the algorithm and the corresponding estimates were considered unreliable. Analysis for mtDNA was also done by grouping the nesting populations in two regions (Atlantic and Mediterranean). Analysis for microsatellites were done considering directly the groups of Atlantic and Mediterranean as Carreras *et al.* (2006a) demonstrated the existence of a deep differentiation between the two groups while no differentiation has been found within Atlantic nesting areas (Bowen *et al.* 2005).

Individual assignments

One of the main shortcomings of mtDNA for identifying the source populations supplying the feeding grounds in the western Mediterranean and the eastern Atlantic is the overwhelming dominance of the CC-A2 haplotype, shared by Atlantic and Mediterranean turtles. Thus, identifying the origin of those specimens is impossible unless other markers are to be used. We used microsatellites for individual assignments using as implemented in the program STRUCTURE v2.1 (Pritchard *et al.* 2000), which implements a Bayesian clustering method that yield a probability for each individual to belong to each putative origin area. As a baseline, we used the dataset produced by Carreras *et al.* (2006a) and hence, each individual will produce a probability to come from either Atlantic or Mediterranean nesting areas. The combined probability is always 1.00, as no other sources are supposed for the Mediterranean. Individuals bearing other haplotypes than CC-A1, that are exclusive of certain nesting areas but occur at low frequency, were also included in the analysis to assess assignation reliability.

Finally, one-way ANOVA, followed by a *post-hoc* Student-Newman-Keuls test, was conducted to test for the existence of differences in the average straight carapace length (SCL) of the loggerhead sea turtles from the eight foraging grounds sampled in the present study. SCL data of Madeira, the Azores and Lampedusa were not included in this analysis, as data were not available from the reference sources.

Results

A total of 24 haplotypes were reported in the western Mediterranean and the eastern Atlantic feeding grounds here considered (Table 1).

Genetic diversity, as revealed by mtDNA, was highly variable and nucleotidic diversity ranged from $\pi=0,0238$ (Azores) to $\pi=0,0037$ (Eastern Italy). while haplotype diversity ranged from $h=0,668$ (SW Spain) to $h=0,260$ (Eastern Italy). The range of genetic variability across feeding grounds, as revealed by nDNA, was not so high, as the proportion of heterozygotes ranged from $H_o=0,605$ (ME Spain) to $H_o=0,724$ (SW Spain) and gene diversity ranged from $H_e=692$ (ME Spain) to $H_e = 0,744$ (SW Spain) (Table 3).

The mtDNA revealed a deep heterogeneity among the 11 feeding grounds considered ($\gamma_{st}=0.166$; Chi-square and Snn tests; $p<0.001$). Differences still remained significant after the removal of the distant Atlantic feeding ground off the Azores and Madeira ($\gamma_{st}=0.168$; Chi-square and Snn test; $p<0.001$), demonstrating a deep genetic structuring also within the western Mediterranean and the adjoining Atlantic (SW Spain). Pairwise comparisons (Table 4) revealed at least two different clusters, one including the feeding grounds of Azores, Madeira, SW and SE Spain and Gimnesies, and the other including the feeding grounds of E and W Italy, and NE Spain. Haplotype CC-A1, exclusive from the Atlantic nesting areas, prevailed in the feeding grounds of the former group, whereas haplotype CC-A2, shared by Atlantic and the Mediterranean nesting areas, prevailed in the latter. The feeding grounds off Pitiüses, Lampedusa and ME Spain were in an intermediate position, thus reflecting the clinal variation in the frequency of haplotypes CC-A1 and CC-A2 (Table 1).

Microsatellite data are missing for some feeding grounds, but F_{st} values supported the existence of a deep heterogeneity within the western Mediterranean and adjoining Atlantic feeding grounds ($F_{st}=0.009$; Chi square; $p<0.001$). The results of pairwise comparisons agreed with those provided by mtDNA, as SW Spain, SE Spain and Gimnesies clustered and were different either from Pitiüses or ME Spain (Table 4). However, the differences obtained either from mtDNA or nDNA do not reflect a simple geographic pattern as, for instance, Gimnesies were not different from the distant Azores using mtDNA, while was different from Pitiüses, that are situated 150 km south to the Gimnesies islands using both markers (Figure 1).

Mixed Stock Analysis

A Bayesian Mixed Stock Analysis on the basis of mtDNA data, and considering the size of the nesting populations as a weighting factor, suggests that the contribution of the nesting areas in the eastern Mediterranean and the western Atlantic to the feeding grounds in the western Mediterranean and the adjoining Atlantic is highly variable. Most of them (the Azores, Madeira, SW Spain, SE Spain, Pitiüses and Gimnesies) were inhabited mainly by turtles from the Atlantic nesting areas. The contribution of the Mediterranean nesting beaches was relevant only at those feeding grounds found along the European shore of the Mediterranean (E Italy, W Italy, NE Spain and ME Spain), although that contribution decreased steadily westward (Table 5, Figure 2). Most of the Atlantic turtles came from South Florida and NE Florida-North Carolina, whilst most of the turtles from the Mediterranean nesting beaches came from Greece, Cyprus and Turkey.

A similar weighted Bayesian Mixed Stock Analysis on the basis of microsatellite data yield similar results, as SE Spain, SW Spain, Gimnesies and Pitiüses were

inhabited almost exclusively by Atlantic turtles, whereas ME Spain was inhabited by a mixture of Atlantic and Mediterranean turtles. However, the proportion of individuals from each origin was slightly different from those obtained when using mtDNA data. Furthermore, confidence intervals were smaller for microsatellites (Figure 2).

Individual assignments

The program STRUCTURE assigned most of the turtles to the Atlantic or the Mediterranean population with a high confidence level (Table 6). According to Carreras *et al.* (2006a) individuals with the CC-A1 haplotype come from the Atlantic nesting beaches and were assigned by STRUCTURE to the Atlantic cluster with a probability higher than 90%. Microsatellite based individual assignment of individuals not bearing the CC-A1 haplotype yielded about 50% of assignments with a probability greater than 90%, and about 75% with probability greater than 70% (Table 6). All the individuals exhibiting other exclusive haplotypes were assigned to the corresponding expected cluster or not assigned to any cluster (data not shown).

Individual assignment confirmed the occurrence of both Atlantic and Mediterranean individuals in all the feeding grounds where microsatellite data were available, hence confirming that all those areas hosted a mixture of turtles but in very variable proportions, as already indicated by mixed stock analysis.

Finally, the mean SCL of the turtles was not homogeneous within the eight Mediterranean foraging grounds and the adjoining Atlantic (ANOVA; $df=7$; $F=7.469$ $p<0.001$), as the turtles inhabiting the feeding grounds close to the Sicilian channel (E Italy) and the Strait of Gibraltar (SW Spain and SE Spain) were statistically smaller than those collected in the core of the western Mediterranean (W Italy, the Pitiüses

islands, the Gimnesies islands and ME Spain; Table 1). There only exception was NE Spain, well the western Mediterranean but inhabited by small turtles.

Discussion

The incorporation of mtDNA data from new feeding grounds in the western Mediterranean and the adjoining Atlantic reinforces the hypothesis by Carreras *et al.* (2006c) about the genetic structuring of the feeding grounds of the loggerhead sea turtle in the western Mediterranean. Those authors suggested that western Mediterranean feeding grounds were heterogeneous and that differences in the relative abundance of Atlantic and Mediterranean turtles were due to the complex hydrographic structure of the basin. That hypothesis points out that individuals from the Atlantic nesting areas enter the basin across the Gibraltar strait and remain for most of the time in the southern part of the western Mediterranean, a region known as the Algerian Basin. Conversely, turtles coming from the Mediterranean nesting beaches enter across the Messina Strait and/or the Sicily Channel and move along the northern shore of the basin following the Liguro-Provençal current. That migration pattern produces a cline in the relative abundance of Mediterranean turtles from E Italy to Pitiüses as the distance to the source of Mediterranean turtles decreases and the distance to the source of Atlantic turtles increases. The genetic structure of the new feeding grounds here reported matches that pattern, as SW Spain and SE Spain -located in the entrance of the Mediterranean from the Atlantic- are inhabited by Atlantic individuals whilst ME Spain -influenced by the Liguro-Provençal current but far away from the Sicilian Channel - has a more balanced composition. Furthermore, the occurrence of small (younger turtles) is higher in the foraging grounds close to the Strait of Gibraltar and the Sicilian Channel than anywhere.

Mixed Stock analysis

As little doubt exists about the genetic structuring of the loggerhead sea turtle feeding ground in the western Mediterranean, and the regions is inhabited by specimens from two isolated and highly divergent nesting areas (Carreras *et al.* 2006c), it provides an excellent arena for testing new DNA markers, like the microsatellites. A first advantage of microsatellites, when compared with mtDNA, is a more precise calculation of the contribution of large source area in mixed stock analysis, as both yielded the same average contribution but confidence intervals were narrower when microsatellites were used. However, the lower philopatry of male loggerhead sea turtles when compared with that of females causes a coarse structuring of the nesting beaches in the Mediterranean (Carreras *et al.* 2006b) and no structuring at all in the Atlantic (Bowen *et al.* 2005). As a consequence, microsatellites are useless to assess the contribution of each nesting site, although they are more precise than mtDNA for assessing the contribution of large source areas (Atlantic vs. Mediterranean).

Individual assignments

The second and primary advantage of microsatellite is a dramatic improvement in the possibility of individual assignment to large source areas. Individual assignment on the basis of mtDNA markers is extremely difficult in the Atlantic and the Mediterranean, as the latter was colonised by Atlantic individuals about 12,000 years ago (Bowen *et al.* 1993) and hence, most individuals exhibit shared haplotypes as CC-A2 or CC-A3. Furthermore, the occurrence frequency of exclusive haplotypes is much lower rare in the Mediterranean (Carreras *et al.* 2006b) than in the Atlantic (Bowen *et al.* 2005) nesting beaches, hence biasing the results of assignments in common feeding

grounds. This shortcomings does not exist in the Pacific populations, as all haplotypes are exclusive of certain nesting area (Bowen *et al.* 1995) and, hence, individual assignments in common feeding grounds have been conducted successfully (Polovina *et al.* 2000).

Microsatellites allowed us to overcome that limitation, as 83% of analysed individuals were assigned to the Atlantic or the Mediterranean population with a high confidence level (>70%). The fact that all CC-A1 individuals were correctly reassigned, as well as the individuals bearing other exclusive haplotypes, demonstrates the power of this methodology. Furthermore, 65% of the non assigned individuals (data not shown) were due to problems during amplification, as two or more locus failed to amplify due to the degraded status of the samples.

Individual assignation opens new opportunities for marine turtle research in feeding aggregations of juveniles. Mixed Stock Analysis assumes that all nesting areas are contributing, and hence it is hard to detect no contribution of some nesting areas (Engstrom *et al.* 2002). Individual assignation can detect weak contribution of some nesting areas, as each individual is treated separately. For instance, Mixed Stock Analysis revealed a weak contribution of the Mediterranean nesting areas to SE and SW Spain, to areas mainly inhabited by Atlantic turtles. To ascertain if such a Mediterranean contribution is an artifact of the mixed stock analysis is impossible, individual assignation demonstrated that Mediterranean specimens actually occur there.

Furthermore, individual assignation by means of microsatellites can be incorporated to other studies in order to use the asses the origin of the sampled individuals, hence opening a wide range of new research opportunities. For instance, individual assignments can be combined with satellite telemetry studies, as individuals coming from the Atlantic can behave different than those coming from the

Mediterranean. Pollutant profiles and the isotope signature might also differ in specimens from different areas, hence revealing differences in habitat use or indicating the degree of residence of pollutants acquired in nesting beaches. Evaluation of the impact of fisheries can also include the origin of the individuals, as differences of catch rates or mortality can be found between individuals of both origins.

Acknowledgments

The *Fundació pel Desenvolupament Sostenible* provided logistic support for the fieldwork. This study was funded by the EU project “*Protección de Praderas de Posidonia en LICs de Baleares*” LIFE00NAT/E/7303.

References

- Aguilar R, Mas J, Pastor X (1995) Impact of the Spanish swordfish longline fisheries on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* population in the western Mediterranean. In: Richardson JI, Richardson TH (eds) Proceedings of the 12th Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation . NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-361, pp 1-6
- Bass AL, Epperly SP, Braun-McNeill J (2004) Multi-year analysis of stock composition of a loggerhead turtle (*Caretta caretta*) foraging habitat using maximum likelihood and Bayesian Methods. *Cons. Gen.* 5:783-796
- Bolten AB, Bjorndal KA, Martins HR, Dellinger T, Biscoito MJ, Encalada SE, Bowen BW (1998) Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecol Appl* 8: 1-7
- Bolten AB (2003) Active swimmers-passive drifters: the oceanic juvenile stage of loggerheads in the Atlantic system. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 63–78.
- Bowen BW (2003) What is a loggerhead turtle? The genetic perspective. In: *Loggerhead Sea Turtles*, (eds. Bolten AB, Witherington BE), pp. 7-27.
- Bowen BW, Abreu-Grobois FA, Balazs GH, Kamekazi N, Limpus CJ, Ferl RJ (1995) Trans-Pacific migrations of the loggerhead sea turtle demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 3731-3734.
- Bowen BW, Bass AL, Soares L, Toonen RJ (2005) Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Mol. Ecol.*, **14**, 2389-2402.

- Camiñas JA, Valieras J (2003) Critical areas for loggerhead and leatherback marine turtles in the western Mediterranean sea and the Gibraltar Strait Region. In: Margaritoulis D, Demetropoulos A (eds) Proceedings of the first Mediterranean conference on Marine turtles. Barcelona Convention –Bern Convention-Bonn Convention, Nicosia Cyprus, pp 88-93
- Camiñas JA (1988) Incidental Captures of *Caretta caretta* (L.) with surface long-lines in the Western Mediterranean. Rapports et process-Verbaux des Réunions Condensés des travaux présentés lors du XXXI Congrès Assemblée Plénier. Athènes. Vol.31 (2): 285, V.III4. C.I.E.S.M. Monaco.
- Carreras C, Cardona L, Aguilar A (2004) Incidental catch of loggerhead turtles *Caretta caretta* off the Balearic Islands (western Mediterranean). *Biol Cons* 117: 321–329
- Carreras C, Pascual M, Cardona L, Aguilar A, Marco A, Rico C, Roques S, Bellido JJ, Castillo JJ, Tomas J, Raga JA, SanFélix M, Fernández G, Margaritoulis D, Rees A, Turkozan O, Levy Y, Gasith A, Aureggi M, Khalil M (2006a) DNA microsatellites reveal genetic isolation of the Mediterranean loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). In prep.
- Carreras C, Pascual M, Cardona L, Aguilar A, Margaritoulis D, Rees A, Turkozan O, Levy Y, Gasith A, Aureggi M, Khalil M (2006b) The genetic structure of the Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications. *Conservation Genetics* (in press)
- Carreras C, Pont S, Maffucci F, Pascual M, Barceló A, Bentivegna F, Cardona L, Alegre F, SanFélix M, Fernández G, Aguilar A (2006c) Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns. *Marine Biology* (available online DOI: 10.1007/s00227-006-0282-8).

- Casale P, Laurent L, Gerosa G, Argano R (2002) Molecular evidence of male-biased dispersal in loggerhead turtle juveniles. *J Exp Mar Biol Ecol* 267: 139-145
- Crouse DT, Crowder LB, Caswell H (1987) A stage-based population model for loggerhead sea turtles and implications for conservation. *Ecology* 68: 1412-1423
- Ehrhart LM, Bagley DA, Redfoot WE (2003) Loggerhead turtles in the atlantic ocean: geographic distribution, abundance and population status. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) *Loggerhead Sea Turtles*. Smithsonian Books, Washington D.C., pp. 157-174
- Ehrhart, LM. Ogren H (2000) Estudios en hábitos de alimentación: captura y manejo de tortugas. In: Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois FA, Donnelly M (eds) *Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas*. Specialist Group on Sea Turtles IUCN/CSE Pub. No 4, pp 70-74
- Encalada SE, Bjorndal KA, Bolten AB, Zurita JC, Schroeder B, Possardt E, Sears CJ, Bowen BW (1998) Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Mar Biol* 130: 567-575
- Engstrom TN, Meylan PA, Meylan AB (2002) Origin of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in a tropical developmental habitat in Caribbean Panamá. *Anim Cons* 5: 125-133.
- FitzSimmons NN, Moritz C, Limpus CJ, Pope L, Prince R (1997b) Geographic structure of Mitochondrial and Nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male-biased gene flow. *Genetics*, **147**, 1843-1854.
- FitzSimmons NN, Moritz C, Moore SS (1995) Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol. Biol. Evol.*, **12** (3), 432-440.

- Grant WS, Milner GB, Krasnowski P, Utter FM (1980) Use of biochemical genetic variants for identification of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks in Cook Inlet, Alaska. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, 1236–1247.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361-372.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155: 2011
- Hykle D. (2000) Tratados internacionales de Conservación. In Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservacion de las Tortugas Marinas. (eds. Eckert K.L., Bjorndal K.A., Abreu-Grobois F.A., Donnelly M.)(Traducción al Español) Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No.4
- IUCN (2006). *2004 IUCN Red List of Threatened Species*.
- Laurent L, Casale P, Bradai MN, Godley BJ, Gerosa G, Broderick AC, Schroth W, Schierwater B, Levy AM, Freggi D, Abd El-Mawla EM, Hadoud DA, Gomati HE, Domingo M, Hadjichristophorous M., Kornaraki L, Demirayak F, Gautier, Ch (1998) Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Mol Ecol* 7: 1529-1542.
- Laurent L, Lescure J (1995) Attempt of spatial-temporal pattern distribution of Loggerhead Turtle in the Mediterranean. *Scientia Herpetologica* 324-327.
- Laurent L, Lescure J, Excoffier L, Bowen B, Domingo M, Hadjichristophorous M., Kornaraki L, Trabuchet G (1993) Genetic studies of relationships between Mediterranean and Atlantic populations of loggerhead turtle *Caretta caretta* with a mitochondrial marker. *Cr Acad Sci III-Vie* 316: 1233-1239

- Margaritoulis D, Argano R, Baran I, Bentivegna F, Bradai MN, Camiñas JA, Casales P, De Metrio G, Demetropoulos A, Gerosa G, Godley BJ, Haddoud DA, Houghton J, Laurent L, Lazar B (2003) Loggerhead Turtles in the Mediterranean sea : Present Knowledge and Conservation Perspectives. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) Loggerhead Sea Turtles. Smithsonian Books, Washington D.C., pp. 175-198
- Meylan AB, Bowen BW, Avise JC (1990) A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. *Science*, **248**, 724-727.
- Miller JD (1997) Reproduction in Sea Turtles. in Lutz, P.L. and Musick, J.A. (editors). 1997. The Biology of Sea Turtles 51-82.
- Moore MK, Ball RM (2002) Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a microsatellite analysis. *Mol. Ecol.*, **11**, 281-288.
- Nei M (1982) Evolution of human races at the gene level. In: *Human genetics part A: the unfolding genome* (eds. Bone-Tamir B, Cohen T, Goodman RM) pp 167-181 Alan R Liss New York.
- NMFS-SEFSC (National Marine Fisheries Service- South East Fisheries Science Center) (2001) Stock Assessments of loggerhead and leatherback sea turtles and assessment of the impact of the pelagic longline fishery on the loggerhead and leatherback sea turtles of the western North Atlantic. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, 455, 343pp
- Okuyama T, Bolker B.M (2004) Combining genetic and ecological data to estimate sea turtle origins. *Ecol Appl* 15: 315-325
- Owens D, Ruiz GW (1980) New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica* 1: 17-20
- Pella, J. and Masuda, M. (2001) Bayesian methods for analysis of stock mixtures from genetic characters. *Fish. Bull.* 99:151-167.

- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, *et al.* (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment.
- Polovina JJ, Kobayashi DR, Parker DM, Seki MP, Balazs GH (2000) Turtle on the edge: movement of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along oceanic fronts, spanning longline fishing grounds in the central North Pacific, 1997-1998. *Fisheries Oceanography* 9, 71-82.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered.*, **86**, 248-249.
- Roberts MA, Schwartz TS, Karl S (2004) Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green sea turtle (*Chelonia mydas*): Analysis of microsatellite loci. *Genetics*, **166**, 1857-1870.
- Reece JS, Ehrhart LM, Parkinson CL (2006). Mixed stock analysis of juvenile loggerheads (*Caretta caretta*) in Indian River Lagoon, Florida: implications for conservation planning. *Conservation genetics* 7, 345-352.
- Rolf DA, Bentzen P (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X2 and the problem of small samples. *Mol Biol Evol* 6: 539-545
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, **9**, 615-629.
- Witzell WN (1999) Distribution and relative abundance of sea turtles caught incidentally by the U.S. pelagic longline fleet in the western North Atlantic Ocean, 1992-1995. *Fish. Bull.* 97: 200-211.
- Zaykin DV, Pudovkin AI (1993) Two programs to estimate significance of X2 values using pseudo-probability tests. *J Heredity* 84: 152

Table 1: Foraging grounds, absolute frequencies of haplotypes, average carapace length of the turtles, carapace length range and references.

	CC-A1	CC-A2	CC-A3	CC-A4	CC-A5	CC-A6	CC-A7	CC-A8	CC-A9	CC-A10	CC-A11	CC-A12	CC-A13	CC-A14	CC-A15	CC-A16	CC-A17	CC-A20	CC-A26	CC-A27	CC-A28	CC-A29	CC-A30	CC-A31	CC-A32	TOTAL	SCL (cm)	References
AZO	36	31	5					1				2	2	2	1	1										79	7-66*	Bolten <i>et al.</i> , 1998
MAD	24	19	2						3	1	1	1	1	1			1									52	18-51*	Bolten <i>et al.</i> , 1998
SWS	19	15							2	1	1	1	1	1			1									40	41.4 ^B (16.4)/3-74	Present study
SES	16	15																								31	43.0 ^B (17.5) 21-79	Present study
GJM	16	11	3																	1						31	50.0 ^A (9.6) 32-73	Carreras <i>et al.</i> , 2006c
PIT	9	17			1				1			1	2					1								32	49.6 ^A (9.0) 28-66	Carreras <i>et al.</i> , 2006c
LAM	17	39	3				1		1		1	1	1					2								65	26-55*	Casale <i>et al.</i> , 2002
MES	8	22	1			1	1											2								35	53.8 ^A (10.0) 26-71	Present study
NES	14	81	8		1		1			1								2		2	1	2	1			112	44.1 ^B (14.9) 20-100	Carreras <i>et al.</i> , 2006c
WIT	4	40	3															1						1		49	49.7 ^A (13.7) 25-72	Carreras <i>et al.</i> , 2006c
EIT	2	48	5															1						1	1	58	36.8 ^B (12.5) 16-65	Carreras <i>et al.</i> , 2006c
TOT	165	338	30	2	1	2	1	2	1	4	2	1	4	7	1	1	2	7	7	1	1	2	1	1	2	584		

Length information is given as mean (**bold**), range (*italics*) and standard deviation (**brackets**) of the Straight Carapace Length (SCL) in centimeters. Average length values

with different superscript are statistically different (see text for details). * Data originally collected as Curved Carapace Length (CCL) and transformed to SCL using the

equation $CCL = 1.388 + (1.053) SCL$ (Bjorndal *et al.*, 2000).

Table 2: Source nesting populations used in the Bayesian Mixed Stock Analysis.

	CC-A1	CC-A2	CC-A3	CC-A4	CC-A5	CC-A6	CC-A7	CC-A8	CC-A9	CC-A10	CC-A11	CC-A14	CC-A20	CC-A29	CC-A32	TOTAL	Rookery size
NWFL (A)	38	7	2				2									49	600
SFL (A)	52	45	4		1		3				1	2	1			109	67,100
NEFL-NC (A)	104	1														105	6,200
Dry Tortugas (A)	4	50							2	2						58	217
México (A)		11	2					1	1	5						20	1,800
Greece (M)		54				4									2	81	3,660
Turkey (M)		19	13													32	1,366
Israel (M)	16													3		19	49
Cyprus (M)	35															35	846
Brasil (A)				11												11	2,400
TOTAL	249	187	21	11	1	4	5	1	3	7	1	2	1	3	2		

Mediterranean data (M) from Laurent *et al.* (1998) and Carreras *et al.* (2006b). Atlantic data (A) from Encalada *et al.* (1998) and Bowen *et al.* (2005). Population sizes from Ehrhart *et al.* (2003) and Margaritoulis *et al.* (2003). Population codes as in the text.

Table 3: Genetic variability in the considered feeding grounds as revealed either by mtDNA or nDNA.

	mtDNA			nDNA		
	Haplotypes	π	h	k	H_o	H_e
AZO	7	0,0238	0,631	-	-	-
MAD	7	0,0236	0,617	-	-	-
SWS	8	0,0025	0,668	8,57	0,724	0,744
SES	2	0,0236	0,516	8,43	0,660	0,723
GIM	4	0,0128	0,617	7,00	0,641	0,708
PIT	5	0,0221	0,591	8,86	0,654	0,740
LAM	8	0,0192	0,576	-	-	-
MES	5	0,0174	0,499	8,71	0,605	0,692
NES	5	0,0110	0,393	-	-	-
WIT	4	0,0075	0,301	-	-	-
EIT	4	0,0037	0,260	-	-	-

Number of haplotypes, haplotype diversity (h), nucleotide diversity (π), mean number of alleles (k), mean observed heterozygosity (H_o), mean gene diversity (H_e). (-) No data on nDNA is available for this feeding ground. Acronyms as in Table 1.

Table 4: Pairwise genetic distances between feeding grounds either using mtDNA (γ_{st} ; below the diagonal) on nDNA (F_{st} ; above the diagonal).

	AZO	MAD	SWS	SES	GIM	PIT	LAM	MES	NES	WIT	EIT
AZO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAD	0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SWS	0.003	0.001	-	0.003	0.000	0,008**	-	0,004	-	-	-
SES	0.001	0.000	0.001	-	0,011	0,010**	-	0,022***	-	-	-
GIM	0.001	0.003	0.001	0.001	-	0,017***	-	0,015**	-	-	-
PIT	0.027	0.017	0.039	0.028	0.041 ^{ab}	-	-	0,003**	-	-	-
LAM	0.059 ^a	0.170 ^{ab}	0.073 ^b	0.053 ^b	0.067 ^b	0.006	-	-	-	-	-
MES	0.056 ^b	0.078 ^b	0.100 ^b	0.083 ^b	0.101 ^b	0.017	0.002	-	-	-	-
NES	0.167 ^{ab}	0.151 ^{ab}	0.184 ^{ab}	0.149 ^{ab}	0.168 ^{ab}	0.055 ^{ab}	0.032	0.015	-	-	-
WIT	0.215 ^{ab}	0.170 ^{ab}	0.255 ^{ab}	0.233 ^{ab}	0.256 ^{ab}	0.108 ^{ab}	0.056	0.044 ^b	0.004	-	-
EIT	0.287 ^{ab}	0.231 ^{ab}	0.336 ^{ab}	0.317 ^{ab}	0.340 ^{ab}	0.173 ^{ab}	0.101 ^{ab}	0.092 ^{ab}	0.022	0.010	-

(-) microsatellite data are not available for AZO, MAD, NES, WIT, EIT and LAM. ^a Chi-square ($p < 0.05$);
^b S_{nn} ($p < 0.05$); ** $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Table 5. Estimated contribution of each nesting area (rows) to each feeding ground (columns) based on mtDNA.

	Azores	Madeira	SE Spain	SW Spain	Gimnesies	Pitullises	Lampedusa	ME Spain	NE Spain	W Italy	E Italy
NWFL	0.0043 (0.023)	0.0035 (0.032)	0.0032 (0.027)	0.0043 (0.032)	0.0088 (0.054)	0.0005 (0.007)	0.0005 (0.006)	0.0006 (0.007)	0.0009 (0.008)	0.0004 (0.005)	0.0005 (0.004)
SFL	0.9358 (0.074)	0.8196 (0.1421)	0.9542 (0.087)	0.8347 (0.208)	0.9221 (0.1489)	0.8639 (0.142)	0.7092 (0.181)	0.6511 (0.152)	0.2902 (0.094)	0.2249 (0.112)	0.0844 (0.0612)
NEFL-NC	0.0134 (0.040)	0.0403 (0.085)	0.0262 (0.068)	0.0620 (0.119)	0.0427 (0.0975)	0.0108 (0.034)	0.0068 (0.021)	0.0071 (0.022)	0.0055 (0.016)	0.0064 (0.019)	0.0042 (0.012)
Dry tortugas	0.0004 (0.004)	0.0017 (0.0190)	0.0003 (0.004)	0.0296 (0.096)	0.0001 (0.003)	0.0212 (0.084)	0.1122 (0.1809)	0.0027 (0.024)	0.0819 (0.202)	0.0011 (0.015)	0.0079 (0.061)
Mexico	0.0317 (0.045)	0.1272 (0.088)	0.0017 (0.011)	0.0580 (0.081)	0.0030 (0.019)	0.0603 (0.091)	0.0337 (0.076)	0.0028 (0.015)	0.0295 (0.110)	0.0033 (0.019)	0.0025 (0.018)
Greece	0.0029 (0.012)	0.0040 (0.019)	0.0101 (0.041)	0.0075 (0.029)	0.0051 (0.025)	0.0265 (0.079)	0.0361 (0.097)	0.3230 (0.151)	0.0886 (0.184)	0.6181 (0.2215)	0.5554 (0.2448)
Turkey	0.0099 (0.034)	0.0019 (0.013)	0.0017 (0.012)	0.0005 (0.003)	0.0159 (0.0620)	0.0032 (0.023)	0.0201 (0.063)	0.0046 (0.024)	0.1611 (0.159)	0.0723 (0.128)	0.2601 (0.181)
Brazil	0.0006 (0.003)	0.0006 (0.004)	0.0009 (0.005)	0.0008 (0.005)	0.0012 (0.007)	0.0010 (0.006)	0.0006 (0.003)	0.0010 (0.006)	0.0003 (0.002)	0.0007 (0.004)	0.0006 (0.003)
Cyprus	0.0010 (0.008)	0.0010 (0.009)	0.0017 (0.012)	0.0026 (0.021)	0.0008 (0.008)	0.0126 (0.051)	0.0808 (0.155)	0.0065 (0.042)	0.3242 (0.279)	0.0727 (0.1845)	0.0844 (0.226)
Israel	0.0000 (0.000)	0.0000 (0.001)	0.0000 (0.000)	0.0000 (0.000)	0.0003 (0.006)	0.0000 (0.000)	0.0000 (0.000)	0.0005 (0.010)	0.0177 (0.106)	0.0000 (0.001)	0.0000 (0.001)

Shown results correspond to the model BM2 where contribution is weighted by nesting population sizes. Standard error is given in parenthesis.

Table 6: Results of the individual assignment of turtles not bearing the CC-A1 haplotype (n).

	n	Atlantic		Unknown	Mediterranean		CC-A1	Total
		p>90%	90%>p>70%		90%>p>70%	p>90%		
SWS	21	8	4	5	0	4	19	40
SES	15	6	3	4	1	1	16	31
GIM	15	5	1	5	1	3	16	31
PIT	23	6	8	7	0	2	9	32
MES	27	4	1	7	4	11	8	35
TOT	101	29	17	28	6	21	68	169

Each individual not bearing CC-A1 haplotype has a probability to be Atlantic or Mediterranean and hence each individual is categorised as: Atlantic with probability higher than 90%, Atlantic with a probability between 70% and 90%, Unknown, Mediterranean with a probability between 70% and 90%, and Mediterranean with a probability higher than 90%. (CC-A1) number of individuals bearing the haplotype CC-A1 (Carreras *et al.* 2006a, 2006c) and the total of samples from each feeding ground.

Figure 1: Location of the feeding grounds considered in the present study. Acronyms as in Table 1.

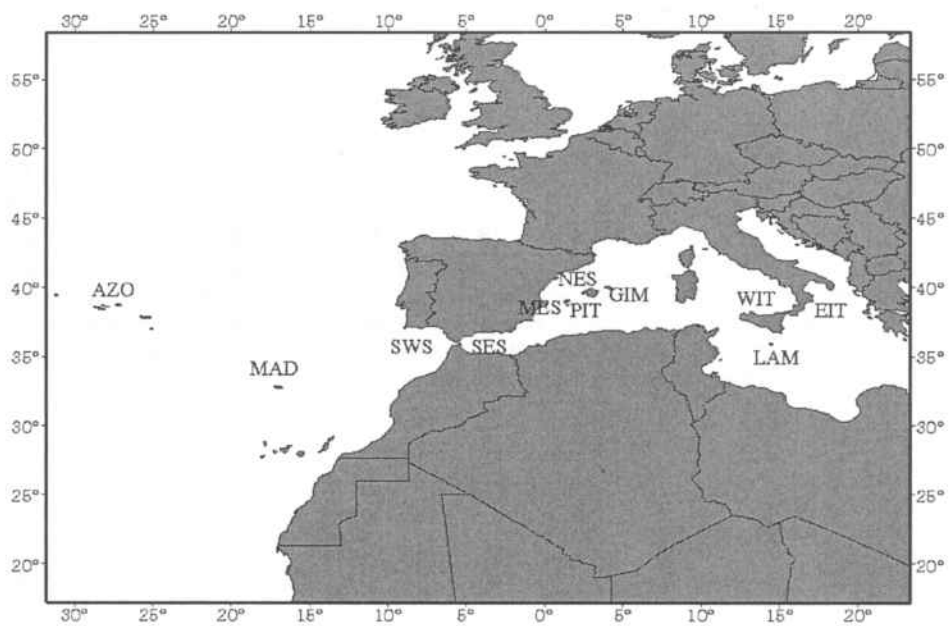
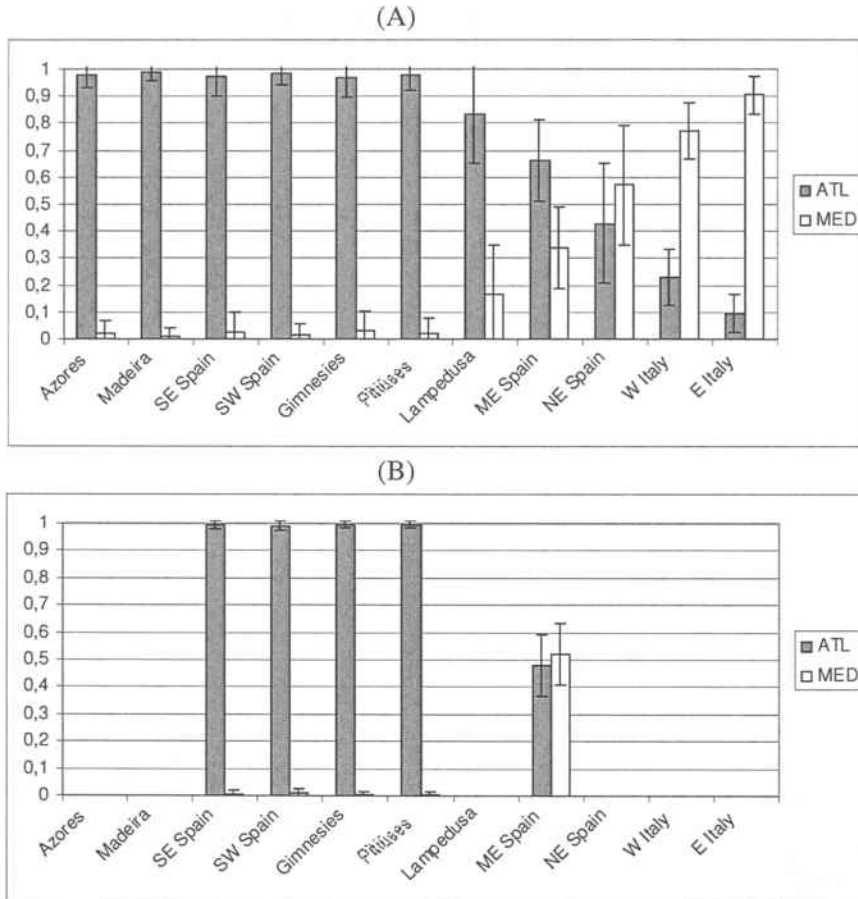


Figure 2: Proportion of individuals that came from the Atlantic (ATL) or the Mediterranean (MED) nesting populations using Mixed Stock Analysis under BM2 model. (A) Using mtDNA; (B) Using microsatellites.



Artículo 5: Western Mediterranean Immature loggerhead turtles: habitat use in spring and summer assessed through Satellite tracking and aerial surveys.

"El sabio sabe que ignora".

Confucio (551-479 a. C.); filósofo chino

Resumen:

Se realizó un censo aéreo al principio de la primavera del 2002 sobre la plataforma continental del Archipiélago Balear para estudiar la distribución de la tortuga boba en aguas costeras. Además, se colocaron emisores para telemetría por satélite a cinco tortugas (Longitud Recta del Caparazón (SCL) entre 37,1-48,7 cm), que se siguieron durante el año 2003 para estudiar el uso de hábitat a una escala geográfica mayor. La distribución de las tortugas sobre la plataforma continental se correspondió con la disponibilidad de hábitat, definido por la profundidad. Sin embargo, los animales seguidos por satélite pasaron la mayor parte del tiempo en aguas oceánicas de la cuenca Argelina y generalmente evitaron las áreas de plataforma continental. En esas tortugas, la velocidad media de viaje y la media del coseno del ángulo de giro no difirieron significativamente entre hábitats, indicando que el rechazo de las áreas de plataforma no es debida a selección de hábitat. Las tortugas marcadas gastaron, de media, un $35,1 \pm 19,7\%$ del tiempo en la superficie, aunque el tiempo en superficie fue mucho mayor en la tortuga más pequeña, sugiriendo que este individuo tiene una limitada capacidad de natación. Como conclusión podemos decir que posiblemente la transición entre deriva pasiva y natación activa se produce en torno a los 40 cm de longitud (SCL). Las rutas seguidas por las tortugas coincidieron con las corrientes predominantes, pero en ocasiones también nadaron contracorriente. Así pues, la distribución de los juveniles de tortugas en el sur y centro del Mediterráneo occidental reflejaría una combinación de deriva pasiva y natación.

L. Cardona · M. Revelles · C. Carreras · M. San Félix
M. Gazo · A. Aguilar

Western Mediterranean immature loggerhead turtles: habitat use in spring and summer assessed through satellite tracking and aerial surveys

Received: 14 October 2004 / Accepted: 2 February 2005 / Published online: 19 May 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract An aerial survey was conducted in early spring 2002 over the continental shelf of the Balearic Archipelago to study the distribution of neritic loggerhead turtles. Furthermore, five juvenile loggerhead turtles [straight carapace length (SCL) range 37.1–48.7 cm], were instrumented with transmitters and monitored during 2003 by satellite tracking to study habitat use over a broader geographical range. The distribution of the turtles over the continental shelf matched habitat availability, as defined by depth. However, those tracked by satellite spent most of the time in the oceanic waters of the Algerian basin and generally avoided continental shelf areas. In these turtles, average speed of travel and mean cosine of turning angle did not significantly differ between habitats, indicating that avoidance of shelf areas is not due to active habitat selection. On average, tracked turtles spent $35.1 \pm 19.7\%$ of the time at the surface, although surface time was much greater in the turtle with the shortest carapace length, suggesting that this individual had limited swimming capacity. We conclude that the transition between passive drifting and active habitat selection occurs at an SCL of about 40 cm. The turtles followed tracks that matched prevailing currents, but on some occasions they also swam upstream. Hence, the distribution of late juvenile log-

gerhead turtles in the southern and central western Mediterranean may reflect a combination of passive drifting and active habitat selection.

Introduction

The lifecycle of sea turtles is fundamentally influenced by marine currents at all ontogenic stages (Luschi et al. 2003a). The loggerhead turtle *Caretta caretta* is widely distributed in the subtropical regions of all oceans (Pritchard 1997). Juveniles have an oceanic distribution but move to neritic habitats before sexual maturation, whereas adults migrate periodically between neritic foraging sites and rookeries (Bolten 2003). The western Mediterranean is an important feeding ground for juvenile loggerhead turtles from rookeries located in two areas: the eastern Mediterranean and the north-western Atlantic (Laurent et al. 1998). Although population size in the western Mediterranean is unknown, a recent survey calculated that 29,000 loggerhead turtles were caught accidentally by fishing operations in 2000 (Camiñas and Valeiras 2003). This figure indicates that interaction with fisheries is a major threat for the species in this area (Carreras et al. 2004). Detailed information about habitat use by the loggerhead turtles subject to this catch is urgently required to regulate fisheries and to reduce their impact on this species (Polovina et al. 2000, 2002).

The distribution of hatchlings and early juveniles is considered the consequence of passive drifting along prevailing currents (Milsom 1975; Davenport and Clough 1986; Hays and Marsh 1997; Witherington 2002), although active swimming has also been recorded (Bolten 2003). Adults, on the other hand, are vigorous swimmers and their distribution reflects active habitat selection (Sakamoto et al. 1997; Godley et al. 2003; Luschi et al. 2003b). The transition between the juvenile oceanic stage, where passive drifting prevails, and the immature-adult neritic stage, where active swimming

Communicated by O. Kinne, Oldendorf/Luhe

L. Cardona (✉) · M. Revelles · C. Carreras · M. Gazo
A. Aguilar
Department of Animal Biology, Faculty of Biology,
University of Barcelona, Avda. Diagonal 645,
08028 Barcelona, Spain
E-mail: cardona@porthos.bio.ub.es
Tel.: +34-93-4021453
Fax: +34-93-4034426

M. San Félix
Department of Zoology, Faculty of Biology,
University of Valencia, C/ Dr. Moliner 50,
46100 Burjasot (Valencia), Spain

Present address: M. Gazo
CRAM, Camí Ral 239, 08330
Premià de Mar (Barcelona), Spain

dominates, occurs when individuals reach a straight carapace length (SCL) of 40–60 cm (Bolten 2003). Specimens in this size range are competent swimmers, can travel against weak currents (Wyneken 1997; Dellinger and Freitas 1999; Polovina et al. 2000), and may exhibit strong homing behaviour (Renaud and Carpenter 1994; Avens et al. 2003).

Specimens in the western Mediterranean are within this size range (Mayol et al. 1988) and hence might be in a transitional stage between passive drifting and active habitat selection. Unfortunately, current information about habitat use by juvenile and immature loggerhead turtles in the western Mediterranean is scarce and based only on the incidental catch of long-liners (Camiñas and de la Serna 1995; Camiñas and Valeiras 2003). As the fishing fleet does not target turtles, the fleet is not sampling all the habitat types that might be exploited by turtles and hence these data are strongly biased. Furthermore, turtles are more vulnerable to long-liners targeting small tuna species than to those targeting swordfish and larger tuna species (Camiñas et al. 2003). The aims of this article are (1) to describe the patterns of habitat use by loggerhead turtles in the western Mediterranean and (2) to investigate whether turtles use habitat types in agreement with availability (passive habitat selection) or concentrate in some habitat types (active habitat selection).

Materials and methods

Aerial surveys

An aerial survey was conducted off the Balearic Archipelago from 7 to 12 March 2002. The transect followed a systematic saw-tooth pattern, with a maximal perpendicular distance to the coastline of 20 nautical miles (36 km), thereby limiting the survey to the continental shelf (depth < 200 m) (Fig. 1).

The survey was carried out by two observers from a high-wing aircraft (Cessna 172) that allowed side viewing. Survey altitude was maintained at 500 feet, and transects were flown at a groundspeed ranging between 140 and 156 km h⁻¹. Six days were needed to survey the considered area, because bad weather is thought to reduce possible sightings and thus surveys were conducted only in Beaufort (wind scale) < 3. Each area was surveyed only once.

Once a turtle was observed, the location of the plane (obtained from a global position system, GPS) and the vertical angle of the sighting line (obtained from an inclinometer) were recorded. This angle was then used to calculate the perpendicular distance from the turtle to the survey transect. Turtles located more than 200 m beyond the survey track were not considered. Sightability is invariant when the probability of seeing a turtle (or any other object) does not change with distance. In aerial surveys, sightability is thought to decrease for objects located 200 m or more away (Marsh and Sinclair

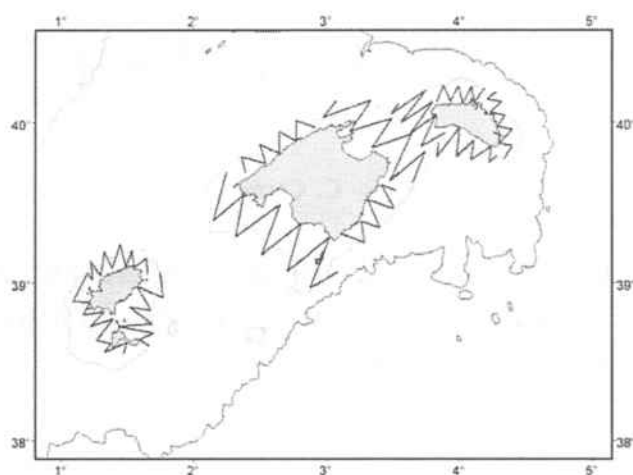


Fig. 1 Line transects for the aerial surveys conducted in March 2002 over the continental shelf of the Balearic Archipelago. The light grey contour refers to the 200-m isobath and the black contour to the 1,400 isobath

1989; Marsh and Saalfeld 1990; Preen et al. 1997). The aircraft did not have a glass floor; consequently, a band from 0 to 20° was missing on each side, thus reducing the survey strip to 145 m at each side of the plane. The surface covered by the survey was calculated as the distance flown multiplied by twice the survey strip. An ArcView 3.1 geographic information system (GIS) was also used to assess the depth of the water column beneath the turtle at each position.

Satellite tracking

Telonics ST-18 satellite transmitters (referred to as tags) were attached to five juvenile loggerhead turtles collected in April 2003 off the island of Formentera (Balearic Archipelago, western Mediterranean). These instrumented individuals were located while basking over the continental shelf in areas shallower than 200 m. They were then caught by a diver and transferred to land to attach the tag. Average SCL was 41.36 cm (range 37.1–48.7 cm), which is slightly shorter than the average for the turtles by-caught in the area by long-liner (50.21 cm SCL; Mayol et al. 1988). In addition to location, the transmitters provided information on surfacing behaviour as they were equipped with a counter that activated when the top of the tag was exposed to the air. The tags weighed 275 g (< 3% of the turtle's approximate weight) and measured 14×4.8×2.3 cm. Tagging procedures were as described by Balazs et al. (1996). After tagging, turtles were placed in 400-l fibre-glass containers with seawater for at least 24 h to ensure that attachment was correct. Animals were released at the same site where they had been caught, which was determined using GPS.

Tag duty cycles (hours on/off) were 8/24. Position data were received and processed by Service Argos

(Argos 2000). Argos assigns a quality index (location class, or LC) to each location. The estimated accuracy in latitude and longitude was < 150 m for LC 3, between 150 and 350 m for LC 2, between 350 and 1,000 m for LC 1, and > 1,000 m for LC 0. Argos does not provide an accuracy estimate for LC A, LC B, and LC Z but Hays et al. (2001) demonstrated that LC A is as accurate as LC 1, and more reliable than LC 0 or LC B. The accuracy of the five units used in the present study was assessed by comparing the positional data supplied by them before being deployed with those supplied by a GPS. Table 1 gives details on the performance of the transmitters used, the total number of locations of each of the Argos classes, and the number of locations monitored (see below).

Correlated random walks provide the conceptual framework for quantifying the movement of individual organisms and for relating movement patterns to the distribution of the organism (Turchin 1991). Although turtles may have moved continuously, satellite tracking supplied only a limited number of fixes and the actual paths were reconstructed by connecting the successive fixes with straight lines. Positional data were screened to select the "high-quality" fix (positional accuracy less than 1 km, that is, LC 3-1 and A and velocity lower than 5 km h⁻¹; Luschi et al. 1998; Argos 2000; Hays et al. 2001) within each 32-h duty cycle, although an occasional fix with a lower accuracy was used when there were multiple days without "high-quality" (LC 3-1 or A) data and the velocity to and from the low-accuracy fix was < 5 km h⁻¹ (Luschi et al. 1998). Inland locations were never used. Once data had been screened, each path was reconstructed using GIS to recreate the straight path between successive positions. The velocity, direction, and turning angle, that is, direction of the current heading measured relative to the direction of the previous heading, were calculated for each movement.

GIS was also used to assess the depth of the water column at each turtle position, from a bathymetric dataset with a resolution of 1'x1' (latitude x longitude; Smith and Sandwell 1997). A depth scale, coarser than that used to analyse the aerial surveys, was used to classify fixes by bathymetric domain: neritic when shallower than 200 m, on the slope when between 200 and 1,400 m, and oceanic when deeper than 1,400 m. The maximum diving depth reported in loggerhead turtles is 233 m (Lutcavage and Lutz 1997); therefore, individuals

may reach the sea floor only while on the continental shelf (neritic habitat). The continental slope and the open oceanic waters were considered as distinct habitats because they are characterised by water masses of water different in productivity, origin, and stability (Pinot et al. 1994; Estrada 1996). GIS was also used to calculate areal extent of the surface of each bathymetric domain in the two regions exploited by the tagged turtles: the Algerian basin and the Balearic sea.

Time data were classified into three categories for analysis: morning (from sunrise to noon), afternoon (from noon to sunset), and night (from sunset to sunrise). For the whole study period, sunrise ranged from 05:22 to 04:34 GMT and sunset from 18:11 to 19:06, in agreement with the data supplied by the Balearic Island Meteorological Station (Carreras, personal communication). Each fix was classified as morning, afternoon, or night and a track may expand over these three categories.

Statistics

Two independent analyses of habitat use were performed. The continental shelf around the Balearic Archipelago, covered by the aerial surveys, was divided into three bathymetric domains in agreement with water depth: < 50 m, 50-100 m, > 100-200 m. The region exploited by the satellite-tracked turtles was divided into three habitat types: continental shelf (< 200 m), continental slope (200-1,400 m), and oceanic waters (> 1,400 m). For both analyses, the chi-square test (Zar 1984) was used to check whether habitat use matched habitat availability. Habitat availability was quantified as percent areal extent using GIS. Habitat use was computed as the frequency of sightings/fixes from each habitat type.

When the chi-square test detected that habitat use did not match availability, Ivlev's electivity index (Ivlev 1961, quoted by Crowder 1990) was calculated to identify the habitat type in which turtle occurrence was higher or lower than expected. Ivlev's index (*I*) was calculated for each bathymetric domain as

$$I = (p_o - p_e)/(p_o + p_e)$$

where *p_o* is the observed percentage of fixes recorded in a given habitat and *p_e* is the proportional cover of that

Table 1 Tracking performance of the five tagged loggerhead turtles

Specimen number	Fixes	Proportion of messages by location class (%)						Tracking period	
		3	2	1	0	A	B	Months	Days
103	248	6.0	21.0	23.0	5.7	16.5	23.8	April-June	62
203	613	4.9	13.1	15.7	10.0	22.0	34.4	April-September	159
303	310	9.4	15.2	18.4	8.1	24.5	24.5	April-July	75
403	309	7.4	12.3	24.0	11.7	17.5	27.2	April-July	80
503	135	9.0	17.0	15.0	8.1	20.0	29.6	April-June	48
All	1,615	6.8	14.9	18.9	9.7	20.6	29.1	April-September	424

habitat. Confidence intervals were calculated following Strauss (1979) as

$$E_c = \left(2 - \left(\frac{2p_c}{(p_o + p_o)} \right) \right) \times \left[1 \pm 1.96 \sqrt{ \left[2n_o * p_o * (1 - p_o) * (p_o + p_c)^2 + p_o * (1 - p_o) * n_c + p_c * \frac{(1 - p_c)}{n_o n_c (p_o + p_c)^2} \right] } \right] - 1$$

where E_c is the limit of the confidence interval, n_o is the number of fixes, and n_c is the total number of depth points used to generate the bathymetric chart in the GIS (Smith and Sandwell 1997).

Uniformity of bearing angles and turning angles for each turtle was checked with the Rayleigh test (Zar 1984) and the mean angles were computed in agreement with Zar (1984). Spearman rank correlation coefficient (Zar 1984) was calculated to test whether the absolute value of turning angle and the movement rate were correlated. Two-way analysis of variance (ANOVA; Zar 1984) was used to assess whether individual turtles (factor 1) and bathymetric domain (factor 2) influenced speed of travel and cosine of turning angle. As the data were not normally distributed, the Kruskal–Wallis test (Zar 1984) was used to assess differences in the time spent at the surface in the distinct day intervals: morning, afternoon, and night.

Results

The aerial survey covered 477.01 km² or 6.14% of the total surface of the continental shelf of the Balearic archipelago (7,773.7 km²). Most turtles were observed in areas of intermediate depth (Table 2), but this was also the most abundant habitat type and hence habitat use matched availability ($\chi^2 = 3.064$; $df = 2$; $P = 0.081$).

The five turtles with satellite tags were released from 8 to 26 April 2003 (Table 1). The tracking period lasted from 48 to 159 days, with an average of 84.8 ± 38.7 days. Good-quality fixes were obtained from all the animals (Table 1), although roughly half the duty cycles failed to produce good-quality fixes (52.2% for turtle no. 103, 50.0% for turtle no. 203, 56.3% for turtle no. 303, 39.4% for turtle no. 403, and 51.64% for turtle no. 503). Thereby the routes followed by the turtles were reconstructed using only the best fix for each duty cycle that fulfilled the requirements stated above (Table 2 and

Table 2 Habitat availability on the section of the continental shelf of the Balearic Archipelago covered by the aerial survey and loggerhead turtles distribution ($\chi^2 = 3.064$; $df = 2$; $P = 0.081$)

Habitat type	Searched area (km ²)	Observed turtles
Depth < 50 m	73.09	6
Depth from 50 to 100 m	202.60	13
Depth from > 100 to 200 m	150.92	3

Fig. 2). Turtles spent most of the time in the oceanic waters of the Algerian basin, and only one (203) re-

mained for a significant period in the Balearic sea after release (Fig. 2).

The bearing angles of turtles 103, 203, and 503 did not distribute evenly, but concentrated in the second quadrant (Table 3); that is, the general direction of movement was towards the south-east. However, the routes followed varied greatly. Turtle 103 swam eastwards immediately after release, then turned southwards, but resumed the eastwards movement when approaching the shores of northern Africa. After a few days of swimming parallel to the coastline, it moved offshore and turned westwards. The route of turtle 203 was more complex. After being released, it moved towards the Iberian Peninsula and then southwards, but after a few days turned northwards and swam along the western slope of the Balearic Archipelago. When it reached the north of Mallorca, it turned westwards and then southwards, returning to the release point; then, the route became similar to that of turtle 103, although more convoluted. The route of turtle 403 was similar to the second half of that followed by turtle 203, that is, southwards to the shores of northern Africa and then eastwards close to the coastline, until it moved offshore and described a small anticyclonic gyre; however, as this turtle moved several times northwards and southwards before reaching the shores of northern Africa, the distribution of the bearing angles did not differ from that expected by chance (Table 3). For the first days, the route of turtle 503 resembled that of 203, that is, it approached the Iberian Peninsula and then swam southwards; however, it showed half a cyclonic gyre, with a radius of 147 km. Finally, the route followed by turtle 303 was similar to that of 503, although the gyre was almost completed and hence the bearing angles distributed randomly (Table 3); the diameter of the gyre was 195 km.

Turning angles were not randomly distributed for any of the five turtles tracked (Table 3). Turtles 103 and 303 turned slightly to the left more often than expected, whereas the opposite was true for 203, 403, and 503. The absolute values of the turning angles and the speed of travel were negatively correlated for turtles 303 (Spearman $\rho = -0.298$; $P = 0.034$; $n = 51$), 505 (Spearman $\rho = -0.460$; $P = 0.018$; $n = 26$), 103 (Spearman $\rho = -0.378$;

Fig. 2 Turtle tracks (panels 103 to 503) and prevailing currents in agreement with Millot (1987) (bottom-right panel). The light grey contour refers to the 200-m isobath and the black contour to the 1,400 isobath

$P=0.015$; $n=41$), and 203 (Spearman $\rho=-0.222$; $\rho=0.021$; $n=108$), but not for turtle 403 (Spearman $\rho=-0.080$; $P=0.570$; $n=53$).

None of the five turtles used the three considered bathymetric domains in accordance with their availability (Table 4). Four strongly avoided the continental shelf (Table 4) and the electivity values for slope and

oceanic waters ranged from slightly positive to slightly negative. However, neither individual turtle nor bathymetric domain had significant effects on average speed of travel (two-way ANOVA; $F=1.481$; $df=12$; $P=0.131$; Table 5) or mean cosine of turning angle (two-way ANOVA; $F=0.330$; $df=12$; $P=0.0983$; Table 5).

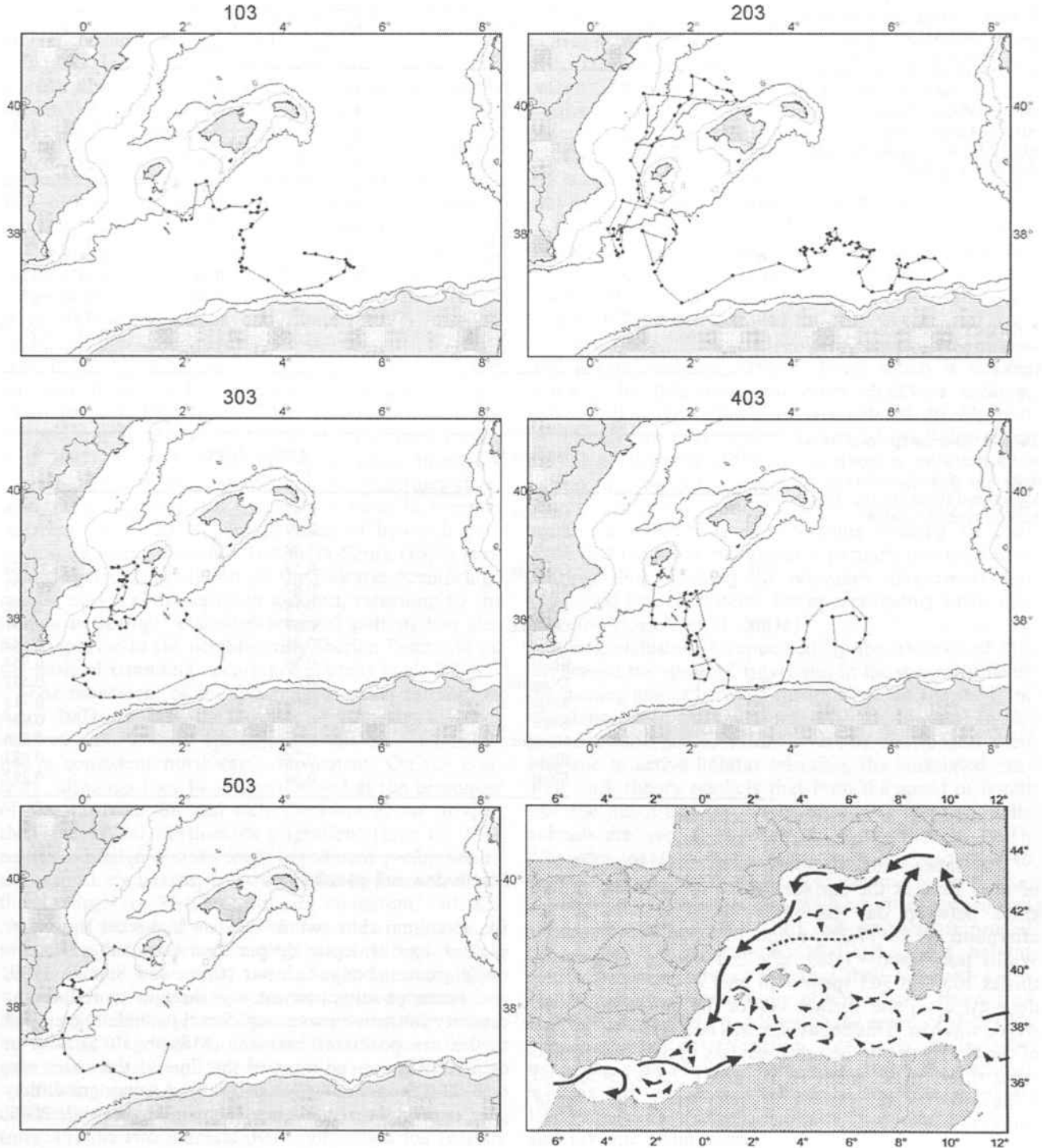


Table 3 Average bearing and turning angles of the five loggerhead turtles tracked

Specimen	Number of moves	Average bearing of move	Direction	Rayleigh's <i>z</i>	Average turning angle	Rayleigh's <i>z</i>
103	42	146.88	SE	4.529*	353.20	3.908*
203	109	97.26	SE	4.115*	14.93	20.86***
303	50	205.756	SW	1.970	355.988	17.221***
403	54	104.14	SE	1.938	10.35	17.59***
503	27	163.127	SE	4.087*	4.832	5.285**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;
 *** $P < 0.001$

Table 4 Habitat use by the five tracked loggerhead turtles and Ivlev's electivity. Habitat availability within the regions visited by the turtles (Fig. 1) was as follows: oceanic 307,574.4 km², slope 94,972.1 km², and continental shelf 66,741.2 km²

Turtle	Chi-square statistic	Habitat type	Number of fixes	Ivlev's electivity	95% CI
103	7.01***	Oceanic	38	0.15	0.23, 0.06
		Slope	4	-0.37	-0.18, -0.56
		Shelf	1	-0.72	-0.64, -0.80
203	12.13***	Oceanic	86	0.09	0.16, 0.01
		Slope	22	-0.01	0.18, -0.19
		Shelf	2	-0.77	-0.74, -0.81
303	6.72***	Oceanic	28	-0.11	0.0006, -0.22
		Slope	22	0.34	0.64, 0.05
		Shelf	3	-0.43	-0.25, -0.61
403	4.6*	Oceanic	44	0.10	0.19, 0.01
		Slope	9	-0.11	0.14, -0.35
		Shelf	2	-0.59	-0.48, -0.71
503	6.62***	Oceanic	10	-0.29	-0.17, -0.42
		Slope	7	0.11	0.50, -0.29
		Shelf	11	0.47	0.97, -0.03

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;
 *** $P < 0.001$; $df = 2$ for all the turtles

Table 5 Average speed of travel and mean cosine of turning angle (ψ) of the five tracked loggerhead turtles in the three habitat types available

Turtle	Habitat type	Speed of travel (m s ⁻¹)	ψ
103	Oceanic	0.47	0.995
	Slope	0.79	0.589
	Shelf	1.08	-
203	Oceanic	0.55	0.333
	Slope	0.82	0.779
	Shelf	0.78	0.586
303	Oceanic	0.67	0.567
	Slope	0.44	0.543
	Shelf	0.39	0.954
403	Oceanic	0.61	0.532
	Slope	0.62	0.712
	Shelf	0.33	0.931
503	Oceanic	0.77	0.666
	Slope	0.74	0.597
	Shelf	0.38	0.292

The tracked animals spent on average $35.1 \pm 19.7\%$ of their time at the surface, with no significant differences between day periods (morning: $31.5 \pm 24.6\%$; afternoon: $39.2 \pm 17.3\%$; night: $34.9 \pm 20.4\%$; Kruskal-Wallis test; $H_{stat} = 1.289$; $df = 2$; $P = 0.525$). However, turtles 103 and 503 spent 98.8 and 93.0% of their last duty cycle on the surface before the connection with Argos was lost. This behaviour was not exhibited by any of the five turtles in the previous duty cycles. Indeed, the other three turtles spent 18.6% (203), 7.3% (303), and 3.9% (403) of the last duty cycle before the loss of connection with Argos on the surface.

Discussion and conclusions

In an animal that swims, drag is higher at the water surface than at depths deeper than three times the animal's greatest body diameter (Berta and Sumich 1999) and hence positive buoyancy is thought to reduce the capacity for active swimming. Small juvenile loggerhead turtles are positively buoyant (Milsom 1975), and in captivity they spend most of the time at the water surface (Davenport and Clough 1986). As they grow, they gain control over buoyancy (Minamikawa et al. 2000;

Hochscheid et al. 2003) and the time spent submerged increases, both in captivity (Bentivegna et al. 2003) and in the wild (Renaud and Carpenter 1994; Dellinger and Freitas 1999; Minamikawa et al. 2000; Luschi et al. 2003b; Godley et al. 2003). The turtles tracked by satellite here studied spent most of the time underwater, which suggests that they had already achieved some control over buoyancy and a flipper stroke strong enough to descend to a depth where they reached neutral buoyancy. The only exception was the smallest specimen (turtle 103; SCL = 37.1 cm), which spent 67% of the time at the surface. This observation indicates that this individual was positively buoyant and therefore had limited diving capacity, which increases drag while swimming at the surface and hence limits the capability for swimming against prevailing currents. This supports the hypothesis that the transition between passive drifting and active habitat selection takes place at an SCL of about 40 cm. Thus, turtles with a greater SCL can migrate towards neritic foraging grounds.

Immature loggerhead turtles that inhabit cool-temperate areas in the western Atlantic avoid zones with low temperatures (Coles and Musick 2000) and usually migrate seasonally (Musick and Limpus 1997) to avoid cold stunning at temperatures lower than 12°C (Lutz et al. 1989). A similar latitudinal migration has also been reported along the Italian coast (Bentivegna and Paggialonga 1998; Bentivegna 2002), although winter water temperature is always higher than 14°C (Bentivegna et al. 2003). Around the Balearic Archipelago, immature loggerhead turtles occur year round, but fishermen claim that turtle sightings and by-catch increase in summer (Carreras et al. 2004). On the basis of by-catch data from long-liners, Camiñas and de la Serna (1995) concluded that the population off the Balearic Archipelago mostly moves southwards in autumn, returning to the islands in spring. A similar seasonal pattern has also been reported in the neighbouring Iberian Peninsula on the basis of stranding occurrence (Tomas et al. 2003).

The movement of the five tagged turtles released in April 2003 south of the Balearic Archipelago did not confirm a northwards spring migration, as none exhibited a consistent northwards movement. On the contrary, although they had been released at the beginning of the warm season and were therefore about to start their theoretical northwards migration, three of these turtles exhibited a statistically significant preference to move south-eastwards, and they ended up far away from the archipelago. These results are consistent with the absence of seasonality observed in turtle abundance off the nearby Columbretes islands (Gómez de Segura et al. 2003) and indicate that the increase in strandings, sightings, and by-catch reported during the summer may be the result of the seasonal increase in mortality caused by drifting long-lines and lobster trammel nets, fishing gear used only during the summer (Carreras et al. 2004).

Although each of the five tagged turtles followed a different route, their movements had two common features: (1) the two animals that approached the Iberian

Peninsula afterwards headed south and turned counterclockwise, and (2) all five animals that approached the shore of northern Africa moved eastwards until they were deflected offshore. The two individuals tracked for the largest duration seemed to be entrained in an eddy and turned clockwise. According to Millot (1987), the area used by the tagged turtles is dominated by two major permanent surface currents (Fig. 1). The Algerian jet flows eastwards along the coast of northern Africa, although much of the movement is highly convoluted because of a large number of anticyclonic gyres located east of the latitude 0°E. Some of these gyres leave the main current and reach the southern Balearic Archipelago (López-Jurado 1990). The Catalan current flows southwards parallel to the Iberian Peninsula, although a branch is deflected at Cape la Nao and then flows along the west coast of Ibiza and Majorca. A second branching is produced at Cape Palos, where the deflected current moves southwards to meet the Algerian jet.

Comparison of turtle tracks with the routes followed by the prevailing currents indicates that the animals turning counterclockwise in the western Algerian basin entered the Catalan current, followed the branch deflected at Cape Palos, joined the Algerian jet, and were finally deflected. The eastwards movement of animals that approached the African shore, which is usually followed by deflection and often clockwise turning, indicates that the turtles may have entered the Algerian jet. Finally, the only turtle that entered the Balearic sea moved northwards along the west coast of the archipelago and probably swam along the branch of the Catalan current, which deflects at Cape la Nao. On the basis of our observations by satellite tracking, we conclude that the turtle movement is partially due to passive drifting, thus stressing the relevance of currents and associated frontal systems for understanding turtle distribution (Luschi et al. 2003a).

Our conclusion is supported by the absence of differences in the speed of travel and in the mean cosine of the turning angles between turtles when on the shelf, on the slope, or in the open ocean. If the lower than expected occurrence of turtles over the continental shelf was due to active habitat selection, the correlated random-walk theory predicts that both the speed of travel and the mean cosine of turning angles increase while animals are over the continental shelf (Turchin 1991). Although location inaccuracies by Argos may lead to erroneous measures of speed of travel and mean cosine, the screening of the data and the long time between two adjoining fixes (roughly 72 h) had probably improved the quality of the measurement. Furthermore, habitat use by turtles on the continental shelf matched availability, again supporting the notion of the absence of active habitat selection. Although the speed of the plane prevented the determination of turtle body size, stranding data (University of Barcelona, unpublished information) and incidental catch data (Mayol et al. 1988) indicate that most of the turtles in the area were also juvenile or immature.

However, passive drifting alone is not enough to explain the movements of the five tagged turtles, as some of them moved westwards along the shore of northern Africa and southwards along the west shore of the Balearic Archipelago, that is, against prevailing currents. In both situations, the turtles were far offshore. Since prevailing currents flow over the continental slope (Milot 1987; Salat 1995), turtles were not in the main stream but at the edges, where water velocity is thought to be not as high. A similar pattern has been reported in the North Pacific (Polovina et al. 2000), where turtles swim upstream along the edge of prevailing currents, a strategy that increases the rate of seston intercept. Similar swimming against prevailing currents in the Northern Atlantic has also been reported (Dellinguer and Freitas 1999). Indeed, previous research in other oceans suggested that the movements of juvenile loggerhead turtles with an SCL of about 40–50 cm may be tightly linked to frontal systems, along the continental slope (Witzel 1999) or in the open ocean (Polovina et al. 2000). The existence of a weak but significant negative correlation between the movement rate and the absolute value of the turning angle for four of the five turtles shows that they combined two different swimming strategies, that is, fast and direct swimming across unsuitable habitats and slow and convoluted swimming at suitable patches. A similar pattern has been reported for albatrosses that concentrated at hydrographic fronts and in the vicinity of productive continental shelves (Hyrenbrach et al. 2002).

Although the turtles studied here used the continental slope proportionally to its availability and for most of the time remained far away from the permanent frontal systems (dashed lines in Fig. 1) that occur between the Balearic Archipelago and the Iberian Peninsula (Pinot et al. 1994; Salat 1995), they occupied the area of strong meso-scale activity associated with the eddies generated by the Algerian current, which are frontal systems of enhanced productivity (Estrada 1996). This association with a turbulent system also explains why the turtles tracked in the Mediterranean exhibited more convoluted routes and frequent changes in bearing than those tracked in the North Pacific (Polovina et al. 2000) and in the North Atlantic (Dellinguer and Freitas 1999). Further research combining satellite tracking and simultaneous measurement of geostrophic currents will clarify how turtles exploit hydrographic structures (Luschi et al. 2003a).

The area exploited by the turtles tracked in this study overlaps with the fishing grounds used by the Spanish drifting long-line fleet (Camiñas and de la Serna 1995), thereby leading to high by-catch rates (Mayol et al. 1988; Aguilar et al. 1995; Camiñas and de la Serna 1995). Interestingly, the transmitters of turtles 103 and 503 were exposed continuously to the air throughout the final active period of the duty cycle (8 h). This was not observed in any of the other turtles. Hays et al. (2003) interpreted this type of behaviour as evidence of capture, which is a plausible explanation. Although we cannot assess whether the animals were slaughtered or released again once the transmitters were removed, it is likely

that these turtles interacted with fisheries. The tracking of more instrumented turtles will help estimate the habitats of loggerhead sea turtles in the Mediterranean and their probability of being taken in fisheries.

Acknowledgements This study was funded by the EU project "Protección de Praderas de Posidonia en LICs de Baleares" LIFE00NAT/E/7303. The Fundació pel Desenvolupament Sostenible (FDS) provided logistic support for the fieldwork. Animals were instrumented under permit no. 2003/11 issued by the local government of the Balearic Islands (Conselleria de Medi Ambient del Govern de les Illes Balears) on 19 February 2003.

References

- Aguilar R, Mas J, Pastor X (1995) Impact of the Spanish swordfish longline fisheries on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* population in the western Mediterranean. In: Richardson JI, Richardson TH (eds) Proceedings of the 12th annual workshop on sea turtle biology and conservation. NOAA Tech Memo NMFS-SEFSC-361:1–6
- Argos (2000) User's manual. CLS, Ramonville, France
- Avens L, Braun-McNeill J, Epperly S, Lohman K (2003) Site fidelity and homing behaviour in juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Mar Biol 143:211–220
- Balazs G, Miya R, Beavers S (1996) Procedures to attach a satellite transmitter to the carapace of an adult green turtle, *Chelonia mydas*. In: Keinath J, Barnard D, Musick J, Bell B (Comps) Proceedings of the 15th annual symposium on sea turtle biology and conservation. NOAA Tech Memo NMFS-SEFSC-367:21–26
- Bentivegna F (2002) Intra-Mediterranean migration of loggerhead sea turtles monitored by satellite telemetry. Mar Biol 141:795–800
- Bentivegna F, Paglialonga A (1998) Identification of the Gulf of Naples as a feeding ground and migratory path for *Caretta caretta* in the Mediterranean Sea. In: Abreu-Grobois FA, Briseño-Dueñas R, Márquez R, Sarti L (Comps) Proceedings of the 18th international symposium. NOAA Tech Memo NMFS-SEFSC-436:95–97
- Bentivegna F, Hochscheid S, Minucci C (2003) Seasonal variability in voluntary dive duration of the Mediterranean loggerhead turtle, *Caretta caretta*. Sci Mar 67:371–375
- Berta A, Sumich JL (1999) Marine mammals. Evolutionary biology. Academic Press, San Diego
- Bolten AB (2003) Active swimmers-passive drifters: the oceanic juvenile stage of loggerheads in the Atlantic system. In: Bolten AB, Witherington BE (eds) Loggerhead sea turtles. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp 63–78
- Camiñas JA, de la Serna JM (1995) The Loggerhead distribution in the western Mediterranean Sea as deduced from captures by the Spanish long line fishery. In: Llorente G, Montori A, Santos X, Carretero MA (eds) Scientia Herpetologica, Asociación Herpetológica Española, Barcelona, pp 316–323
- Camiñas JA, Valeiras J (2003) Critical areas for loggerhead and leatherback marine turtles in the western Mediterranean sea and the Gibraltar Strait region. In: Margaritoulis D, Demetropoulos A (eds) Proceedings of the first Mediterranean conference on marine turtles. Barcelona Convention-Bern Convention-Bonn Convention, Nicosia, Cyprus, pp 80–85
- Camiñas JA, Valeiras J, de la Serna JM (2003) Spanish surface longline gear types and effects on marine turtles in the western Mediterranean sea. In: Margaritoulis D, Demetropoulos A (eds) Proceedings of the first Mediterranean conference on marine turtles. Barcelona Convention-Bern Convention-Bonn Convention, Nicosia, Cyprus, pp 88–93
- Carreras C, Cardona L, Aguilar A (2004) Incidental catch of the loggerhead turtle *Caretta caretta* off the Balearic Islands (western Mediterranean). Biol Conserv 117:321–329

- Coles WC, Musick JA (2000) Satellite sea surface temperature analysis and correlation with sea turtle distribution off North Carolina. *Copeia* 2000:551–554
- Crowder LB (1990) Community ecology. In: Schreck CB, Moyle PB (eds) *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, pp 609–632
- Davenport J, Clough W (1986) Swimming and diving in young loggerhead sea turtles (*Caretta caretta* L.). *Copeia* 1986:53–57
- Dellinger T, Freitas C (1999) Movements and diving behaviour of pelagic stage loggerhead sea turtles in the North Atlantic: preliminary results obtained through satellite telemetry. In: Kalb H, Wibbles T (eds) *Proceedings of the 19th annual symposium on the sea turtle biology and conservation*. NOAA Tech Memo NMFS-SEFSC-443:155–157
- Estrada M (1996) Primary production in the northwestern Mediterranean. *Sci Mar* 60 (suppl 2):55–64
- Godley BJ, Broderick AC, Glen F, Hays GC (2003) Post-nesting movements and submergence patterns of loggerhead marine turtles in the Mediterranean assessed by satellite tracking. *J Exp Mar Biol Ecol* 287:119–134
- Gómez de Segura A, Tomás J, Pedraza SN, Crespo EA, Raga JA (2003) Preliminary patterns of distribution and abundance of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, around the Columbretes Islands Marine Reserve, Spanish Mediterranean. *Mar Biol* 143:817–823
- Hays GC, Marsh R (1997) Estimating the age of juvenile loggerhead sea turtles in the North Atlantic. *Can J Zool* 75:40–46
- Hays GC, Åkesson B, Godley BJ, Luschi P, Santidrian P (2001) The implications of location accuracy for the interpretation of satellite-tracking data. *Anim Behav* 61:1035–1040
- Hays GC, Broderick A, Godley BJ, Luschi P, Nichols WJ (2003) Satellite telemetry suggests high levels of fishing-induced mortality in marine turtles. *Mar Ecol Prog Ser* 262:305–309
- Hochscheid S, Bentivegna F, Speakman J (2003) The dual function of the lung in chelonian sea turtles: buoyancy control and oxygen storage. *J Exp Mar Biol Ecol* 297:123–140
- Hyrenbrach KD, Fernández P, Anderson DJ (2002) Oceanographic habitats of two sympatric North Pacific albatrosses during the breeding season. *Mar Ecol Prog Ser* 233:283–301
- Ivlev VF (1961) *Experimental ecology of the feeding of fishes*. Yale University Press, New Haven, CT
- Laurent L, Casale P, Bradai MN, Godley BJ, Gerosa G, Broderick AC, Schroth W, Schierwater B, Levy AM, Freggi D, Abd el-Mwla EM, Hadoud DA, Gomati HE, Domingo M, Hadjichristophorou M, Kornaraki L, Demiryak F, Gautier C (1998) Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Mol Ecol* 7:1529–1542
- López-Jurado JL (1990) Masas de agua alrededor de las Islas Baleares. *Bol Inst Esp Oceanogr* 6:3–20
- Luschi P, Hays GC, Del Seppia C, Marsh R, Papi F (1998) The navigational feats of green sea turtles migrating from Ascension Island investigated by satellite telemetry. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265:2279–2284
- Luschi P, Hays G, Papi F (2003a) A review of long-distance movements by marine turtles and the possible role of ocean currents. *Oikos* 103:293–302
- Luschi P, Hughes GR, Mencacci R, De Bernardi E, Sale A, Broker R, Bouwere M, Papi F (2003b) Satellite tracking of migrating loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) displace in the open sea. *Mar Biol* 143:793–801
- Lutcavage ME, Lutz PL (1997) Diving physiology. In: Lutz PL, Musick JA (eds) *The biology of sea turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 387–410
- Lutz PL, Bergéy A, Bergéy M (1989) Effects of temperature on gas exchange and acid-base balance in the sea turtle *Caretta caretta* at rest and during routine activity. *J Exp Biol* 144:155–169
- Marsh H, Saalfeld DF (1990) The distribution and abundance of dugongs in the Great Barrier Reef Marine Park south of Cape Bedford. *Aust Wildl Res* 17:511–534
- Marsh H, Sinclair DF (1989) An experimental evaluation of dugong and sea turtle aerial survey techniques. *Aust Wildl Res* 16:639–650
- Mayol J, Muntaner J, Aguilar R (1988) Incidencia de la pesca accidental sobre las tortugas marinas en el Mediterráneo español. *Bull Soc Hist Nat Balears* 32:19–31
- Millot C (1987) Circulation in the western Mediterranean Sea. *Oceanol Acta* 10:143–149
- Milsom WK (1975) Development of buoyancy control in juvenile Atlantic loggerhead turtles, *Caretta caretta*. *Copeia* 1975:758–762
- Minamikawa S, Naito Y, Sato K, Matsuzawa Y, Bando T, Sakamoto W (2000) Maintenance of neutral buoyancy by depth selection in the loggerhead turtle *Caretta caretta*. *J Exp Biol* 203:2967–2975
- Musick JA, Limpus C (1997) Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: Lutz PL, Musick JA (eds) *The biology of sea turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 137–163
- Pinot JM, Tinotre J, Gomis D (1994) Quasi-synoptic mesoscale variability in the Balearic Sea. *Deep-Sea Res I* 41:897–914
- Polovina JJ, Kobayashi DR, Parker DM, Seki JP, Balazs GH (2000) Turtles on the edge: movement of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along oceanic fronts, spanning longline fishing grounds in the central North Pacific, 1997–1998. *Fish Oceanogr* 9:71–82
- Polovina JJ, Howell E, Parker DM, Balazs GH (2002) Dive-depth distribution of loggerhead (*Caretta caretta*) and olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) sea turtles in the central North Pacific: might deep longline sets catch fewer turtles? *Fish Bull* 101:189–193
- Preen AR, Marsh H, Lawler IR, Prince RIT, Shepherd R (1997) Distribution and abundance of dugongs, turtles, dolphins and other megafauna in Shark Bay, Ningaloo Reef and Exmouth Gulf, Western Australia. *Wildl Res* 24:185–208
- Pritchard PC (1997) Evolution, phylogeny, and current status. In: Lutz PL, Musick JA (eds) *The biology of sea turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1–28
- Renaud ML, Carpenter A (1994) Movements and submergence patterns of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the Gulf of Mexico determined through satellite telemetry. *Bull Mar Sci* 55:1–15
- Sakamoto W, Bando T, Arai N, Baba N (1997) Migration paths of the adult female and male loggerhead turtles *Caretta caretta* determined through satellite telemetry. *Fish Sci* 63:547–552
- Salat J (1995) The interaction between the Catalan and Balearic currents in the southern Catalan Sea. *Oceanol Acta* 18:227–234
- Smith WHF, Sandwell DT (1997) Global seafloor topography from satellite altimetry and ship depth soundings. *Science* 277:1957–1962
- Strauss RE (1979) Reliability estimates of Ivlev's electivity index, the forage ratio, and a proposed linear index of food selection. *Trans Am Fish Soc* 111:517–522
- Tomas J, Fernández M, Raga JA (2003) Sea turtles in Spanish Mediterranean waters: surprises in 2001. *Mar Turtle Newslett* 101:1–3
- Turchin P (1991) Translating foraging movements in heterogeneous environments into the spatial distribution of foragers. *Ecology* 72:1252–1266
- Witherington BE (2002) Ecology of neonate loggerhead turtles inhabiting lines of downwelling near the Gulf Stream front. *Mar Biol* 140:843–853
- Witzell WN (1999) Distribution and relative abundance of sea turtles caught incidentally by the U.S. pelagic longline fleet in the western North Atlantic Ocean, 1992–1995. *Fish Bull* 97:200–211
- Wyneken J (1997) Sea turtle locomotion: mechanisms, behavior, and energetics. In: Lutz PL, Musick JA (eds) *The biology of sea turtles*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 165–198
- Zar JH (1984) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ

Artículo 6: Incidental catch of the loggerhead turtle *Caretta caretta* off the Balearic Islands (western Mediterranean)

"La ciencia humana consiste más en destruir errores
que en descubrir verdades".

Sócrates (470 - 399 AC); filósofo griego.

Resumen:

La tortuga boba (*Caretta caretta*) es la especie de tortuga marina más común en el Mediterráneo occidental ya que en esta zona se concentran juveniles provenientes tanto de las poblaciones Atlánticas como Mediterráneas. Se sabe que la interacción con la pesca es muy intensa en esta zona produciéndose miles de capturas anuales sólo por el palangre de superficie, aunque no se ha realizado hasta el momento ninguna evaluación completa de todos los artes de pesca.

Con el fin de realizar esta evaluación se ha realizado un estudio, que incluye entrevistas a los pescadores y el emplazamiento de observadores durante las operaciones pesqueras, para determinar el volumen de capturas de tortugas marinas en la zona de las islas Baleares. El estudio se centró en aquellas embarcaciones cuyo puerto base se halla en el archipiélago, por lo que las capturas de la flota de palangre del sureste español que opera durante el verano en las Baleares no se tuvieron en consideración. Los pescadores opinaron que el stock de tortuga boba está en declive en el archipiélago y que la actividad pesquera es responsable de esta tendencia, al menos parcialmente. Los embarques confirmaron que los datos de capturar por unidad de esfuerzo (CPUE) obtenidos en las encuestas son fiables. En base a estos datos se calcularon un total de 373 (95% CI: 365–308) capturas de tortuga boba durante el año 2001. La mayoría de tortugas se capturaron con el trasmallo de langosta (196; 95% CI: 269–123) o el palangre de superficie (102; 95% CI: 111–93). A pesar de que los valores de CPUE fueron mucho menores en el primer caso, las capturas totales son mayores debido al mayor tamaño de la flota. Además, la mayoría de las tortugas capturadas en el trasmallo de langosta se encontraban muertas cuando se sacaron las redes, mientras que prácticamente no se observó mortalidad directa en los individuos capturados con palangre de superficie. Esta observación subraya la amenaza del trasmallo de langosta en las poblaciones de tortuga boba así como la necesidad de realizar evaluaciones exhaustivas sobre el posible impacto de los diferentes artes de pesca que operan en cada zona. El impacto estimado de la mortalidad detectada en las poblaciones de tortuga boba depende del origen de los individuos, que todavía está por establecer.



Incidental catch of the loggerhead turtle *Caretta caretta* off the Balearic Islands (western Mediterranean)

Carlos Carreras*, Luis Cardona, Alex Aguilar

Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avda. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain

Received 24 June 2003; received in revised form 21 November 2003; accepted 23 December 2003

Abstract

A survey, which included questionnaires for fishermen and the placement of observers onboard fishing vessels, was conducted to assess turtle catch off the Balearic Islands. The survey focused on those fishing vessels whose base port was in the archipelago and, hence, the catch of South-eastern Spain longliners moving in summer to the archipelago was not considered. The fishermen's perception was that the stock of loggerhead turtles is declining in the archipelago and that fishing activities are at least partially responsible for this trend. The observer reports indicated that the figures produced by the interviewees for catch per unit effort (CPUE) were reliable. Therefore, on the basis of these figures we calculated a total catch of 373 (95% CI: 365–308) loggerheads for 2001. Most turtles were caught in lobster trammel nets (196; 95% CI: 269–123) or drifting longlines (102; 95% CI: 111–93). Although the CPUE was much lower for the former, total catch was greater because of a larger fleet. Moreover, most loggerheads caught in lobster trammel nets were found dead when nets were hauled in, while no immediate mortality was observed in individuals caught in drifting longlines. This observation highlights the threat of trammel nets to loggerhead turtle populations. The estimated impact of the catches on the turtle population depends on the origin of the individuals inhabiting the region, which is yet to be established.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Artisanal fisheries; By-catch; Marine turtles; Trammel net

1. Introduction

The loggerhead turtle *Caretta caretta* is the most common marine turtle in the western Mediterranean (Broderick et al., 2002). In these waters, specimens from Atlantic and eastern Mediterranean rookeries apparently share foraging areas (Laurent et al., 1993, 1998; Laurent and Lescure, 1995; Casale et al., 2002). This anti-tropical species, with highly fragmented populations, inhabits regions that are greatly disturbed by humans (Pritchard, 1997) and has declined throughout its entire distribution range in recent decades (NRC, 1990). Thus, the loggerhead turtle is included in most international wildlife conservation treaties (Eckert et al., 2000), and Groombridge (1990) recommended that the

species be considered as critically endangered in the Mediterranean Sea.

Demographic studies indicate that the loss of late juveniles (straight carapace length from 30 to 80 cm) and adults has a more dramatic impact on populations than the loss of younger individuals (eggs, hatchlings and younger juveniles) (Crouse et al., 1987; NRC, 1990). Therefore, although rookery protection is a priority for marine turtle conservation, this measure will be unsuccessful without effective protection of large juveniles and adults. Boat collision, ingestion of debris, and chemical pollution are potential threats for larger size classes at sea (Lutcavage et al., 1997), but available data clearly indicates that fishing is the largest cause of mortality. Indeed, several declining populations have rapidly recovered once mortality caused by this activity was reduced (NMFS-SEFSC, 2001).

Large numbers of late juvenile loggerhead turtles can be observed off the Balearic Islands all year round (Mayol et al., 1988; Camiñas and de la Serna, 1995;

* Corresponding author. Tel.: +34-93-4021453; fax: +34-93-4034426.

E-mail address: carreras@ub.edu (C. Carreras).

Mejías and Amengual, 2001). The archipelago supports a large fishing fleet (Iglesias and Martorell, 1990), which is reinforced throughout the warm season with longliners from south-eastern Spain (Camiñas and de la Serna, 1995). Incidental catch of loggerhead turtles has been reported in other heavily fished areas around the world where drift-nets, bottom trawling and drifting longlines are used (Aguilar et al., 1995; Nichols et al., 1999; Silvani et al., 1999; Witzell, 1999). Other fishing gear also produces potential by-catch (Delaugerre, 1987; Laurent, 1991; Goodley et al., 1998; Nichols et al., 1999), but information on these operations is still scarce. This study aims: (i) to identify the fishing gear, used by locally based fishing boats, involved in loggerhead turtle by-catch in the Balearic Islands, and (ii) to establish the total number of these turtles caught and killed in fishing activities.

2. Material and methods

Information was collected from two independent sources: interviews with professional fishermen, and data collected by observers onboard fishing vessels.

2.1. Interviews

A survey was conducted from May to August 2002 in all the fishing harbours of the Balearic archipelago. A questionnaire that was specially designed to identify conflicts between fishermen and turtles was used. The survey was stratified in accordance with the information supplied by the Fisheries Office of the Balearic Islands (*Direcció General de Pesca del Govern de les Illes Balears*), which registers all professional fishing vessels with their base harbour in the archipelago and classifies them into four categories: bottom trawlers, drifting longliners, purse-seiners and artisanal boats. Fishermen on at least 25% of the vessels of each category from each harbour were interviewed; however, to avoid pseudoreplication only one individual per boat was given the questionnaire. Sampling effort was increased for categories of fishing gear used by only a few vessels. Bottom trawlers, drifting longliners and purse-seiners use the same fishing gear throughout the year and hence stratification based on the data of the official register was easy. This was not true for artisanal vessels, as they often alternate several fishing gears year round. Thus, stratification based on the data of the official register might be useless if fishing gears were used unevenly in the archipelago. Fortunately, the results of the questionnaire revealed that three types of trammel nets and bottom long-lines were widely used in all harbours and that stratification based on the official register properly sampled them. Results were grouped for analysis by island, though the data from the southern islands (Ibiza and Formentera, known as Pitiüses) were pooled as the

fishermen share the same grounds. Fishermen from boats from South-eastern Spain operating in the area were not interviewed.

The survey included 41 questions (a copy in Spanish is available on request), of which the main ones were:

- Which fishing grounds did you visit last year (Fig. 1)?
- On a monthly basis, which grounds did you use last year?
- On a monthly basis, which gear did you use?
- In your opinion, what is the status of the turtle population (declining, stable, increasing)? If declining, what are the causes?
- When do you think turtles are more often observed and caught, on a monthly basis?
- How many turtles did you accidentally catch last year? In which months did this occur? What kind of fishing gear was involved? Were the turtles released dead or alive?

The fishing effort carried out per vessel in the previous year (2001) was recorded as the number of months the vessel operated. When it visited more than one fishing ground in the same month, the effort was assumed to be distributed evenly and, hence, effort was divided by the number of grounds visited. When a vessel used several fishing gears in the same period, effort was divided by the number of distinct types of gear, again assuming an even fractionation. Thus, total fishing effort with gear a in ground z (E_{za}) was calculated as:

$$E_{za} = \sum_{i=1}^{i=n} E_{zai}$$

where E_{zai} is the effort supported by fishing ground z from vessels from the i th harbour operating with gear a . In its turn, E_{zai} was calculated as follows:

$$E_{zai} = E_{ozai} \frac{n_{ai}}{n_{oai}}$$

where E_{ozai} is the effort reported by the interviewed fishermen from harbour i operating in zone z with gear a , n_{ai} is the number of registered vessels with base in harbour i that used gear a , and n_{oai} the number of vessels from harbour i that used gear a whose crew was interviewed.

Total turtle catch in ground z with gear a (C_{za}) was calculated as:

$$C_{za} = C_{ozza} \frac{E_{za}}{E_{ozza}}$$

where C_{ozza} is the number of turtles caught, as reported by fishermen, in ground z with gear a ; E_{za} is the total

fishing effort with gear a supported by zone z ; and E_{oza} is the effort reported by fishermen in zone z with gear a . Consequently, the CPUE in each ground for a given gear was calculated as:

$$CPUE = \frac{C_{za}}{E_{za}}$$

2.2. Validation of the CPUE calculated from the questionnaires

Loggerhead turtles are legally protected in the study area. Consequently, it was feared that fishermen might understate the frequency and number of incidental catches. To validate the reliability of responses, we placed observers onboard fishing vessels in a few fishing

grounds off Majorca and/or Minorca, compared their data with those reported by fishermen operating in the same fishing grounds, and extrapolate the conclusion about reliability or unreliability of answers to the other fishing grounds. Table 1 provides details of the fishing operations surveyed.

2.3. Aerial surveys

Two aerial surveys were conducted off the Balearic islands in March 2002 and September 2002. The strip transect method was used (Marsh and Sinclair, 1989), with the transects following a systematic saw-tooth pattern over the continental shelf (Gómez de Segura et al., 2003). Surveys were taken from a high-wing aircraft (Cessna-172) that allowed a side-viewing platform.

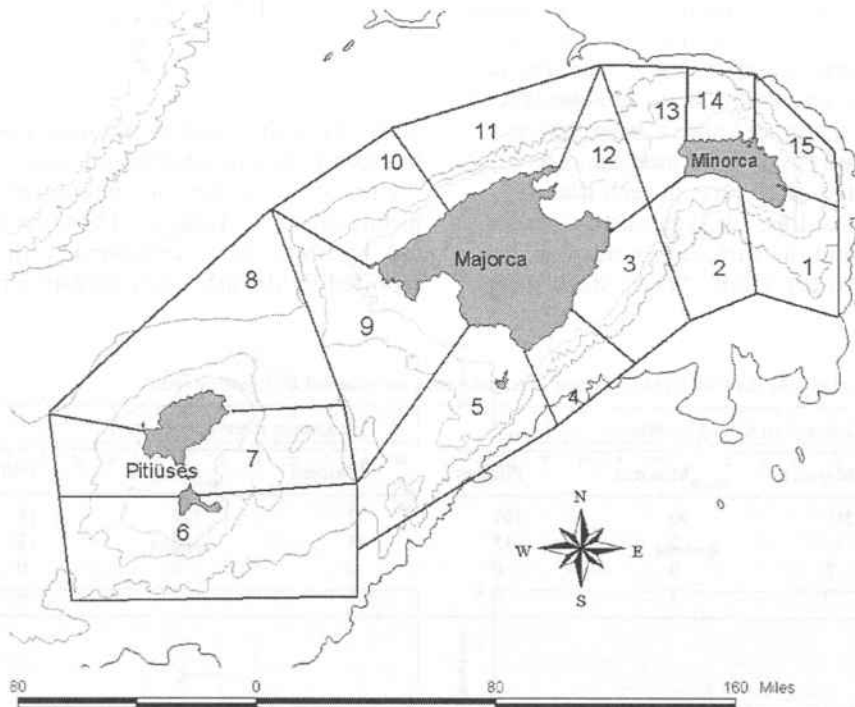


Fig. 1. Main fishing grounds off the Balearic Island.

Table 1
Summary statistics of the fishing operations surveyed by onboard observers. Fishing ground codes as in Fig. 1

	Fishing grounds validated	Number of fishing vessels surveyed	Number of operations surveyed	Average number of operations per month	By-caught turtles
Drifting longlines	5, 7, 8, 9	2	30	10.6	13
Purse-seines	5, 9	6	54	18.0	0
Bottom-trawls	5, 9, 12	6	100	19.1	0
Lobster trammel nets	3, 12, 13, 14	13	250	7.0	7
Bottom longlines	3, 4, 5	6	32	7.2	0
Red mullet trammel nets	2, 12, 13	10	162	10.8	1
Cuttlefish trammel nets	2, 12, 13	11	117	14.0	0
Fish-aggregating devices	9, 5, 12	5	50	8.2	0

Survey altitude was maintained at 500 feet and transects were flown at a groundspeed ranging from 140–156 km h⁻¹. The crew included two pilots and two observers, seated behind the pilots on each side of the plane. Six days were needed for completing each survey and surveys were conducted only in Beaufort (wind scale) < 3, because sightability of turtles decreases in bad weather conditions (Marsh, 1990).

Once a turtle was observed, the location of the plain (obtained from a GPS) and the vertical angle of the sighting line (obtained from a clinometre) were recorded. This angle was then used for calculating the distance of the turtle to the flying line. Those turtles outside of a 200 m wide strip were not included in the calculations, as visibility decreases beyond such a distance (Marsh and Sinclair, 1989).

2.4. Statistics

The Kruskal-Wallis test (Cuadras, 1983) was used to assess differences in the perception of turtle abundance (sightings and catches) among fishermen from the three islands. The same test was applied to examine monthly differences in sighting and catch rates in each island.

The chi-square test (Cuadras, 1983) was used to check whether the turtle catch in the various grounds was distributed similarly to fishing effort. When statistically

significant differences were observed, Ivlev's electivity index (Ivlev, 1961, quoted by Crowder, 1990) was calculated to identify the areas where turtle catch was higher or lower than expected. The Ivlev's index was calculated as:

$$I = (p_t - p_e) / (p_t + p_e)$$

where p_t is the percentage of turtles caught in a given area and p_e is the percentage of turtles expected to be caught according to the fishing effort deployed there. Confidence intervals were calculated, following Strauss (1979), as:

$$E_c = \left(2 - \left(\frac{2p_e}{(p_e + p_t)} \right) \right) \times \left[1 \pm 1.96 \sqrt{\frac{2n_t p_t (1 - p_e)(p_t + p_e)^2 + p_t (1 - p_t) n_e}{n_t n_e (p_t + p_e)^2}} \right] - 1$$

where n_t is the number of turtles, and n_e is the total number of fishing grounds.

Onboard observers only monitored vessels from a few fishing grounds (Table 1). Thus, the CPUE data reported by them were compared with the CPUE data reported by the fishermen operating in the same fishing

Table 2
Number of registered vessels using the distinct types of fishing gear, fishermen interviewed and gear coverage

	Registered fishing vessels			Fishermen interviewed			Coverage
	Majorca	Minorca	Pitiüses	Majorca	Minorca	Pitiüses	
Artisanal boats	219	90	107	71	123	18	26.92%
Bottom-trawlers	41	7	13	18	7	13	62.3%
Drifting longliners	3	0	0	2	0	0	66.67%
Purse-seiners	10	1	0	6	1	0	63.64%

Table 3
Accumulated fishing effort (E_{Σ}) expressed as total fishing months on a yearly basis

Fishing gear	Majorca	Minorca	Pitiüses	TOTAL	%
Lobster trammel nets	462.10	417.65	269.40	1149.15	23.22%
Cuttle-fish trammel nets	584.41	107.11	377.52	1069.04	21.60%
Bottom longlines	359.62	307.43	169.75	836.80	16.91%
Bottom-trawls	411.33	134.66	194.40	740.39	14.96%
Red mullet trammel nets	270.85	179.35	154.28	604.48	12.22%
Fish and squid lures	98.72	38.18	14.00	150.90	3.05%
Purse-seines	120.00	12.00	*	132.00	2.67%
Fish-agregating Devices	115.33	*	*	115.33	2.33%
Gill-nets	25.50	*	27.50	53.00	1.07%
"Jonquillera"	38.81	*	3.25	42.06	0.85%
Traps	5.60	21.60	*	27.20	0.55%
Drifting longlines	14.00	*	1.00	15.00	0.30%
Pound nets	13.00	*	*	13.00	0.26%
TOTAL	2519.27	1217.98	1211.10	4948.35	

*Not used in the island.

grounds and not with the average CPUE in the whole archipelago. The conclusion about the reliability of fishermen's answer about by-catch was then extrapolated to the whole archipelago. The average number of fishing operations per month and vessel (Table 1) was used to transform the CPUE data reported by onboard observers (reported as turtles caught per fishing operation) to the unit used in the fishermen questionnaires (turtles caught per month and vessel). As data were not normally distributed, the Mann-Whitney test (Cuadras, 1983) was used to assess differences in the CPUE reported by fishermen for each kind of gear and those recorded by observers.

The 95% confidence intervals of estimated turtle catch with each fishing gear for the whole archipelago (ΣC_{za}) were calculated with the procedure detailed by Greenwood (1996) for stratified sampling.

3. Results

162 fishermen were interviewed from May 2002 to August 2002. This implies that information was col-

lected from 32% of the vessels based in the Balearic Islands (Table 2). Because the purse-seiners, bottom-trawlers and drifting longliners fleet was smaller, coverage was proportionally higher.

Fishermen reported using 13 kinds of fishing gear, although purse-seines, bottom-trawling, drifting longlines and three types of trammel nets accounted for most of the fishing effort. Extrapolation of fishing effort by gear (Table 3) was easy once information on the number of artisanal boats (official records) and gear use (questionnaires) is known. Geographical distribution of effort within the archipelago was uneven (Table 3), as most of the bottom-trawling, purse-seining and drifting longline took place off Majorca.

In all islands, fishermen reported that sightings of turtles peaked from late spring to late summer, (Kruskal-Wallis test; $P < 0.05$ for all the islands) (Fig. 2). The same pattern was observed for turtle catch (Kruskal-Wallis test; $P < 0.05$ for all the islands) (Fig. 2). Monthly differences between islands were not statistically significant either for sightings or catches (Kruskal-Wallis test; $P > 0.05$).

Most fishermen (56%) felt that turtles were declining in abundance and that fishing was at least partially

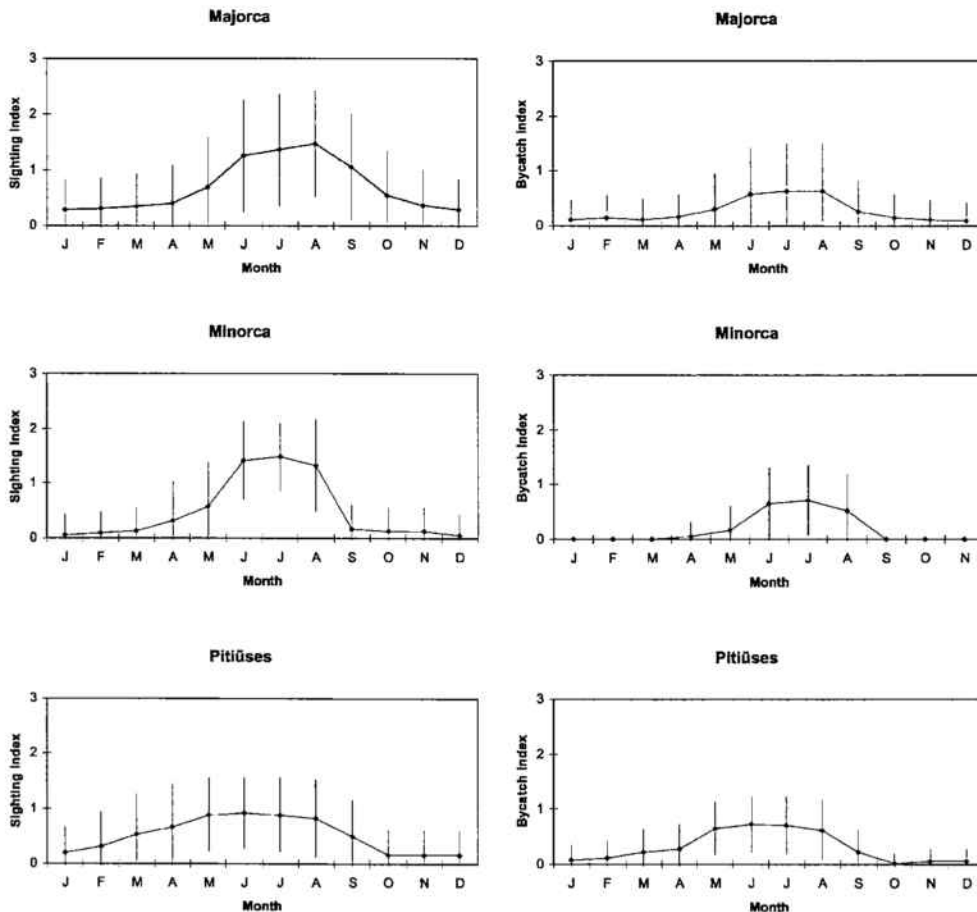


Fig. 2. Temporal distribution of loggerhead turtle sightings and by-catch off the Balearic Islands. The sighting and the by-catch indices range from 0 (no turtles) to 3 (many turtles).

Table 4

Average number of turtles caught monthly per vessel in 2001 according to fishermen's responses (CPUE) and number of turtles by-caught (C_{2a}) off the Balearic Islands by professional fishing vessels based in a port in the archipelago

	CPUE	Majorca	Minorca	Pitiüses	Total	95% CI
Bottom-trawls	0.018	11	0	2	13	21–5
Purse-seines	0.039	5	0	*	5	8–3
Drifting longlines	4.665	96	*	6	102	111–93
Bottom longlines	0.010	8	*	0	8	24–0
Lobster trammel nets	0.170	39	152	4	196	269–123
Cuttlefish trammel nets	0.007	3	0	5	8	19–0
Red mullet trammel nets	0.009	2	4	0	6	15–0
Fish-aggregating devices	0.000	0	0	0	0	–
Traps	0.000	0	0	0	0	–
Gill-nets	0.000	0	0	0	0	–
“Jonquillera”	0.000	0	0	0	0	–
Pound nets	0.000	0	0	0	0	–
Fish and squid lures	0.000	0	0	0	0	–
Total		164	156	17	337	365–309

*Not used in the island.

responsible for this trend (59%). Turtles were a common by-catch around the archipelago; 33 fishermen reported an accumulated catch of 143 turtles in 2001. The combination of the data about fishing effort (Table 3) and the CPUE values calculated from the questionnaires (Table 4) suggests that 377 turtles (95% CI: 365–309) were by-caught in 2001 (Table 4). Although several kinds of fishing gear were involved in incidental catches, most turtles had been taken by drifting longlines (Majorca) or lobster trammel nets (Minorca) (Table 4). No statistically significant differences for any of the gear was found between the CPUE values calculated from the questionnaires and those from the observer's reports (Table 5). Therefore, we assume that the results of the questionnaire survey are an accurate reflection of by-catch rates in the validated fishing grounds, that fishermen data are reliable, and that the above reported value is a reliable estimate of turtle by-catch for the whole archipelago.

Table 5

Average number of turtles caught monthly per vessel in the fishing grounds validated according to fishermen's responses (CPUEf), average number of turtles caught monthly per vessel in the same fishing grounds according to observer's records (CPUEo) and results of the Mann-Whitney test (P -value)

	CPUEf	CPUEo	P -value
Drifting longlines	4.665	4.588	>0.05
Lobster trammel nets	0.326	0.144	>0.05
Purse-seines	0.017	0.000	>0.05
Bottom-trawls	0.070	0.000	>0.05
Bottom longlines	0.012	0.000	>0.05
Red mullet trammel nets	0.042	0.000	>0.05
Cuttlefish trammel nets	0.003	0.000	>0.05
Fish-aggregating devices	0.000	0.000	>0.05

The distribution of turtle by-catch observed among grounds differed significantly from that expected on the basis of the distribution of the fishing effort with lobster trammel nets, bottom longlines, and red mullet trammel nets (Table 6). This observation indicates that the vulnerability of turtles to fishing gear varies between areas. Given that only a few turtles were caught in bottom longlines and red mullet trammel nets, we focused on ascertaining the cause of this unevenness for the lobster fishery. Results showed that Ivlev's electivity index was much higher for most of the grounds off Minorca than for the other areas (Fig. 3), indicating a proportionally greater vulnerability of turtles to lobster trammel nets around this island.

Most turtles were dead when lobster trammel nets were hauled in, whereas the opposite was true for drifting long-lines (Table 7).

Table 6

Turtles by-catches reported by fishermen from each island (o), expected number of turtle by-catch from each island assuming that by-catch volume is proportional to fishing effort, as shown in Table 3 (e), and results of the Chi-square test (P -value). The values for the fishing grounds off each island have been pooled in the table, but the statistical analysis was conducted on the original data

	Majorca		Minorca		Pitiüses		P -value
	o	e	o	e	o	e	
Drifting longlines	64	65	0	0	6	5	0.940
Lobster trammel net	39	79	152	71	4	46	<0.001
Purse-seines	5	5	0	1	0	0	0.364
Bottom-trawls	11	7	0	2	2	3	0.566
Bottom longlines	8	3	0	3	0	1	<0.001
Red mullet trammel nets	1	2	4	2	0	1	<0.001
Cuttlefish trammel nets	2	4	0	1	5	3	0.397

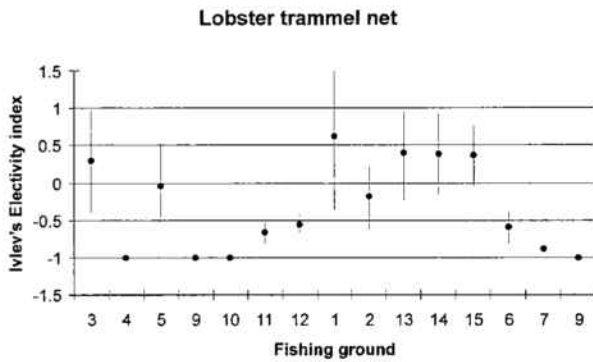


Fig. 3. Vulnerability of loggerhead turtles to lobster trammel nets in several fishing grounds off the Balearic Islands, as indicated by Ivlev's electivity index. Vertical lines show confidence intervals (95%). Fishing ground coding as in Fig. 1.

Table 7
Immediate mortality of loggerhead turtles caused by incidental catch. n: sample size. -: no data

	Fisherman reports		Onboard observer reports	
	n	Mortality (%)	n	Mortality (%)
Drifting longlines	70	0.0	13	7.7
Lobster trammel nets	45	77.7	7	100.0
Purse-seines	2	0.0	–	–
Bottom-trawls	6	50.0	–	–
Bottom longlines	3	0.0	–	–
Red mullet trammel nets	2	50.0	1	0
Cuttlefish trammel nets	–	–	–	–

Each aerial survey covered 329.03 km² (1645.15 km × 0.2 km), i.e., 4.23% of the total surface of the continental shelf of the archipelago (7773.7 km²). On average, 18.5 ± 3.5 turtles were observed in each survey, which suggests that 437.1 ± 41.7 turtles occurred simultaneously on the water surface over the continental shelf.

4. Discussion

Onboard observers have been widely used in fishery surveys (King, 1995) as they supply detailed and reliable data on by-catches. From surveys such as these, drifting longlines and bottom trawling were identified long ago as significant threats to marine turtles (Camiñas, 1988; Aguilar et al., 1995). One of the advantages of onboard observers is that they can detect incidental turtle catches in only a few trips when catch per unit effort is high. However, observers usually fail to detect these catches when they occur at low frequency, unless many fishing operations are surveyed. Furthermore, when the number of fishing operations per month is low, as is the case for artisanal vessels in the Balearic Islands, a long time

is needed for surveying a large number of fishing operations. In this situation, questionnaire-based surveys provide the most practical method to assess the extent of the problem (Godley et al., 1998), although data may be poor or biased. In this survey, we validated fishermen answers with data directly collected by observers onboard fishing vessels.

Loggerhead turtles are found in the Balearic Islands mainly in the summer, as indicated by higher sighting rates throughout the warm season. Drifting longlines and lobster trammel nets are the most widely used fishing gear in late spring and summer and, hence, are a major cause of incidental catch from locally based boats. Drifting longlines have been identified as a threat for marine turtles in the western Mediterranean, where about 15,000 turtles are thought to be caught yearly (Mayol et al., 1988; Aguilar et al., 1995; Camiñas, 1988), but information on incidental catch of turtles with lobster trammel nets is scarce.

Delaugerre (1987) and Laurent (1991) were the first to report on the risk of entanglement in lobster trammel nets in the western Mediterranean; however, they considered the number of captures low, although no supporting figures were produced. On the basis of a questionnaire-based survey, Godley et al. (1998) concluded that lobster trammel nets might be a threat for marine turtles in the eastern Mediterranean but they did not validate their results. Moreover, the size of the fleet operating in their study area was not established and hence, total catch was impossible to estimate.

In the present study, in most cases we were able to precisely determine fleet size and validate the CPUE values reported through information collected by observers. Unfortunately, a calculation of total by-catch by longliners in these islands is unfeasible because of the absence of reliable data on the number of drifting longliners that move from mainland Spain to the archipelago in pursuit of migrating schools of swordfish *Xiphias gladius* in the warm season (Camiñas and de la Serna, 1995). However, there is little doubt that the total take is much larger than the 100 individuals by-caught by the three longliners based in ports in Majorca. In spite of this shortcoming, and the fact that a questionnaire survey does not generate reliable estimates of by-catch but just provide evidence on the general extent of the problem (Lien et al., 1994), these results show that lobster trammel nets are a major cause of incidental catch of loggerhead turtles off the Balearic Islands from locally based boats.

The data from the aerial surveys provide a minimum population size for turtles over the continental shelf of the Balearic Islands. However, the actual population size should be larger, as turtles are known to spend more than 50% of their time submerged (Gómez de Segura et al., 2003). Unfortunately, as the actual percentage of time that turtles remain at surface while off the Balearic Islands is unknown, absolute population

size cannot be calculated (Marsh et al., 1989). Despite this shortcoming, aerial survey data stress the relevance of lobster trammel nets as a threat for turtle conservation in the area, because turtle by-catch and turtle population size are roughly at the same order of magnitude. The aerial surveys covered only the continental shelf and hence are uninformative about turtle abundance off-shore, where drifting longlines are deployed.

The relevance of lobster trammel nets becomes even more evident when the high mortality rate of loggerhead turtles entangled in the gear is considered. Fishermen and onboard observers coincided in that most of the turtles entangled in these nets were found dead, whereas those hooked by drifting longlines were released alive. Similar results were reported by Delaugerre (1987), Laurent (1991) and Aguilar et al. (1995). Although some post-release mortality is likely, this is usually considered to be low (Polovina et al., 2000), with long-term survival chances that probably exceed 50% (Aguilar et al., 1995; NMFS-SEFSC, 2001). The combination of a survival rate of 50% (Aguilar et al., 1995) with an annual catch of 15,000 turtles by longliners (Mayol et al., 1988; Aguilar et al., 1995; Camiñas, 1988) yields an annual absolute mortality in the whole western Mediterranean of about 7,500 turtles. On the other hand, lobster trammel nets kill about 152 specimens in the Balearic Archipelago, which suggests that a few thousands are killed yearly by lobster trammel nets in the whole western Mediterranean. The conclusion is that lobster trammel net may be the second most relevant mortality cause in the basin.

Although detailed information about loggerhead stock size in the whole western Mediterranean is required to assess the relevance of the mortality due to by-catch, precise data on the origin of the turtles is relevant as well. Genetic data indicate that the turtles in the western Mediterranean originate from North-American and eastern Mediterranean rookeries (Laurent et al., 1993, 1998; Laurent and Lescure, 1995; Casale et al., 2002). In this scenario, the Balearic Islands may act as a sink for the population that nests in the eastern Mediterranean because of its small size (Broderick et al., 2002), whereas the impact of by-catch mortality on the much larger North-American population (NMFS-SEFSC, 2001) is probably negligible. However, this conclusion is premature, as haplotypic frequencies observed to date in the western Mediterranean may also be explained by an Atlantic origin alone. Further genetic research is needed to clarify the actual impact of the catches.

An intriguing result is the uneven vulnerability of turtles to fishing gear within the archipelago. Loggerheads are taken in larger numbers in south-eastern Majorca and south-eastern Minorca because of greater populations in these areas, as indicated by relative density data obtained through the aerial surveys. However,

the above-average vulnerability observed in the remaining grounds off Minorca cannot be explained by greater densities as no turtle was recorded there by the aerial surveys, hence suggesting that these grounds have a small stock of turtles. Although the loggerheads can dive deeper than 200 m, they usually remain at much shallower depths (Lutcavage, 1997; Houghton et al., 2002). Trammel nets are usually deployed deeper than 100 m off Majorca and the Pitiüses, while off Minorca they are usually set as shallow as 50 m, thus favouring the take of turtles. Detailed information on diving behaviour of the loggerhead turtle off the Balearic Islands is needed to investigate this hypothesis.

Acknowledgements

The *Fundació Centre d'Iniciatives i Investigacions Europees en el Mediterrani* (CIREM) assisted the authors with the questionnaire design. The authors thank Joan Gonzalvo, Mónica Revelles, Àlex Noheda, Maria Valls, Elena Abella, Pilar Closas, Irene Álvarez and Silvia Scali for their help with the field work. Raquel Goñi, Enric Massutí, Josep Maria Brotons and Aina Moll kindly provide us with supplementary information on incidental by-catch. The *Fundació pel Desenvolupament Sostenible* provided logistic support for the fieldwork. This study was funded by the EU project "Protección de Praderas de Posidonia en LICs de Baleares" LIFE00NAT/E/7303.

References

- Aguilar, R., Mas, J., Pastor, X., 1995. Impact of the Spanish swordfish longline fisheries on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* population in the western Mediterranean. In Proceedings of the 12th Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation, eds. J.I. Richardson, T.H. Richardson, pp 1-6. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-361.
- Broderick, A.C., Glen, F., Godely, B.J., Hays, C., 2002. Estimating the number of green and loggerhead turtles nesting annually in the Mediterranean. *Oryx* 36(3), in press.
- Camiñas, J.A., 1988. Incidental Captures of *Caretta caretta* (L.) with surface longlines in the Western Mediterranean. *Rapports et process-Verbaux des Réunions de la Commission Internationale Pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée* 31 (2), 285. CIESM, Montecarlo.
- Camiñas, J.A., de la Serna, J.M., 1995. The Loggerhead distribution in the Western Mediterranean Sea as deduced from captures by the Spanish Long Line Fishery. In: Llorente, G., Montori, A., Santos, X., Carretero, M.A. (Eds.), *Scientia Herpetologica. Asociación Herpetológica Española*, Barcelona, pp. 316–323.
- Casale, P., Laurent, L., Gerosa, G., Argano, R., 2002. Molecular evidence of male-biased dispersal in loggerhead turtle juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 267, 139–145.
- Crouse, D.T., Crowder, L.B., Caswell, H., 1987. A stage-based population model for loggerhead sea turtles and implications for conservation. *Ecology* 68 (5), 1412–1423.

- Crowder, L.B., 1990. Community ecology. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, pp. 609–632.
- Cuadras, C.M., 1983. *Problemas de probabilidad y estadística*. PPU, Barcelona.
- Delaugerre, M., 1987. Statut des Tortues marines de la Corse et de la Méditerranée. *Vie et Milieu* 37, 243–264.
- Eckert, K.L., Bjørndal, F.A., Abreu-Grobois, Donnelly, M., eds., 2000. *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación n° 4.
- Godley, B.J., Gücü, A.C., Broderick, A.C., Furness, R.W., Solomon, S.E., 1998. Interaction between marine turtles and artisanal fisheries in the eastern Mediterranean: a probable cause for concern? *Zoology in the Middle East* 16, 48–64.
- Gómez de Segura, A., Tomás, J., Pedraza, S.N., Crespo, E.A., Raga, J.A., 2003. Preliminary patterns of distribution and abundance of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, around Columbretes Islands Marine Reserve, Spanish Mediterranean. *Marine Biology* 143, 817–823.
- Greenwood, J.J., 1996. Basic techniques In *Ecological census techniques*, ed. Sutherland, W.J., 11–110. Cambridge University Press.
- Groombridge, B., 1990. Marine turtles in the Mediterranean: distribution, population status, conservation. *Nature and Environment Series (Council of Europe)* 48, 1–98.
- Houghton, J.D.R., Broderick, A.C., Godley, B.J., Metcalfe, J.D., Hays, G.C., 2002. Diving behaviour during the interesting interval for loggerhead turtles *Caretta caretta* nesting in Cyprus. *Marine Ecology Progress Series* 227, 63–70.
- Iglesias, M., Martorell, J.M., 1990. La pêche artisanale dans la région Baléare. Rapports et procès-verbaux des réunions de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée 32 (1), 254.
- King, M., 1995. *Fisheries Biology, Assessment and Management*. Fishing News Books, Oxford.
- Laurent, L., 1991. Les tortues marines des côtes françaises méditerranéennes continentales. *Faune de Provence (C.E.E.P.)* 12, 76–90.
- Laurent, L., Lescure, J., 1995. Attempt of spatial-temporal pattern distribution of Loggerhead Turtle in the Mediterranean. In: Llorente, G., Montori, A., Santos, X., Carretero, M.A. (Eds.), *Scientia Herpetologica*. Asociación Herpetológica Española, Barcelona, pp. 324–327.
- Laurent, L., Casale, P., Bradai, M.N., Godley, B.J., Gerosa, G., Broderick, A.C., Schroth, W., Schierwater, B., Levy, A.M., Freggi, D., Abd el-Mwla, E.M., Hadoud, D.A., Gomati, H.E., Domingo, M., Hadjichristophorou, M., Kornaraki, L., Demirayak, F., Gautier, C., 1998. Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery by-catch: a case study in the Mediterranean. *Molecular Ecology* 7, 1529–1542.
- Laurent, L., Lescure, J., Excoffier, L., Bowen, B., Domingo, M., Hadjichristophrou, M., Kornaraki, L., Trabuchet, G., 1993. Genetic studies of relationships between Mediterranean and Atlantic populations of loggerhead turtle *Caretta caretta* with a mitochondrial marker. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Sciences de la Vie* 316, 1233–1239.
- Lien, J., Stenson, G.B., Carver, S., Chardine, J., 1994. How many did you catch? The effect of methodology on bycatch reports obtained from fishermen. *Reports of the International Whaling Commission (Special Issue)* 15, 535–540.
- Lutcavage, M.E., Lutz, P.L., 1997. Diving Physiology. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Marine Science Series, pp. 387–410.
- Lutcavage, M.E., Plotkin, P., Witherington, B., Lutz, P.L., 1997. Human Impacts on Sea Turtle Survival. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Marine Science Series, pp. 387–410.
- Marsh, H., Saalfeld, W.K., 1990. The distribution and abundance of dugongs in the Great Barrier reef Marine Park south of cape Bedford. *Australian Wildlife Research* 17, 511–524.
- Marsh, H., Sinclair, D.F., 1989. Correcting for visibility bias in strip transect aerial surveys of aquatic fauna. *Journal of Wildlife Management* 53 (4), 1017–1024.
- Mayol, J., Muntaner, J., Aguilar, R., 1988. Incidencia de la Pesca Accidental sobre las Tortugas Marinas en el Mediterráneo Español. *Butlletí de la Societat d'Història Natural de les Balears*, 32, 19–31. Palma de Majorca.
- Mejías, R. I., Amengual, J., 2001. *Llibre vermell dels Vertebrats de les Balears*, 2nd edn. Govern de les Illes Balears. Conselleria de Medi Ambient.
- Nichols, W.J., Resendiz, A., Mayoral-Russeau, C., 1999. Biology and conservation of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in Baja California, Mexico. In *Proceedings of the Nineteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. Kalg, H.J., Wibbels, T. Compilers U.S. Department of Commerce NOAA. Technical Memorandum NMFS-SEFSC-443, 169–171.
- NMFS-SEFSC (National Marine Fisheries Service- South East Fisheries Science Center), 2001. Stock Assessments of loggerhead and leatherback sea turtles and assessment of the impact of the pelagic longline fishery on the loggerhead and leatherback sea turtles of the western North Atlantic. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC 455, 343pp.
- NRC (National Research Council), 1990. *Decline of the Sea Turtles: Causes and Prevention*. National Academy Press, Washington DC. 259 pp.
- Polovina, J.J., Kobayashi, D.R., Parker, D.M., Seki, M.P., Balazs, G.H., 2002. Turtle on the edge: movement of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along oceanic fronts, spanning longline fishing grounds in the central North Pacific, 1997–1998. *Fisheries Oceanography* 9, 71–82.
- Pritchard, P.C., 1997. Evolution, Phylogeny, and Current status. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Marine Science Series, pp. 1–28.
- Silvani, L., Gazo, M., Aguilar, A., 1999. Spanish driftnet fishing and incidental catches in the western Mediterranean. *Biological Conservation* 90, 79–85.
- Strauss, R.E., 1979. Reliability estimates of Ivlev's electivity index, the forage ratio, and a proposed linear index of food selection. *Transactions of the American Fisheries Society* 111, 517–522.
- Witzell, W.N., 1999. Distribution and relative abundance of sea turtles caught incidentally by the U.S. pelagic longline fleet in the western North Atlantic Ocean, 1992–1995. *Fisheries Bulletin* 97, 200–211.

ANEXO 1:

Evaluación de las capturas accidentales de tortugas por la flota pesquera de
Baleares. Proyecto Life.

Nombre encuestador: _____

Fecha: _____

Nº encuesta: _____

Puerto/localidad: _____ *Isla:* _____

A. Datos encuestado

1.-¿Cuál es su edad?

2.-¿Qué estudios ha realizado?

3.-¿Cuál es su profesión o cargo que desempeña?

4.-¿En que año empezó a trabajar en este oficio?

5.-¿En qué año empezó a trabajar en este empleo? (*<1 año*) Meses:

B. Actividad

6.-Nombre embarcación:

7.-Eslora:

8.-TRB:

9.-Tripulación (nº):

10.-En este último año: ¿Qué tipo/s de arte ha empleado? (*respuesta múltiple*)

- | | | |
|---------------------------|-----------------|------------|
| 1. Arrastre de fondo | 10. Jonquillera | |
| 2. Cerco | 11. Trasmallo | 9.1 2/3 pp |
| 3. Nasa | | 9.2 4/6 pp |
| 4. Llampuguera | | 9.3 7/8 pp |
| 5. Moruna | 12. Almadraba | |
| 6. Almadrabilia | 13. Otros | |
| 7. Palangre de superficie | 14. No contesta | |

8. Palangre de fondo

9. Solta

11.-En este último año: ¿Cuál ha sido la temporada y la zona en que ha empleado cada arte?

Arte 1 (especificar)

Zona:

E F M A M J J A S O N D

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Arte 2 (especificar)

Zona:

E F M A M J J A S O N D

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Arte 3 (especificar)

Zona:

E F M A M J J A S O N D

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Arte 4 (especificar)

Zona:

E F M A M J J A S O N D

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

C. Conocimiento de la especie y del problema

12.-¿Conoce esta especie? (*Caretta caretta*)

1 Sí

2 No

13.-¿ En qué época/s del año se ven tortugas?

p: pocas a: algunas m: muchas

E F M A M J J A S O N D

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

14.- ¿En qué época/s del año es habitual capturar tortugas? p: pocas a: algunas m: muchas

E F M A M J J A S O N D

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

15.-En su opinión, ¿cuál es la evolución de la frecuencia con que se observan?

- 1 Hace mucho no veo ninguna
- 2 Cada vez es menos frecuente verlas
- 3 Se mantiene
- 4 Cada vez es más frecuente verlas

16.-En su opinión, ¿cómo cree que evoluciona la población de tortugas?

- 1 Aumenta
- 2 Se mantiene
- 3 Disminuye
- 4 Disminuye

(en caso de que opine que disminuyen o no hayan visto ninguna en mucho tiempo, pregunta 17; sino, pasar directamente a la 18)

17.-En su opinión: ¿Cuál cree que es el motivo de que no se vean o haya disminuido su número?

1 Se capturan accidentalmente con ciertos artes de pesca:

- a Sí
- b No

(en caso afirmativo)

¿Cual/es? (respuesta múltiple)

1. Arrastre de fondo	10. Jonquillera	
2. Cerco	11. Trasmallo	9.1 2/3 pp
3. Nasa		9.2 4/6 pp
4. Llampuguera		9.3 7/8 pp
5. Moruna	12. Almadraba	
6. Almadrabilla	13. Otros	
7. Palangre de superficie	14. No contesta	
8. Palangre de fondo		
9. Solta		

2 Han migrado a otras zonas.

3 Otros ¿cuáles? _____

C.1. Captura involuntaria de tortugas

18.-En su opinión, ¿cuáles son las causas que originan estas capturas involuntarias?

19.-¿Cree que la captura está directamente relacionado con algún tipo de arte de pesca?

Sí

No

(en caso afirmativo) ¿Cual/es? (respuesta múltiple)

1. Arrastre de fondo	10. Jonquillera	
2. Cerco	11. Trasmallo	9.1 2/3 pp
3. Nasa		9.2 4/6 pp
4. Llampuguera		9.3 7/8 pp
5. Moruna	12. Almadraba	
6. Almadrabilla	13. Otros	
7. Palangre de superficie	14. No contesta	
8. Palangre de fondo		
9. Solta		

20.- *¿Sabe que las tortugas capturadas no siempre están muertas?*

Sí

No

(en caso afirmativo, pregunta 21; sino, pregunta 22)

21.- *¿En qué arte de pesca de los que ocasionalmente capturan tortugas es más frecuente que éstas aparezcan muertas?*

1. Arrastre de fondo	10. Jonquillera	
2. Cerco	11. Trasmallo	9.1 2/3 pp
3. Nasa		9.2 4/6 pp
4. Llampuguera		9.3 7/8 pp
5. Moruna	12. Almadraba	
6. Almadrabilla	13. Otros	
7. Palangre de superficie	14. No contesta	
8. Palangre de fondo		
9. Solta		

22.- *En su opinión, ¿cómo cree que evoluciona la captura involuntaria de tortugas?*

- ₁ Aumenta
- ₂ Se mantiene
- ₃ Disminuye

23.-¿En el último año ha capturado involuntariamente alguna tortugas durante las faenas de pesca?

- ₁ Sí Cuantas _____ ¿En qué época? _____
- ₂ No
- ₃ No contesta

24.-¿Con qué arte de pesca? Indicar cuantas con cada arte y su estado (vivas/muertas)

- | | | |
|---------------------------|-----------------|------------|
| 1. Arrastre de fondo | 10. Jonquillera | |
| 2. Cerco | 11. Trasmallo | 9.1 2/3 pp |
| 3. Nasa | | 9.2 4/6 pp |
| 4. Llampuguera | | 9.3 7/8 pp |
| 5. Moruna | 12. Almadraba | |
| 6. Almadrabilla | 13. Otros | |
| 7. Palangre de superficie | 14. No contesta | |
| 8. Palangre de fondo | | |
| 9. Solta | | |

C.2. Muerte voluntaria: consumo de carne

25.-¿Actualmente, se utiliza carne de tortuga para consumo propio?

- ₁ Sí
- ₂ No
- ₃ No contesta

(en caso afirmativo, ir a la pregunta 26; en caso contrario, pregunta 34)

26.-¿Qué especie/s? (respuesta múltiple)

1 Tortuga boba

2 Otras

27.-¿En qué tipo de actividad pesquera se producen las capturas?

- | | | |
|---------------------------|-----------------|------------|
| 1. Arrastre de fondo | 10. Jonquillera | |
| 2. Cerco | 11. Trasmallo | 9.1 2/3 pp |
| 3. Nasa | | 9.2 4/6 pp |
| 4. Llampuguera | | 9.3 7/8 pp |
| 5. Moruna | 12. Almadraba | |
| 6. Almadrabilla | 13. Otros | |
| 7. Palangre de superficie | 14. No contesta | |
| 8. Palangre de fondo | | |
| 9. Solta | | |

28.-¿Cuál es la extensión de esta práctica?

1 Nula

2 Minoritaria

3 Bastante extendida

4 Mayoritaria

29.-Entre quienes consumen carne de tortuga, ¿con qué frecuencia lo hacen?

1 Siempre o casi siempre que capturan una tortuga

2 Con relativa frecuencia

3 Ocasionalmente

30.-En su opinión, ¿cuál es la evolución del consumo de carne de tortuga en las embarcaciones?

1 Aumenta

2 Se mantiene

3 Disminuye

31.-¿Existe demanda de carne de tortuga por personas no relacionadas con la pesca?

1 Sí

2 No

3 No contesta

(en caso afirmativo, pasar a las preguntas 30 y 31; sino, a la 32)

32.-En su opinión, ¿cuál es la evolución de esta demanda?

1 Aumenta

2 Se mantiene

3 Disminuye

33.-¿Se capturan tortugas a propósito para satisfacer dicha demanda o se emplean las capturas accidentales?

1 Se capturan a propósito

2 Sólo se utilizan las capturas accidentales

3 No contesta

C.3. Muerte voluntaria: otras causas

34.-¿Sabe de casos de muerte de tortugas para otras finalidades que no sean las del consumo?
(si no sabe o duda, dar pistas)

1 Sí

2 No (fin del cuestionario)

35.-¿Con qué finalidad?

- 1 Método disuasorio
- 2 Como cebo
- 3 Por la concha
- 4 Otros, ¿cual/es? _____

36.-Si se emplea como método disuasorio, ¿qué desea protegerse?

- 1 El arte
- 2 El cebo
- 3 Especies de interés comercial ¿cual/es? _____

37.-¿En qué tipo de actividades pesqueras se producen las capturas?

- | | | |
|---------------------------|-----------------|------------|
| 1. Arrastre de fondo | 10. Jonquillera | |
| 2. Cerco | 11. Trasmallo | 9.1 2/3 pp |
| 3. Nasa | | 9.2 4/6 pp |
| 4. Llampuguera | | 9.3 7/8 pp |
| 5. Moruna | 12. Almadraba | |
| 6. Almadrabilla | 13. Otros | |
| 7. Palangre de superficie | 14. No contesta | |
| 8. Palangre de fondo | | |
| 9. Solta | | |

38.-Al margen de las capturas con el arte de pesca, ¿qué técnica/s se utiliza/n para capturarlas?

- 1 Arpones
- 2 Escopetas
- 3 Dinamita
- 4 Petardos
- 5 Otros
- 6 No contesta

39.-¿Cuál es la extensión de esta práctica?

- 1 Nula
- 2 Minoritaria
- 3 Bastante extendida
- 4 Mayoritaria

40.-Entre quienes realizan estas prácticas, ¿con qué frecuencia lo hacen?

- 1 Es muy habitual
- 2 Se realiza con relativa frecuencia
- 3 Ocasional

41.-En su opinión, ¿cuál es su evolución?

- 1 Aumenta
- 2 Se mantiene
- 3 Disminuye

Fin del cuestionario

Agradecimientos

"Donde una puerta se cierra, otra se abre".
Miguel de Cervantes (1547-1616); escritor español