

**CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA
DE LA TORTUGA SABANERA
Podocnemis vogli (Reptilia: Testudinata: Podocnemididae)**

**Cytogenetic Characterization of the Savannah Sideneck Turtle
Podocnemis vogli (Reptilia: Testudinata: Podocnemididae)**

ORTIZ, ML., RODRÍGUEZ, PA., BUENO, ML.
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,

intercalary band inserted in the short arms which could be visualized in interphase as one or two nucleoli. The C band technique allowed heterochromatic regions to be located in chromosomes associated with pericentromeric regions. Some heterochromatic polymorphisms (intercalary bands) were identified in chromosomes 1, 2, 3 and 7, leading to the supposition that there are chromosome markers which could be associated with different *P. vogli* populations within their geographic distribution.

sobre *P. vogli*, el objetivo de este estudio fue complementar el trabajo de Rhodin *et al.* (1978) al aportar una caracterización más detallada del cariotipo de la especie, teniendo en cuenta el carácter de especie en algún grado de amenaza de extinción (UICN) y la necesidad de estudios a nivel genético que permitan caracterizar las poblaciones que son sometidas a explotación antrópica. Estudios futuros podrían permitir la reubicación de ejemplares decomisados en sus hábitats naturales.

a 30° C por 45 min. Adicionar lentamente 1 ml de fijador Carnoy frío (metanol 6: ácido acético glacial 1). Tapar el tubo, mezclar suavemente por inversión tres o cuatro veces y centrifugar 10 min a 1.200 rpm. Descartar el sobrenadante con pipeta Pasteur dejando más o menos 0,4 ml. Soltar el botón celular. Añadir 1

Longitud relativa del cromosoma (Hrl)

$Hrl = (\text{Longitud del cromosoma total} / \text{Sumatoria de la longitud de los cromosomas del conjunto haploide}) \times 100$

Longitud relativa del brazo

$Hrl\ q\ o$

Par	Grupo	Hrl q		Hrl p		Hrl Cromosoma		I.C.		Relación de Brazos	

Por otra parte, la eliminación del grupo D de Rhodin *et al.* (1978), se fundamentó en la organización comúnmente empleada para la mayoría de reportes sobre la citogenética de Quelonios, donde tradicionalmente se presentan tres grupos de cromosomas siguiendo el criterio de tamaño y morfología de los mismos (Ayres *et al.*, 1969; Bickham, 1975). Para *P. vogli* encontramos un número fundamental de 50, reducción originada por el incremento en el número de cromosomas acrocéntricos y la correspondiente disminución en un submetacéntricos. Al nivel del número y morfología cromosómica observada en Giemsa, no se encontraron

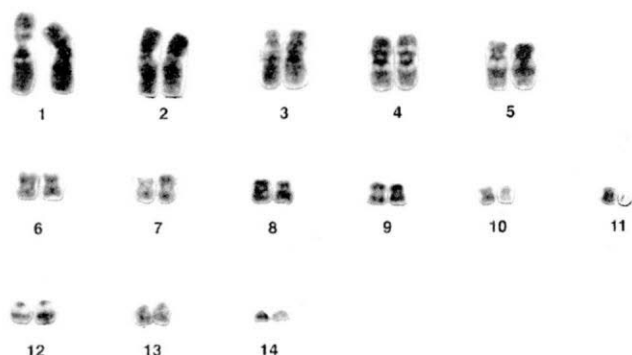


Figura 4. Cariotipo de *P. vogli* (ejemplar B) en Banda G.

fotografiadas. En el cariotipo de *P. vogli* se presentó un buen número de bandas que fueron constantes para todos los individuos analizados. La porción distal del cromosoma 3, es representada en el ideograma como una banda gris, pero puede tener una coloración diferente, dependiendo del grado de condensación de la metafase (Fig. 4). Los cromosomas del grupo B presentaron coloración G positiva en las porciones distales de brazos p y q; G negativa en las regiones centroméricas. Solamente en el cromosoma 8 se observaron dos bandas en brazos q, separadas por una banda G negativa delgada. Todos los elementos del grupo C, formado por los tres cromosomas acrocéntricos, presentaron una banda G positiva en la porción distal de los brazos q y en la región centromérica (Figs. 4 y 5).

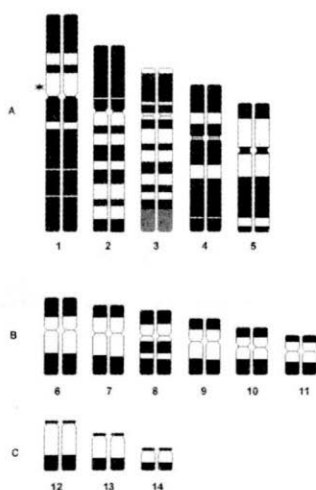


Figura 5. Ideograma del patrón en Banda G del cariotipo de *P. vogli*. *Ubicación de las regiones organizadoras nucleolares.

Bandas Q. El patrón observado en las metafases con bandas Q coincidió con el mostrado para las bandas G, pero con una menor resolución en la discriminación del número de bandas. Todos los cromosomas presentaron las regiones centroméricas

opacas y no se observó una relación entre bandas Q positivas y las porciones heterocromáticas, que para todos los cromosomas correspondieron a bandas Q negativas. En el grupo B se observan telómeros brillantes que fueron coincidentes con la banda G positiva característica de este grupo (Fig. 6).

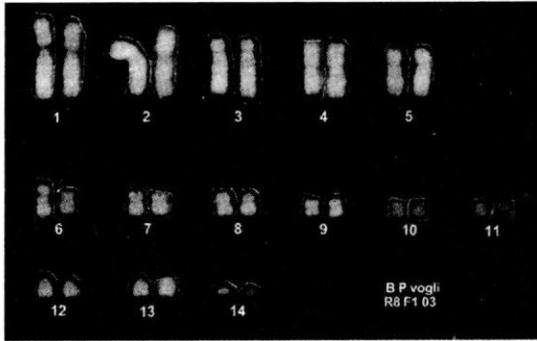


Figura 6. Cariotipo de bandas de fluorescencia Q en *P. vogli* (ejemplar B).

Regiones organizadoras nucleolares. Se encontró un par cromosómico (Fig. 3B) portador de las regiones organizadoras nucleolares (NOR). Este se ubicó en los brazos cortos del cromosoma uno, en el tercio proximal al centrómero que coincide con una banda G negativa (Fig. 4). La posición del NOR en el primer par es muy cercana a la banda C positiva intercalar del brazo corto. En coloración convencional con Giemsa, se observó una región acromática que fue asociada con una fragilidad. En células interfásicas (Fig. 3C) se presentaron uno a dos nucleólos, predominando las células con la última condición, por lo que los dos homólogos pueden o no asociarse en interfase para formar un solo nucleólo. Bickham y Rogers (1985) estudiaron los NOR en la familia *Chelydridae*, suborden *Criptodira*, filogenéticamente más cercana a los *Podocnemididae* (Shaffer *et al.*, 1997), en metafases obtenidas a partir de técnicas directas en preparaciones de fibroblastos y tejido cardíaco, observaron los NORs en un macrocromosoma submetacéntrico y acrocéntrico en *Macroclermys temminckii* y *Chelydra serpentina* respectivamente, en posición intersticial en ambos casos, asociado a una constricción secundaria, a una banda C positiva y a una banda G negativa, lo que sugiere cierta similitud con el único cromosoma portador de NOR identificado para *P. vogli*.

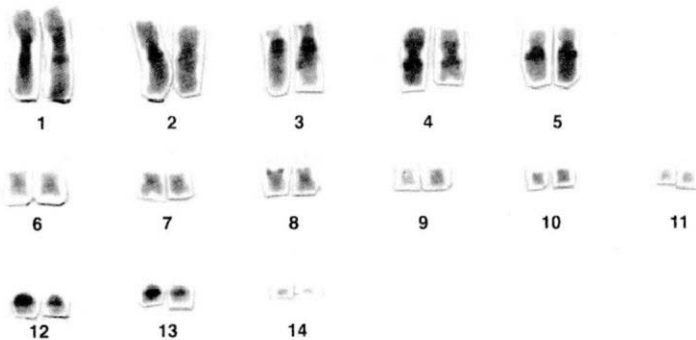


Figura 7. Cariotipo de *P. vogli* (ejemplar B) en banda C.

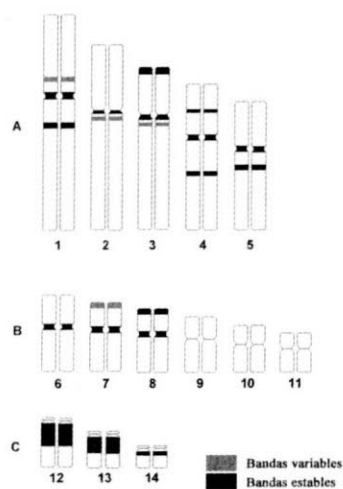


Figura 8. Ideograma del patrón base para banda C en *P. vogli* mostrando las regiones heterocromáticas en negro. En gris se presentan las bandas variables.

Bandas C. La heterocromatina constitutiva presentó un patrón característico con poca heterocromatina centromérica. En los grupos B y C no se observó claramente. Había bloques de heterocromatina intercalar, telomérica y en la región pericentromérica, en varios cromosomas. El primer par además de la banda de heterocromatina centromérica poseía bandas intercalares delgadas en el tercio proximal de los brazos q y p (Figs. 7 y 8). En un ejemplar, el segundo par fue portador de un heteromorfismo de heterocromatina constitutiva, ya que en uno de los homólogos se observó una duplicación de la banda centromérica, en tanto que en el otro se visualizaba una sola banda. El tercer par se caracterizó por poseer tres bandas de heterocromatina, una telomérica en los brazos p muy delgada y tenue, pero se encontró en todos los ejemplares analizados; una banda pequeña en el centrómero; y otra en los brazos largos muy cercana del centrómero (región pericentromérica).

El cuarto par poseía también tres bandas, dos bandas pericentroméricas equidistantes del centrómero en ambos brazos y una pequeña banda centromérica. El quinto par presentó un patrón muy similar al descrito para el cromosoma tres, sin la banda telomérica en los brazos cortos. En el grupo B los pares 6, 7 y 8 mostraron un pequeño bloque heterocromático centromérico, en tanto que en los pares 9 al 11 fue inconspicuo. Dentro de este grupo el par 8 sobresalió por presentar una banda telomérica en los brazos p. Los pares 12, 13 y 14 poseían bloques heterocromáticos en el tercio proximal de los brazos q, presentando coloración negativa para la banda C en la región centromérica (Fig. 8). Hasta donde se lograron correlacionar los patrones de heterocromatina con bandas Q, todos los segmentos de heterocromatina anteriormente descritos correspondieron a bandas opacas en Q (Fig. 7).

Variaciones de bandas C. Hubo variación intraespecífica en la distribución y cantidad de heterocromatina constitutiva. Los cromosomas 1, 2, 3 y 7 presentaron las variaciones en ausencia o presencia de bandas (Tabla 3).

Localización	Individuo				
	A	B	C	V3	V8
Cromosoma 1 banda intercalar en p	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-
Cromosoma 2 banda pericentromérica	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+
Cromosoma 3 banda pericentromérica en q	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
Cromosoma 7 banda telomérica en p	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-

Tabla 3. Variaciones de heterocromatina en *P. vogli*; -: ausencia; +: presencia de la banda en referencia.

DISCUSIÓN

Rhodin *et al.* (1978), realizaron el cariotipo de un ejemplar de *P. vogli* obtenido de la Estación de Biología Tropical Roberto Franco, proveniente de la localidad Pozo Llano Grande, Peralonso (Meta, Colombia) mediante técnicas directas, con tejidos de bazo y testículos. Estos autores organizaron el cariotipo en cuatro grandes grupos, del A al D. Aunque es difícil efectuar homologías con este trabajo dado que solo se presentó un cariotipo en coloración homogénea Giemsa, podemos sugerir similitudes como en la tabla 4, basándonos en la morfología de los cromosomas. Las diferencias aparentes en las categorías morfológicas de los cromosomas, según la posición del centrómero (Tabla 4, convenciones) pueden estar dadas simplemente porque Rhodin *et al.* (1978), no tuvieron la oportunidad de obtener metafases con diferentes grados de condensación, que les permitieran discernir con claridad la morfología del complemento mediante mediciones, al emplear la técnica directa con inyección de colchicina y sacrificio, que usualmente genera metafases muy condensadas sino se tiene adecuadamente estandarizado el protocolo. Como se muestra en la tabla 4, hay una gran homología en cuanto a la distribución de los cromosomas. La principal diferencia está en el número de pares acrocéntricos, tres para nuestros ejemplares *versus* dos en lo reportado por Rhodin *et al.* (1978), quienes incluyen el cromosoma más pequeño en el grupo C, asumiendo su morfología como metacéntrica. En nuestro análisis de un mayor número de metafases, 70 con respecto a uno de Rhodin *et al.* (1978), con grados de condensación adecuados (Fig. 2), es clara la morfología de este cromosoma como un acrocéntrico muy pequeño.

De acuerdo con Rhodin *et al.* (1978), los cariotipos de *P. vogli*, *P. expansa*, *P. unifilis*, *P. lewyana* y *P. sextuberculata*, son homogéneos con fórmula cariológica (A3: B2: C7: D2) y número fundamental de 52. Sin embargo, para *P. vogli* encontramos un número fundamental de 50, reducción originada por el incremento en el número de cromosomas acrocéntricos y la correspondiente disminución en un submetacéntrico. Esto sugiere que la morfología cariotípica de las otras especies del género *Podocnemis* debe ser reevaluada con estudios basados en cultivos celulares que permitan un análisis adecuado de los cromosomas más pequeños del cariotipo. El empleo de las técnicas de cultivo celular de linfocitos de sangre periférica permite obtener un alto número de metafases del individuo en diferentes grados de condensación para estudios morfológicos, sin el sacrificio del animal. Rhodin *et al.* (1978) realizaron técnicas directas para la obtención de metafases, por inyección de colchicina, y sacrificio del ejemplar para la obtención de tejidos

como bazo y testículos, que permiten obtener metafases. Por otra parte, Bickham y Rogers (1985) estudiaron los NOR en la familia *Chelydridae*, la más relacionada dentro de los *Criptodira* a los *Podocnemididae* (Shaffer *et al.*, 1997), en metafases obtenidas a partir de técnicas directas en preparaciones de fibroblastos y tejido cardíaco, observaron los NORs en un macrocromosoma submetacéntrico o acrocéntrico en *Macrolemmys temminkii* y *Chelydra serpentina* respectivamente. En posición intersticial en ambos casos asociado a una constricción secundaria, a una banda C positiva y a una banda G negativa, lo que sugiere cierta similitud con el único cromosoma portador de NOR identificado para *P. vogli*. Es decir posiblemente la ubicación de los NOR sería altamente conservada para estos grupos de quelonios.

GRUPO	Rhodin <i>et al.</i> , 1978	GRUPO	Presente trabajo
A Metacéntricos y submetacéntricos grandes	1	A Submetacéntricos y subtelocéntricos grandes	1
	2		2
	3		4
B Subtelocéntricos grandes	4		3
	5		5
C Metacéntricos y submetacéntricos pequeños	6	B Metacéntricos medianos y pequeños	6
	7		7
	8		8
	9		9
	10		10
	11		11
	12	C Acrocéntricos	14
D Acrocéntricos	13		13
	14		12

Tabla 4. Homologías en la organización del cariotipo modelo de *Podocnemis vogli*, entre el trabajo de Rhodin *et al.*, 1978 y el presente estudio.

Sobre las tortugas *Pleurodiras* no existen estudios acerca de la evolución cariológica dentro de la familia *Podocnemididae* y tampoco hay trabajos comparativos con bandas. Shaffer *et al.* (1997) y Noonan (2000) consideraron la familia *Podocnemididae* como primitiva y monofilética, con caracteres morfológicos sinapomórficos e incluyendo el cariotipo (Ayres *et al.*, 1969, Rhodin *et al.*, 1978). En los grupos más derivados de tortugas marinas y terrestres se han realizado un mayor número de estudios, que permitieron a Bickham (1981) efectuar un análisis cladístico para determinar la evolución cariológica en *Criptodiras*. En este análisis los cambios heterocromáticos constituyeron un factor discriminante, siendo muy frecuentes las adiciones heterocromáticas que se encuentran en casi todas las familias del suborden. El hallazgo de diferentes variaciones en las regiones heterocromáticas de *P. vogli* indica que pueden existir polimorfismos a

nivel cromosómico entre sus poblaciones. Esto no coincide con lo postulado por Bickham y Carr (1983), quienes sostuvieron que los quelonios como grupo están en un estancamiento evolutivo, al conseguir un máximo grado de adaptación y, por tanto, no existe variación a nivel cariológico dentro de las especies. Es interesante que en una muestra pequeña de esta especie, se encuentren variantes cromosómicas a nivel de heterocromatina, lo que permite sugerir que la especie es aún portadora de un nivel de variación genética significativo. Adicionalmente, la presencia de dos individuos heterocigotos, para al menos dos de las variantes heterocromáticas, indica que estas variaciones pueden constituir polimorfismos intraespecíficos. Los resultados y la distribución geográfica puntual, sugieren un modelo de diferenciación genética asociado a la distribución geográfica y los polimorfismos identificados podrían constituirse como marcadores cariológicos; aunque por el número reducido de ejemplares analizados no fuera posible hacer inferencias sobre la distribución geográfica de estos polimorfismos. Es importante por eso continuar los estudios genéticos sobre esta especie.

CONCLUSIONES

Se determinó la formula cariológica de *Podocnemis vogli* en 5:6:3; cinco pares submetacéntricos y subtelocéntricos (Grupo A), seis pares metacéntricos (Grupo B) y tres pares acrocéntricos (Grupo C), que difiere de la previamente descrita para esta especie por Rhodin *et al.* (1978) (3:2:7:2). A pesar de las diferencias en las fórmulas cariológicas los dos cariotipos son correspondientes. La única diferencia radica en la morfología de los cromosomas más pequeños, que en este estudio se demuestra corresponden a cromosomas acrocéntricos (pares 12, 13 y 14) aspecto que modifica la fórmula. Se determinan por primera vez los patrones de bandas C, G, NOR y Q para *Podocnemis vogli*, siendo este el primer estudio para el suborden *Pleurodira* a nivel de bandas cromosómicas, encontrando un solo cromosoma portador de NOR, correspondencia en los patrones de bandas Q-G y polimorfismos intraespecíficos en los patrones de bandas C. Se registra y localiza un sitio frágil en el primer par cromosómico para esta especie de quelonio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia, especialmente a la Estación de Biología Tropical Roberto Franco y la DINAIN, por su apoyo operativo y en la financiación de este trabajo, respectivamente. A los revisores de este trabajo y sus valiosos aportes para la depuración de la presentación del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

ALARCÓN P.H. 1969. Contribución al conocimiento de la morfología, ecología, comportamiento y distribución geográfica de *Podocnemis vogli*, Testudinata. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 13 (51): 303-329.

- ARRIGHI F.E., P.C., HSU. 1971. Localization of Heterochromatin in Human Chromosomes Cytogenetics. 10: 81-86.
- AYRES M., M.M. SAMPAIO, R.M. BARROS, L.V. DIAS, O.R. CUNHA. 1969. A Karyological Study of Turtles from the Brazilian Amazon Region. Cytogenetics. 8: 401-409.
- BICKHAM J.W. 1975. A Cytosystematic Study of Turtles in the Genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. Herpetologica. 31: 198-204.
- _____. 1981. Two Hundred Million Year Old Chromosomes: Deceleration of the Rate of Karyotypic Evolution in Turtles. Science. 212: 1.291-1.293.
- _____, J.L. CARR. 1983. Taxonomy and Phylogeny of the Higher Categories of Cryptodiran Turtles Based on a Cladistic Analysis of Chromosomal Data. Copeia. 1983: 918-932.
- _____, D.S. ROGERS. 1985. Structure and Variation of the Nucleolus Organizer Region in Turtles. Genetica. 67: 171-184.
- BULL J.J., J.M. LEGLER. 1980. Karyotypes of Side-Necked Turtles (Testudines: Pleurodira). Canadian Journal of Zoology. 58: 828-841.
- CASTAÑO-MORA O., F. MEDEM. 2002. *Podocnemis vogli*. Pp. 121 En: Castaño-Mora, O.V. (Ed.). Libro rojo de reptiles de Colombia. Libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional-Colombia. Bogotá, Colombia.
- CASPERSSON T., G. LOMAKKA, I. ZECH. 1971. The 24 Fluorescence Patterns of Human Metaphase Chromosomes. Distinguishing Characters and Variability. Hereditas. 67: 89-102.
- CLARK M.S., W.J. WALL. 1986. Phylogenetic Implications of Karyotypic Variation in the Batagurinae (Testudines: Emydidae). Genetica. 70: 89-106.
- DARNELL J., H. LODISH, D. BALTIMORE. 1988. Biología celular y molecular. Editorial Labor S.A., Barcelona.
- GOODPASTURE C., S.E. BLOOM. 1975. Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes Using Silver Staining. Chromosome. 58: 37-50.
- HONEGGER R.E., R.A. MITTERMEIER, A.G.J. RHODIN. 1985. In: Dollinger, CITES Ident. Manual 3: A-301.009.005.006: 1-2.
- HOWELL W.M., T.E. DENTON, J.R. DIAMOND. 1975. Differential Staining of the Satellite Regions of Human Acrocentric Chromosomes. Experientia. 31: 260-262.
- _____, D.A. BLACK. 1978. A Rapid Technique for Producing Silver Stained Nucleolus Organizer Regions and Tripsin Giemsa Bands on Human Chromosomes. Human Genetics. 43: 53-56.
- McBEE K., J.W. BICKHAM, A.J. RHODIN, R. MITTERMEIER. 1985. Karyotypic Variation in the Genus *Platemys* (Testudines: Pleurodira). Copeia 1985 445-449.
- MEDRANO L., M. DORIZZI, F. ROMBLLOT, C. PIEAU. 1987. Karyotype of the Sea-Turtle *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). Amphibia-Reptilia. 8: 171-178.
- NOONAN B.P. 2000. Does the Phylogeny of the Pelomedusoids Turtles Reflects Vicariance to Continental Drift. Journal of Biogeography. 27: 1.245-1.249.
- POUGH H., R. ANDREWS, J. CADLE, M. CRUMP, A. SAVÍTSKY, K. WELLS. 2001. Herpetology. Prentice Hall. New Jersey. USA.

- RAMO C. 1982. Biología del Galápagos (*Podocnemis vogli*, Müller, 1935) en el hato El Frío, Llanos de Apure (Venezuela). Doñana Acta Vertebrata. 9(3): 1-161.
- RHODIN A.J., R.A. MITTERMEIER, A.L. GARDNER, F. MEDEM. 1978. Karyotypic Analysis of the *Podocnemis* Turtles. Copeia 1978: 723-728.
- RODRÍGUEZ P.A., M.L. ORTIZ. 2003. Agentes mitogénicos para el cultivo de linfocitos en quelonios. Orinoquia. 7(1): 47-49.
- SEABRIGHT M. 1971. A Rapid Banding Technique for Human Chromosomes. Lancet. 2: 971.
- SHAFFER H.B., P. MEYLAN, M.L. MCKNIGHT. 1997. Tests of Turtle Phylogeny: Molecular, Morphological and Paleontological Approaches. Systematic Biology. 46: 235-268.
- SUMNER A.T. 1972. A Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterochromatin. Experimental Cell Research. 75: 304-306.