

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,
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

Presentado julio 29 de 2004, aceptado octubre 27 de 2004, correcciones enero 19 de 2005.

RESUMEN

Se estudiaron siete ejemplares de *Podocnemis vogli*, tres fueron colectados en las localidades de Puerto López y Puerto Gaitán, Meta, Colombia; cuatro carecen de datos de localidad. Todos los ejemplares presentaron un complemento constituido por 28 cromosomas, sin cromosomas sexuales, que se organizaron en tres grupos: el primero compuesto por cuatro pares submetacéntricos y uno subtelocéntrico, el segundo grupo por seis pares metacéntricos y el último grupo por tres pares acrocéntricos. Esta organización difiere de la descripción previa realizada por Rhodin *et al.* (1978), en la cual se encontraron dos pares acrocéntricos. Se describen los patrones de bandas C, G, NOR y Q para la especie. Las regiones organizadoras nucleolares se localizaron en el primer par cromosómico en una banda intercalar en brazos cortos, que se puede visualizar en interfase como uno o dos nucleolos. La técnica de bandas C permitió ubicar las regiones heterocromáticas de los cromosomas asociadas a regiones pericentroméricas. Se identificaron algunos polimorfismos heterocromáticos (bandas intercalares) en los cromosomas 1, 2, 3 y 7, los cuales permiten suponer la existencia de marcadores a nivel cromosómico, que pueden estar asociados con diferentes poblaciones de *P. vogli* dentro de su distribución geográfica.

Palabras clave: tortuga sabanera, *Podocnemis vogli*, citogenética.

ABSTRACT

Seven specimens of *Podocnemis vogli* were studied; three were collected at Puerto López and Puerto Gaitán in the Meta Department of Colombia, four lacks collecting data. All specimens presented a complement consisting of 28 chromosomes without sexual chromosomes. The first group was composed by four submetacentric pairs and one subtelocentric, the second group by six metacentric pairs and the third group by three acrocentric pairs, differing from the previous description by Rhodin *et al.* (1978) who found two acrocentric pairs. C, G, NOR and Q band patterns are described for the species. Nucleolar Organizer Regions were localized in the first chromosome pair in an

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.

Key words: Savanna turtle, *Podocnemis vogli*, Cytogenetics.

INTRODUCCIÓN

La familia *Podocnemididae* comprende tres géneros (*Podocnemis*, *Peltocephalus* y *Erymnochelys*) con especies distribuidas en Madagascar y Sudamérica (Shaffer *et al.*, 1997; Noonan 2000, Pough *et al.*, 2001). Todas son de régimen omnívoro y exclusivamente acuáticas, aunque en la época de postura de los huevos, las hembras abandonan el espejo de agua en busca de un lugar apropiado para la oviposición. En el género *Podocnemis* encontramos siete especies, una de ellas es el objeto de este estudio, *Podocnemis vogli* que se encuentra ubicada en el apéndice II del CITES (Honegger *et al.*, 1985) y en la categoría de casi amenazada según los criterios de la UICN (Castaño-Mora y Medem, 2002). En quelonios se han caracterizado cariológicamente cerca del 50% de las especies (Medrano *et al.*, 1987), no obstante, las poblaciones colombianas entre las que se cuentan varias especies endémicas, no han sido suficientemente estudiadas a este nivel. El trabajo de Rhodin *et al.* (1978) es el único estudio citogenético que se registra para *Podocnemis vogli*, en el que se empleó un solo ejemplar proveniente de la localidad Pozo Llano Grande, Peralonso (Meta, Colombia), al que se le inyectó colchicina y fue sacrificado, para la obtención de metafases en coloración homogénea Giemsa, a partir de tejido de bazo y testículo, lo cual aunque es un aporte importante, desconoce aspectos como la posible variabilidad cromosómica de la especie en cuanto a la estructura del complemento, al no emplear más tinciones y animales. Estos autores organizaron el cariotipo en cuatro grandes grupos del A al D. Aproximaciones al conocimiento biológico de *Podocnemis vogli* fueron realizadas por varios naturalistas en el siglo pasado, destacándose el de Alarcón (1969), sobre la ecología de diferentes poblaciones en Colombia y el de Ramo (1982) sobre la biología reproductiva de la especie en Venezuela.

La citogenética es fundamental en muchas áreas de las ciencias biológicas y su uso se ha incrementado en el análisis de un amplio rango de fenómenos genéticos (Clark y Wall, 1986). Las características cariológicas de una especie derivan del estudio de sus cromosomas, quienes portan la información genética y son la máxima manifestación del plegamiento del ADN (Darnell *et al.*, 1988). La variación cariotípica en las tortugas *Pleurodiras* es tipificada por una dicotomía de los números diploides entre la familia *Chelidae*, $2n=50-64$ con muchos cromosomas acrocéntricos (Bull y Legler, 1980, McBee *et al.*, 1985) y las demás familias del suborden, $2n=26-36$ con algunos cromosomas acrocéntricos (Bull y Legler, 1980, Rhodin *et al.*, 1978). Hasta el momento para el suborden *Pleurodira* no se ha identificado un sistema de determinación sexual cromosómico. Dado el escaso conocimiento biológico y en especial citogenético

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.

METODOLOGÍA

EJEMPLARES

Los ejemplares de estudio fueron siete individuos de *Podocnemis vogli* (seis adultos y un juvenil) que se encuentran en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) en Villavicencio, dentro de una colección viva de tortugas (Programa de Diversidad Genética y Gestión Sostenible de Fauna Silvestre). Los ejemplares se identifican por sus números EBTRF y por letras: A (Hembra), B (Hembra), C (Macho), D (Hembra), EBTRF V3 (Hembra), EBTRF V8 (Hembra), EBTRF V9 (Macho, juvenil). De estos animales, tres poseen datos de localidad: Puerto Gaitán, río Manacacias ($72,1^{\circ}$ oeste $4,2^{\circ}$ latitud norte) para el ejemplar EBTRF V9 y Puerto López, Vereda La Balsa (73° oeste 4° latitud norte) para los ejemplares C y D, departamento del Meta, Colombia.

Ejemplar	Localidad
A	Desconocida
B	Desconocida
C	Puerto López
D	Puerto López
V3	Desconocida
V8	Desconocida
V9	Puerto Gaitán

Tabla 1. Localidades de colección de los ejemplares estudiados de *P. vogli*.

OBTENCIÓN DE METAFASES

Se empleó la técnica desarrollada por Rodríguez y Ortiz (2003) para la obtención de cromosomas en quelonios.

Protocolo de cultivo. Extraer 2 a 5 ml de sangre heparinizada con Liquemine (Roche 5.000 UI/ml) y transferir, en condiciones estériles, a un tubo de ensayo y centrifugar a 400 rpm por 2 min. Decantar por gravedad durante 40 min. Del sobrenadante obtenido en el paso anterior, sembrar 1 ml en un frasco estéril que contenga 4 ml de medio de cultivo TC 199, suero fetal bovino al 20% (1ml) y 0,4 ml de fitohemaglutinina P (0,07%). Incubar 94 horas a 30° C.

Protocolo de cosecha. Adicionar 20 μ l de Colchicina (0,016%) a cada cultivo de 5 ml e incubar por 40 min a 30° C. Transvasar el contenido a un tubo de centrífuga y llevar a 1.200 rpm durante 10 min. Descartar el sobrenadante con una pipeta Pasteur dejando más o menos 0,5 ml. Soltar el botón celular (con la mano, varios golpes suaves). Agregar solución de KCl 0,05M (30° C) hasta 10 ml, resuspender con la pipeta. Incubar

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 ml de fijador (Carnoy; 3:1) lentamente, por las paredes del tubo sin mezclar ni resuspender; agregar más fijador (Carnoy; 3:1) por las paredes hasta completar 4 ml y esperar 2 min. Resuspender con la pipeta hasta que se homogenice, dejar a temperatura ambiente por 30 min. Resuspender y centrifugar a 1.200 rpm durante 10 min, descartar el sobrenadante, soltar el botón celular, agregar 4 ml de fijador (Carnoy; 3:1) y resuspender, esperar 15 min. Centrifugar a 1.200 rpm durante 10 min, descartar el sobrenadante, soltar el botón celular, agregar 4 ml de fijador (Carnoy; 3:1), resuspender y esperar 15 min. Centrifugar a 1.200 rpm por 10 min, descartar el sobrenadante, soltar el botón celular, agregar 2 ml de fijador (Carnoy; 3:1) y resuspender. Extender de dos a cinco láminas. Guardar las preparaciones en cajas apropiadas por uno o varios días, para luego aplicarles las técnicas de bandeamiento.

TÉCNICAS DE BANDEAMIENTO

Banda G. Técnica de Seabright (1971) con un tiempo de tripsina de 15 s y un tiempo de envejecimiento de láminas de cinco días.

Banda C. Técnicas de Arrighi y Hsu (1971) y Sumner (1972), con un tiempo en HCl de una hora, incubación en hidróxido de bario a 56° C por 8 min y 2 x SSC a 53° C por una hora.

Banda NOR. Técnicas de Goodpasture y Bloom (1975), temperatura de incubación a 30° C; y Howell *et al.* (1975) y Howell y Black (1978) con temperatura de incubación a 40° C.

Banda Q. Técnica de Caspersson *et al.* (1971) con tiempo de incubación en quinacrina de 10 min.

IDEOGRAMA

Para la realización del ideograma se midieron 70 metafases, diez de cada individuo, en coloración Giemsa y preparaciones con bandeamiento G, C, seleccionadas para digitalización, con el programa ATI con un microscopio Leitz e interfase al hardware. Sobre las metafases se midió la longitud de los cuatro brazos cromosómicos empleando el programa *Adobe Photoshop* 6.0. Las medidas obtenidas para cada metafase se procesaron en hoja de cálculo *Excel* 2000, para obtener el promedio de la longitud de los brazos p y q, la relación de brazos, el índice centromérico, la longitud relativa del cromosoma y de los brazos, cuyas fórmulas son:

Longitud promedio del brazo

$$q = (q_1+q_2)/2 \quad p = (p_1+p_2)/2$$

Índice centromérico (I.C.)

$$I.C. = (\text{Longitud del brazo corto del cromosoma (p)} / \text{Longitud total del cromosoma (q+p)}) \times 100$$

Relación de brazos (R)

$$R = q/p$$

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

$Hrl q o p = (\text{Longitud del brazo (q o p)} / \text{Sumatoria de la longitud de los cromosomas del conjunto haploide}) \times 100$

Dado que el género *Podocnemis* ha sido poco estudiado y los reportes existentes de la fórmula cariológica difieren de acuerdo al autor, en este trabajo se empleó el criterio morfológico como el carácter diagnóstico para los grupos cromosómicos y en segunda medida, el tamaño de los cromosomas dentro del complemento. Esta organización ha sido tradicionalmente empleada en quelonios (Ayres *et al.*, 1969, Bickham, 1975). Posteriormente, se elaboró el ideograma, con base en los promedios obtenidos de las mediciones para cada par cromosómico en todos los individuos, empleando las gráficas obtenidas en el programa *Excel* 2000. El Grupo A comprende los cromosomas de mayor tamaño, submetacéntricos y subtelocéntricos. El Grupo B incluye los cromosomas medianos a pequeños, todos ellos metacéntricos. El Grupo C está conformado por los pares acrocéntricos distintivos. Rhodin *et al.* (1978), organiza cuatro grupos, un Grupo A con metacéntricos y submetacéntricos grandes; un Grupo B con subtelocéntricos grandes; un Grupo C con metacéntricos y submetacéntricos pequeños; y un Grupo D con acrocéntricos.

CARIOTIPOS

De cada individuo se fotografiaron las mejores metafases en película (*Kodalite asa 8* y *T-max 400*; microscopio *Axiophot-Carl Zeiss*). Se copiaron en papel fotográfico (papel No. 4 *Kodak* y *Polychrom Kodak*) cinco metafases de cada individuo en las diferentes coloraciones, con los cromosomas completos, con un grado mínimo de condensación y máximo de separación. Con éstas se organizaron los cariotipos y se construyeron los ideogramas para las bandas diagnósticas.

RESULTADOS

Todos los ejemplares estudiados mostraron un complemento compuesto por 28 cromosomas, en machos y hembras. No se encontró dimorfismo sexual en los cromosomas.

IDEOGRAMA

El ideograma se estableció teniendo en cuenta la longitud de los cromosomas, la relación de brazos, el índice centromérico, la longitud relativa de los cromosomas y sus brazos (p y q), (Tabla 2). Se determinó la fórmula cariológica de *Podocnemis vogli* en 5:6:3. El cariotipo está compuesto por tres grupos de cromosomas según su tamaño y morfología (Fig. 1): el Grupo A (pares del uno al cinco) comprende los cromosomas de mayor tamaño, cuatro pares de cromosomas submetacéntricos y uno subtelocéntrico, según la relación de brazos de 1,92–3,55 y los índices centroméricos entre 22,51–37,13. (Tabla 2). El Grupo B (pares del 6 al 11) incluye los cromosomas metacéntricos medianos a pequeños, seis pares (del seis al once). De acuerdo a los valores de relación de

Par	Grupo	Hrl q		Hrl p		Hrl Cromosoma		I.C.		Relación de Brazos	
1	A	9,44	+/-3,13	5,13	+/-1,95	15,00	+/-5,22	37,13	+/-2,30	1,92	+/-0,55
2	A	8,46	+/-2,90	4,08	+/-1,50	12,92	+/-4,49	34,89	+/-3,60	2,18	+/-0,56
3	A	8,60	+/-2,70	2,31	+/-0,87	11,11	+/-3,76	22,51	+/-1,47	3,55	+/-0,59
4	A	6,55	+/-2,22	3,21	+/-1,11	10,06	+/-3,41	35,73	+/-4,61	2,07	+/-0,57
5	A	6,24	+/-2,00	2,46	+/-0,85	8,96	+/-2,99	30,54	+/-3,71	2,42	+/-0,58
6	B	3,11	+/-1,00	1,93	+/-0,73	5,22	+/-1,76	40,47	+/-3,08	1,65	+/-0,49
7	B	2,85	+/-0,89	1,65	+/-0,62	4,65	+/-1,57	38,68	+/-1,85	1,69	+/-0,23
8	B	2,65	+/-0,84	1,49	+/-0,57	4,28	+/-1,47	38,01	+/-1,56	1,68	+/-0,18
9	B	2,25	+/-0,70	1,35	+/-0,52	3,72	+/-1,27	39,39	+/-2,94	1,59	+/-0,26
10	B	1,89	+/-0,60	1,16	+/-0,43	3,16	+/-1,09	39,96	+/-1,65	1,53	+/-0,18
11	B	1,60	+/-0,51	0,96	+/-0,38	2,65	+/-0,93	39,40	+/-2,31	1,70	+/-0,52
12	C	3,10	+/-1,21	0,14	+/-0,06	3,23	+/-1,34	4,23	+/-1,85	25,70	+/-11,44
13	C	2,28	+/-0,97	0,12	+/-0,06	2,41	+/-1,08	5,74	+/-2,69	18,84	+/-8,27
14	C	1,34	+/-0,48	0,12	+/-0,06	1,47	+/-0,55	8,93	+/-3,15	11,20	+/-4,37

Tabla 2. Parámetros de evaluación del complemento cromosómico para la elaboración del ideograma de *P. vogli*, fórmula cariológica (5:6:3); NF=50, (n=70 metafases). Hrl q: longitud relativa del brazo largo del cromosoma; Hrl p: longitud relativa del brazo corto del cromosoma; Hrl cromosoma: longitud relativa del cromosoma dentro del complemento; I.C.: índice centromérico; Relación de Brazos: relación entre el brazo largo del cromosoma y el brazo corto.

brazos entre 1,53–1,70 y a los índices centroméricos entre 38,01–40,47. El Grupo C está conformado por tres pares de cromosomas (12 al 14). Al evaluar los valores de relación de brazos e índices centroméricos, todos los cromosomas de este grupo son acrocéntricos, fácilmente identificables aún en metafases muy condensadas donde adquieren una morfología puntiforme. Estos tres pares de acrocéntricos tienen valores de relación de brazos de 11,20–25,70 e índices centroméricos de 4,23–8,93 respectivamente.

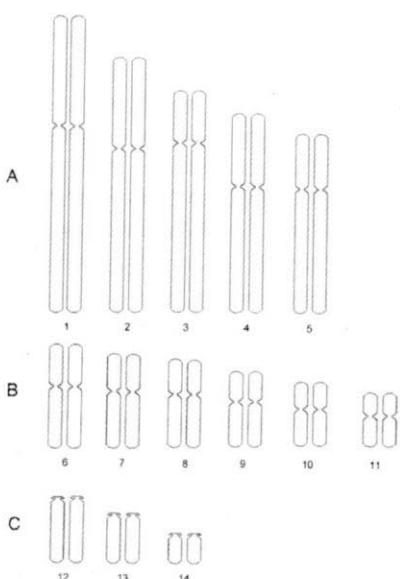


Figura 1. Ideograma del complemento cromosómico de *P. vogli*.

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 submetacéntrico. Al nivel del número y morfología cromosómica observada en Giemsa, no se encontraron variaciones en los cariotipos de los individuos provenientes de las localidades del Meta, incluyendo el ejemplar reportado por Rhodin *et al.* (1978).

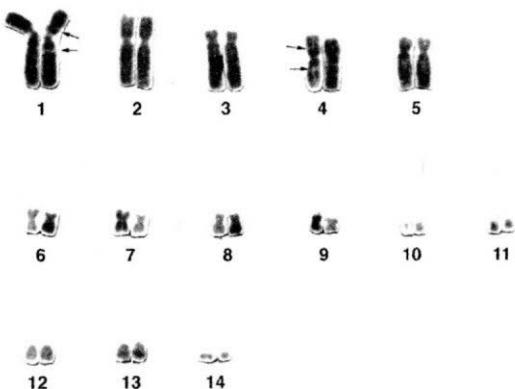


Figura 2. Cariotipo de *P. vogli* (ejemplar A) en coloración Giemsa, en el cual se observan algunas bandas G espontáneas (indicadas por flechas).

BANDEAMIENTOS

En coloración Giemsa en el primer par aparecieron bandas espontáneas (Fig. 2) en el tercio proximal de los brazos p y q. Igualmente, en el cuarto par se encontraron regiones acromáticas mediales a los brazos p y q. En el 8% de las metafases analizadas (Fig. 3A) se visualizó una fragilidad en el brazo p del primer par asociada a la ubicación de la región organizadora nucleolar (NOR). Las bandas solo se lograron para las metafases de cinco de los animales estudiados A, B, C, V3 y V8.



Figura 3. A. Metafase de *P. vogli* (ejemplar D) mostrando la región acromática en los brazos p del primer par cromosómico (indicado por una flecha). B. Metafase mostrando las regiones organizadoras nucleolares en *P. vogli* (ejemplar B; indicado por flechas). C. Metafase mostrando las regiones organizadoras nucleolares y nucleólos en células interfásicas de *P. vogli* (ejemplar B; indicado por flechas).

Bandas G. Permitieron la identificación de los elementos del complemento cromosómico. El ideograma presentado en la figura 4, se realizó a partir del análisis de metafases

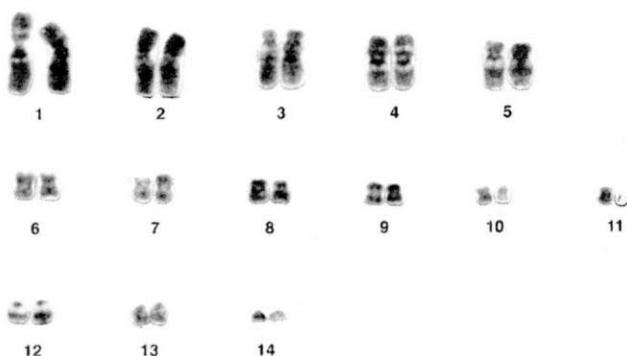


Figura 4. Cariotipo de *P. vogli* (ejemplar B) en Banda G.

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).

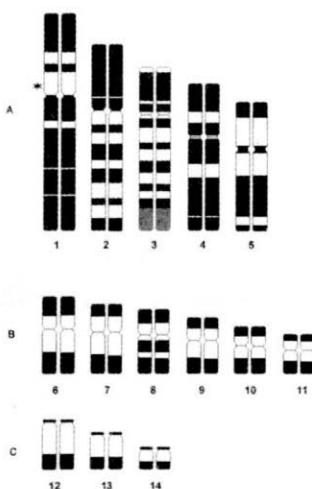


Figura 5. Ideograma del patrón en Banda G del cariotipo de *P. vogli*. *Ubicación de las regiones organizadoras nucleolares.

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 *Macrolemmus temminkii* y *Chelydra serpentina* respectivamente, en posición intersticial en ambos casos, asociado a una constrictión 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*.

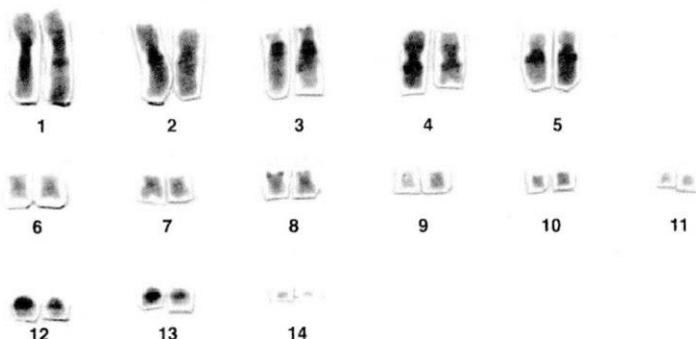


Figura 7. Cariotipo de *P. vogli* (ejemplar B) en banda C.

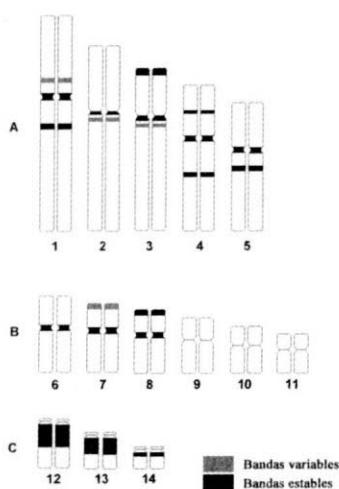


Figura 8. Ideograma del patrón base para banda C en *P. vogli* mostrando las regiones heterocromáticas en negro. En gris se presentan las bandas variables.

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 pericentromerica en q	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Cromosoma 7 banda telomerica 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 temminckii* y *Chelydra serpentina* respectivamente. En posición intersticial en ambos casos asociado a una constrictión 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 et al., 1978	GRUPO	Presente trabajo
A Metacéntricos y submetacéntricos grandes	1 2 3	A Submetacéntricos y subtelocéntricos grandes	1 2
B Subtelocéntricos grandes	4 5		4 3 5
C Metacéntricos y submetacéntricos pequeños	6 7 8 9 10 11 12	B Metacéntricos medianos y pequeños	6 7 8 9 10 11
D Acrocéntricos	13 14	C Acrocéntricos	14 13 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 fórmula 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 Trypsin 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. ROMBLOT, 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 Galápago (*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.