

**OPTIMIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES RAPD-PCR PARA LA
CARACTERIZACIÓN DE LA TORTUGA CABEZONA *Caretta caretta* (TESTUDINES:
CHELONIIDAE)**

Martínez-Ortega, Julio

Estudiante de Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias, GENBIMOL “Genética, Biología Molecular y Bioinformática”, Cra. 4 No 22-61, Bogotá, D.C., Colombia.

RESUMEN

Este estudio evaluó y estandarizó la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RAPD-PCR), con el fin de obtener marcadores genético-moleculares que permitan estimar la diversidad genética de la tortuga cabeza. Se aisló ADN de *C. caretta* de 2 zonas del Caribe colombiano (Don Diego N=5 e Islas del Rosario N=3) y se cuantificó obteniendo entre 8.63-78.5 ng/μl. Se aplicó una matriz ortogonal de Taguchi que permitió reducir de 81 a 9 el número de reacciones. Las mejores condiciones de la reacción se determinaron evaluando concentraciones de 0.59 a 7.85 ng de ADN, 2 a 4 mM de MgCl₂, 1 a 6 Unidades de Taq ADN polimerasa y de 0.1 a 0.5 μM de oligonucleótidos. Las condiciones estandarizadas se dieron con 7.85 ng/μl de ADN, 3.5 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTP's, 0.5 μM de oligonucleótido y una unidad de Taq ADN Polimerasa, en un volumen de reacción de 20 μl. Las condiciones de termociclado de la reacción se iniciaron con una desnaturalización a 94°C por 5 m, seguida por 40 ciclos de: 94°C por 40 s, 37°C por 40 s y 72°C por 90 s y una fase de elongación final de 72°C por 5 m. La diversidad genética se determinó utilizando el índice de Shannon obteniendo valores entre 2.19-2.48 para los individuos de Don Diego y entre 0.39-1.38 para los de Isla del Rosario. El índice de Pielou, produjo valores cercanos o iguales a 1. Se estandarizó una metodología que produce bandas claras, legibles y reproducibles, condiciones indispensables

Martínez-Ortega, J.C. 2010

para que esta técnica de RAPD pueda utilizarse como alternativa confiable para realizar estudios de diversidad genética en la tortuga cabezazona.

PALABRAS CLAVES: Diversidad genética, Taguchi, RAPD-PCR, *Caretta caretta*

ABSTRACT

This study evaluated and standardized the sensitivity, specificity and reproducibility of Random Amplified Polymorphisms DNA by Reaction Chain Polymerase (RAPD-PCR), in order to obtain molecular genetic markers to estimate genetic diversity of loggerhead turtle. *C. caretta* DNA was isolated in two areas of the Colombian Caribbean (Don Diego N = 5 e Islas del Rosario N = 3) and quantified by obtaining between 8.63-78.5 ng / μ l. We applied a Taguchi orthogonal array which reduced from 81 to 9 the number of reactions. The best reaction conditions were determined to assess concentrations of 0.59 to 7.85 ng DNA, 2.0 to 4.0 mM $MgCl_2$, 1-6 units Taq DNA polymerase and 0.1 to 0.5 μ M of primers. The conditions were standardized to 7.85 ng / μ l DNA, 3.5 mM $MgCl_2$, 200 mM dNTP's, 0.5 μ M of primer and one unit of Taq DNA polymerase in a reaction volume of 20 μ l. The thermo cycling conditions of the reaction was initiated with a denaturation at 94°C for 5 m, followed by 40 cycles of 94°C for 40 s, 37°C for 40 s and 72°C for 90 s, and a final elongation phase of 72°C for 5 m. Genetic diversity was determined using the Shannon index, the values obtained for Don Diego turtles were between 2.19-2.48 and for Isla del Rosario turtles were between 0.39-1.38. The Pielou index produced values equal to 1. We standardized a methodology that produces light, legible and reproducible bands, indispensable conditions for that RAPD technique can be used as a reliable alternative for studies of genetic diversity in the loggerhead turtle.

KEY WORDS: Genetic diversity, Taguchi, RAPD-PCR, *Caretta caretta*

INTRODUCCIÓN

Caretta caretta (Linnaeus, 1759) es una especie cosmopolita en su distribución (Eckert *et al.*, 2000) frecuentando aguas tropicales y subtropicales de los océanos Atlántico, Pacífico, Índico y de los mares Caribe y Mediterráneo (Kelez *et al.*, 2003).

Es una especie que presenta un alto declive poblacional a causa de las diferentes presiones antrópicas que las rodean (Domingo *et al.*, 2006), como la comercialización de huevos, carne, aceites y la degradación de su hábitat (Eckert y Abreu, 2001), la contaminación de los mares por hidrocarburos derivados del petróleo o por la ingesta de plásticos (Mayol *et al.*, 1988; Gibson y Smith, 2000; Marco *et al.*, 2008). Por estas razones, actualmente está catalogada en peligro (EN) de acuerdo con los listados para especies amenazadas de la UICN (1996) y en el Libro Rojo de Reptiles de Colombia (Castaño-Mora, 2002) como especie en estado crítico (CR). En la actualidad las tortugas marinas son protegidas y conservadas, directa o indirectamente mediante diversos convenios internacionales como CITES, así como leyes y decretos nacionales (INVEMAR, 2002), como el Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales en Colombia, el cual tiene como visión “Lograr en el año 2022 la conservación y manejo sostenible de las especies de tortugas” (PNCTMCC, 2002). A pesar de contar con estos instrumentos jurídicos, pocas son las acciones concretas que se han adelantado en Colombia para la protección y conservación de las tortugas marinas (López *et al.*, 2008).

Para hacer posible un mejor desarrollo de estrategias de conservación efectivas de esta especie, es necesario tener conocimiento de la composición y diversidad genética (Solano *et al.*, 2009) y la identificación haplotípica de las colonias anidadoras, y forrajeadoras (Richardson, 2000). Las técnicas de biología molecular y en particular el uso de marcadores moleculares, como los RAPD (del inglés: Random Amplification of Polymorphic DNA), los más utilizados en la

Martínez-Ortega, J.C. 2010

caracterización genética y estimación de la diversidad de animales y plantas (Liu y Cordes, 2004; Eguiarte *et al.*, 2007). Diferentes estudios han demostrado que existen factores que afectan los perfiles de amplificación obtenidos por RAPD-PCR (Williams *et al.*, 1990; Welsh y McClelland, 1990), lo cual se manifiesta principalmente en falsos positivos (Atienzar *et al.*, 2000) y la poca reproducibilidad de los ensayos (Dinesh *et al.*, 1995)

Algunos de los principales factores que afectan estos perfiles de amplificación, son la calidad (Jones *et al.*, 1997) y la cantidad de ADN extraído (Poutou *et al.*, 2005), así como las concentraciones de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) (Williams *et al.*, 1993) la Taq polimerasa (Staub y Serquen, 1996), el programa de termociclador empleado, específicamente la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos-iniciadores y el número de ciclos (Penner *et al.*, 1993) y la presencia de ARN (Yoon y Glawe, 1993).

Estas limitantes evidencian la necesidad de someter la técnica de RAPD-PCR a un proceso de puesta a punto, en el que se definan las condiciones bajo las cuales los patrones obtenidos sean fiables y reproducibles. El presente estudio tiene como objetivo optimizar marcadores moleculares RAPD-PCR para la caracterización genética de poblaciones de la tortuga marina *Caretta caretta*, así como estimar preliminarmente como modelo los índices de biodiversidad (Uniformidad de Pielou, Índice de Shannon,) permitiendo expresar las variaciones existentes a nivel genético de dos grupos de individuos de las playas Don Diego e Islas del Rosario, Caribe colombiano.

ÁREA DE MUESTREO

Se recolectaron muestras de sangre de tortugas cabezonas presentes en dos zonas del Caribe centro Colombiano: en la Playa Don Diego (11°15'N, 73°18'W; Departamento del Magdalena) ubicada en del Parque Natural de la Sierra Nevada de Santa Marta, (INVEMAR,

2002). Estas playas presentan una gran extensión y amplitud llegando a medir hasta 70 m de zona media (Marrugo y Vásquez, 2001). Aunque su dinámica es bastante alta (Ceballos, 1996) y algunos tramos de playa desaparecen por periodos cortos de tiempo (CORPOGUAJIRA, 1992), estas playas mantienen su forma y estructura en condiciones aptas para la anidación de las tortugas (León, 2001). Históricamente la playa Don Diego ha sido zona de alta anidación (INVEMAR, 2002), estimándose en promedio 2 nidos por noche o 300 nidos durante una temporada de anidación (Kaufmann, 1973 EN: INVEMAR, 2002). En la última década se han registrado 14 emergencias para anidar por temporada de anidación (Marrugo y Vásquez, 2001), índice preocupante por la alta disminución de anidación en esta playa.

El Archipiélago Islas del Rosario (10°09'N, 75°45'W; Departamento de Bolívar), se ubica a 45 km de la Bahía de Cartagena alrededor de la Isla de Barú (INVEMAR, 2002). Las islas que fueron recorridas por su actividad de tortugas marinas fueron Tesoro, Rosario, además de isla Barú por su cercanía (Rincón y Rodríguez, 2004). La única especie que anida en el archipiélago del Rosario es la tortuga carey (Ceballos, 1996), y las tortugas verde y cabezona se observan en aguas aledañas probablemente alimentándose, desplazándose o simplemente en refugio (Ceballos, 2004).

METODOLOGIA

Muestreo

Se recolectaron muestras de sangre de los senos cervicales dorsales según la metodología propuesta por Dutton (1996) de 8 individuos de dos grupos del Caribe Colombiano, distribuidas de la siguiente forma: Islas del Rosario (3 individuos) y playa Don Diego (5 individuos) (Figura 1). Una vez extraídas las alícuotas de sangre, fueron inmediatamente colocadas en tubos Tris-EDTA buffer, (Greiner Bio-one®, Kremsmünster, Austria) para evitar la coagulación de las muestras. Las muestras se transportaron en neveras de icopor con geles refrigerantes hasta el

Martínez-Ortega, J.C. 2010

Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (sede Bogotá), y se guardaron a 4°C para su preservación antes de los análisis.

Extracción y Cuantificación de ADN

Se extrajo ADN total, empleando el kit UltraClean™ Tissue & Cells DNA Isolation (MO BIO, Laboratorios Inc. California, USA) siguiendo las especificaciones de la casa comercial fabricante. El ADN, se reveló después de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se coloreo con bromuro de etidio (2 µg/ml). El gel se fotografió empleando el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System y se analizó con el programa VisionWorks LS Image Acquisition and Analysis Software (UVP, Upland, USA). Seguidamente, se determinó la concentración del ADN con el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer y se registró con el programa ND-1000 V3.7.1 (Thermo Scientific, Denver, USA).

Estandarización de RAPD-PCR

Se empleó el método Taguchi con el fin de disminuir el número de reacciones necesarias para obtener la primera aproximación de estandarización de marcadores moleculares RAPD-PCR en *Caretta caretta* (Codd y Clarkson, 1994). Se construyó una matriz ortogonal con las cuatro variables evaluadas (concentraciones de Taq ADN polimerasa, ADN, MgCl₂ y oligonucleótido-iniciador) con tres concentraciones diferentes cada una, obteniendo de esta forma, 9 reacciones de 81 posibles (Tabla 1). De estas 9 reacciones se seleccionó la que produjo el mayor número de bandas claras y legibles, y con estas condiciones se evaluaron independientemente cuatro variables para mejorar el bandeo producido por el oligonucleótido-iniciador OPA5: concentraciones de 0.59 a 7.85 ng de ADN, 2 a 4 mM de MgCl₂, 1 a 6 Unidades de Taq ADN polimerasa y de 0.1 a 0.5 µM de oligonucleótidos-iniciadores. Con las condiciones de reacción optimizadas se evaluaron ocho decameros-iniciadores (OPA, Operon Technologies Martínez-Ortega, J.C. 2010

Inc. Alameda California, USA) (Tabla 2), con el fin de determinar la variabilidad existente en los 8 individuos analizados y en los oligonucleótidos-iniciadores antes mencionados. Además, se evaluó la reproducibilidad de la técnica RAPD-PCR con el oligonucleótido-iniciador OPA4 utilizando ADN de la tortuga CSM perteneciente a playa Don Diego. Se realizaron reacciones de amplificación en días diferentes entre los meses de Agosto y Septiembre de 2009, se revelaron en agarosa al 1% y se compararon de acuerdo a su perfil electroforético.

En todas las reacciones se utilizó Taq ADN polimerasa y dNTPs de la casa comercial Bioline Inc. California (USA). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de bloque PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Madison, USA). Los productos de amplificación se revelaron en una cámara de electroforesis Gel XL ultra V-2 (Labnet international, Inc. Bioscience Research, New Jersey, USA) utilizando geles de agarosa (Seaken al 2,5%), por 90 minutos a 100 Voltios. Los geles fueron fotografiados con el fotodocumentador UVP Gel-Doc-IT™ imaging system (UVP LSC. Upland, USA).

Análisis de datos

Bandas claras, nítidas y reproducibles fueron elegidas para los análisis. Los loci seleccionados fueron leídos y organizados en matrices binarias donde 1 indicó presencia y 0 ausencia. El análisis de las matrices generadas se realizó con el programa PRIMER Versión 5.0 (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research, United Kingdom, Inglaterra) con el que se determinó la diversidad genética acumulada de acuerdo a la ecuación $H' = - \sum p_i \ln p_i^2$, donde $p_i = N_i/N$ = a la proporción de la i bandas de la especie en la muestra, así mismo N_i = número de bandas de la i especie. N = número total de bandas de la muestra (Shannon y Weaver, 1963); el número total de bandas (S); la uniformidad (J') de acuerdo a la ecuación $J' = H'/H'_{\max}$ donde $H'_{\max} \log_2 S$ (Pielou, 1966). Así mismo se realizó un ordenamiento utilizando la estrategia aglomerativa jerárquica de la media no ponderada (UPGMA), con el fin de

Martínez-Ortega, J.C. 2010

establecer la similaridad genética entre individuos de los grupos y dentro de los grupos, se empleó la ecuación $BC = \sum |X_{ij} - X_{ik}| / \sum (X_{ij} + X_{ik})$, estableciendo la similaridad por Bray-Curtis (Ludwig y Reynolds, 1988), permitiendo calcular las distancias promedio entre todos los pares de objetos de las dos agrupaciones estudiadas (Vivanco, 1999)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción y Estandarización por Método de Taguchi

Se obtuvo ADN de buena calidad, concentración y pureza. La Figura 2 muestra los productos de ADN obtenidos de los ocho individuos analizados. Se observan bandas únicas y limpias que presentan intensidades diferentes, en el carril 4 la muestra CSM4 muestra la mayor intensidad que está relacionada directamente con la concentración de ADN (110.5 ng/μl), los carriles 6, 7 y 8 muestran menor intensidad de las bandas y por ende menor concentración de ADN (30.4, 43.16 y 40.6 ng/μl respectivamente). Las otras muestras obtenidas (carriles 1, 2, 3 y 5) presentaron intensidades y concentraciones de ADN intermedias (entre 56 y 78 ng/μl).

La estandarización de punto de partida fue realizada utilizando matrices ortólogas de Taguchi mediante reacciones de ensayo y error que permitieron minimizar de 81 a 9 el número de reacciones (Tabla 1). Se obtuvieron 58 fragmentos de marcadores RAPD-PCR con pesos moleculares entre 350 y 1800 pares de bases (pb) (Figura 3). Los carriles 1, 2, 8 y 9 presentaron el mismo patrón de amplificación, produciendo bandas nítidas y claras entre 350 y 1000 pb, además de no presentar bandas entre 1000 y 1800 pb; en los carriles 3 y 6 se presentaron barridos entre 1000 y 1800 pb y de 8 a 9 bandas entre 350 y 1100 pb; en el carril 4 (Figura 3) bandas claras y nítidas se presentaron entre 1000 y 1800 pb y los barridos entre 350 y 1000 pb, contrario a lo ocurrido en los carriles antes mencionados. Finalmente los carriles 5 y 7 presentaron patrones similares de bandeo entre 350 y 1800 pb, pero debido a las bandas poco claras entre 400 y 600 pb y entre 1600 y 1800 pb amplificadas y reveladas en el carril 7 y

Martínez-Ortega, J.C. 2010

menor número de bandas producidas en el carril 9, se observó que la reacción en el carril 5 reveló las mejores condiciones de reacción para utilizar como punto de partida para iniciar la estandarización, produciendo el mayor número de bandas (12) y los patrones más claros y nítidos de las 9 reacciones evaluadas (Tabla 1). En general se puede afirmar que el método de Taguchi no solo disminuye la proporción de reacciones, también ahorra tiempo y economiza reactivos (Taguchi y Wu, 1980).

Estandarización de las Condiciones de Amplificación por RAPD-PCR

La reacción óptima por el método de Taguchi (Tabla 1, reacción 5) produjo la mayor cantidad de bandas y de mayor claridad. Cavagnaro y Masuelli (2002) mencionan que, la elevada sensibilidad de la reacción de PCR en la producción de marcadores RAPDs requiere cantidades de ADN molde diluidos con baja concentración de contaminantes, por esta razón, se realizaron diluciones en agua destilada y desionizada de 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 y 1:50 de una muestra de ADN de *Caretta caretta* con una concentración de 78.5 ng/μl. Este ensayo buscaba disminuir el efecto inhibitorio de productos de ARN y polisacáridos que podrían estar presentes en la muestra extraída de ADN y seleccionada para la optimización de la metodología.

En la Figura 4 A se observan cambios en los patrones de los marcadores RAPDs para un amplio rango de concentraciones de ADN molde, el patrón de bandas más claro fue evidente para la concentración de 7.8 ng ADN molde, dilución 1:10 (Figura 4 A carril 1). Por otro lado, al usar ADN molde en bajas concentraciones 3.9, 2.6, 1.95 y 0.59 ng (Figura 4 A carriles del 2 al 5), se produjeron diferencias en el patrón de bandas amplificadas, como barridos entre los 900 y 1800 pb (carril 2) disminución en el número de bandas, intensidad y claridad, además de la no obtención de bandas entre 950 y 1800 pb (carriles 3, 4 y 5). Estos resultados son similares a los obtenidos por Williams *et al.* (1990) quienes a concentraciones bajas de ADN molde produjeron una disminución en el número de bandas amplificadas.

Martínez-Ortega, J.C. 2010

El cloruro de magnesio ($MgCl_2$) es de gran importancia para la reacción de RAPD-PCR, ya que los iones Mg^{2+} forman un complejo soluble con los dNTPs, estimulando la actividad de la polimerasa, incrementado la temperatura media de interacción entre la doble cadena de ADN molde y los oligonucleótidos-iniciadores (Newton y Graham, 1994). La Figura 4 B muestra el efecto de diferentes concentraciones de $MgCl_2$ sobre los productos amplificados por RAPDs, en el carril 4 se evidencia el mejor perfil electroforético obtenido (3.5 mM de $MgCl_2$) ya que amplificó 11 fragmentos claros e intensos con pesos moleculares entre 400 y 1900 pb. En los carriles 1, 2 y 3 con concentraciones de 2, 2.5 y 3 mM de $MgCl_2$ respectivamente, las bandas electroforéticas entre 400-800 pb son similares a las obtenidas en el carril 4; sin embargo, las bandas entre 800-1900 pb se presentan como un barrido inespecífico. En cambio, en el carril 5 con 7.5 mM de $MgCl_2$ se mejoró notablemente la nitidez de las bandas entre 800-1900 pb, pero son significativamente más claras las obtenidas en el carril 4. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por McPherson y Moller (2000) quienes afirman, que la efectividad de las amplificaciones de marcadores RAPDs es mayor con una concentración final de 3.5 mM de $MgCl_2$, produciendo un incremento en el número de bandas y en su intensidad. Fernández *et al.* (1997) concluye que las concentraciones menores o iguales a 2.5 mM de $MgCl_2$ producen barridos, como se puede observar en Figura 4 B, carriles 1 y 2.

Para determinar el efecto ocasionado por la concentración de la Taq ADN polimerasa sobre los productos amplificados de ADN de *C. caretta*, se evaluaron concentraciones de 1 a 6 unidades de polimerasa. Los fragmentos amplificados claros e intensos aumentaron cuando se disminuyó la concentración de la enzima. Gelfand (1992) y Williams *et al.* (1993) mencionan que el uso de concentraciones de Taq ADN polimerasa mayores a 3 unidades, tienden a amplificar fragmentos inespecíficos. En la Figura 5 B carriles 3, 4, 5 y 6 donde se empleó 3 a 6 unidades de Taq polimerasa respectivamente se observan barridos después de los 700 pb. La concentración óptima de Taq ADN polimerasa fue de 1 unidad, resultado que está de acuerdo Martínez-Ortega, J.C. 2010

con los obtenidos por Williams *et al.* (1990), ya que a esta concentración se presentan el mayor número de bandas claras e intensas amplificadas cuando se trata de obtener marcadores RAPDs.

Los oligonucleótidos-iniciadores permiten que la Taq ADN polimerasa inicie el proceso de transcripción en cada una de los fragmentos libres de ADN, por esta razón, es de suma importancia identificar el umbral de concentración de las dos variables (Williams *et al.*, 1990). Las concentraciones de $MgCl_2$ empleadas en los carriles 2 y 3 produjeron un número de bandas intermedio (7 y 8 bandas), con barridos entre 1000 y 1400 pb (Figura 5 A), en cambio el carril 1 con una concentración de 0.1 μM produjo el menor número de bandas (2) y de bajo peso molecular (300 a 400 pb), poca intensidad y claridad; en cambio, los carriles 4 y 5 presentaron las bandas más claras, nítidas e intensas; sin embargo, en el carril 4 se produjeron un menor número de bandas (10). El patrón de mejor reproducibilidad fue obtenido utilizando 0.5 μM de oligonucleótidos-iniciadores con una unidad de Taq Polimerasa y 7.85 ng de ADN, amplificando 12 bandas claras y de buena intensidad (Figura 5 A, carril 5). Hay que tener en cuenta que la hibridación de los iniciadores en reacciones de RAPD-PCR ocurre simultáneamente en varios puntos de la cadena molde, utilizándose regularmente concentraciones altas de oligonucleótidos (Sansinforiano *et al.*, 2001), aunque para este estudio las condiciones estándar de oligonucleótidos permitieron una buena amplificación y unión de los oligonucleótidos a la cadena molde, para Williams *et al.* (1993) la temperatura de hibridación de los iniciadores y la concentraciones de magnesio, son los factores que más afectan la intensidad relativa de las bandas amplificadas.

Finalmente se evaluaron 5 temperaturas de hibridación (Figura 6 B), debido a que esta variable es crucial para la PCR, pues ocurre la unión de los oligonucleótidos-iniciadores a la cadena molde y con ello el inicio de la síntesis de la cadena complementaria. La Figura 6 B muestra en los carriles 1 y 2 (temperaturas de 35 y 36°C respectivamente) bandas con barridos

Martínez-Ortega, J.C. 2010

entre 800 y 1600 pb. Cavagnaro y Masuelli (2002) mencionan que temperaturas de hibridación menores a 36°C producen apareamientos inespecíficos entre oligonucleótidos-iniciadores y ADN molde, produciendo bandas no-específicas de baja reproducibilidad. En los carriles 4 y 5 (temperaturas de 38 y 39°C respectivamente) se produjeron bandas con buena intensidad entre 1200 y 1600 pb y nítidas entre 800 y 1000 pb; estos cambios en los patrones amplificados permitieron determinar que la temperatura de 37°C es la más adecuada para la amplificación de marcadores RAPDs, debido a que produjo la mayor claridad, nitidez e intensidad en todas las bandas amplificadas (800 a 1600 pb)

Variabilidad y reproducibilidad de la técnica de RAPD-PCR

Para confirmar que la reacción estandarizada con el oligonucleótido-iniciador OPA5, para obtener marcadores moleculares RAPDs con ADN de *Caretta caretta* funcionaba igual con otros oligonucleótidos-iniciadores, se realizó un ensayo utilizando 8 iniciadores OPA (Tabla 2). En este ensayo se observaron bandas nítidas y claras en la mayoría de las reacciones obtenidas con los oligonucleótidos-iniciadores amplificados (Figura 6 A). Los carriles 2 y 3 muestran el bandeo electroforético de las reacciones donde se utilizaron los oligonucleótidos-iniciadores OPA2 y OPA3, se observan barridos en las bandas entre 1000 y 1800 pb y tenues entre 400 y 1000 pb; en cambio, los carriles 1, 4, 5, 6, 7 y 8 en las reacciones que se usaron los oligonucleótidos OPA1, OPA4, OPA5, OPA6, OPA8 y OPA9 respectivamente, produjeron bandas entre 350 y 2000 pb con buena nitidez y claridad. En el carril 9, la reacción en la que utilizó el oligonucleótido-iniciador OPA10 no produjo ningún producto de amplificación, debido posiblemente a que la secuencia nucleotídica de este iniciador no presenta sitios de hibridación u homología en el genoma de la tortuga cabezona. En la Figura 6 A se manifiesta la variabilidad producida por los diferentes oligonucleótidos-iniciadores, que es el objetivo, cuando se estandariza un método para obtener RAPDs, este resultado es bien importante para poder

Martínez-Ortega, J.C. 2010

obtener resultados robustos en el análisis genético poblacional de tortugas cabezonas. Analizando este resultado se observaron 83 bandas, las cuales fueron 15 monomórficas y 68 polimórficas, adicionalmente las flechas negras indican las bandas no informativas (monomórficas) (Figura 6 A) presentes en la mayoría de las reacciones con diferentes oligonucleótidos-iniciadores y con flechas rojas las bandas informativas (polimórficas) (Figura 6 A) únicas para la mayoría de oligonucleótido-iniciador amplificados. La metodología estandarizada con el oligonucleótido-iniciador OPA5, produjo resultados similares en la obtención de RAPDs utilizando ADN de *C. caretta* en el 87.5% de los oligonucleótidos-iniciadores OPA evaluados.

En cuanto a la reproducibilidad del marcador RAPDs, la Figura 7 muestra las amplificaciones realizadas en cuatro días diferentes durante un mes; todos los carriles presentaron el mismo patrón de bandeo, en cuanto a intensidad, claridad y nitidez, además del número de bandas producidas (12) y el peso molecular entre 300 y 1800 pb.

En total, se realizaron 46 reacciones para la estandarización de marcadores moleculares RAPDs para *Caretta caretta*, 34 reacciones para la estandarización de todas las variables, 4 para evaluar la reproducibilidad y 8 reacciones adicionales para evaluar la variabilidad producida por igual número de oligonucleótidos-iniciadores. Este diseño experimental propuesto ahorra tiempo y dinero generando resultados óptimos que pueden ser utilizados para evaluaciones poblaciones de esta tortuga marina. Con otra visión experimental, la evaluación de seis concentraciones de DNA, cinco de oligonucleótidos-iniciadores, cinco de $MgCl_2$, cinco de Taq ADN polimerasa y cuatro de temperatura de hibridación de los iniciadores que se realizaron en este estudio, se necesitarían un total de 3000 reacciones para obtener, tal vez el mismo resultado. Las condiciones estandarizadas se dieron con 7.85 ng/μl de ADN, 3.5 mM de $MgCl_2$, 200 mM de dNTP's, 0.5 μM de oligonucleótido y una unidad de Taq ADN Polimerasa, Martínez-Ortega, J.C. 2010

en un volumen de reacción de 20 µl. Las condiciones de termociclado de la reacción se iniciaron con una desnaturalización a 94°C por 5 m, seguida por 40 ciclos de: 94°C por 40 s, 37°C por 40 s y 72°C por 90 s y una fase de elongación final de 72°C por 5 m.

Análisis de Biodiversidad

La biodiversidad enfoca su atención en los cambios de riqueza y abundancia de las especies (Segnini, 2003), por esta razón, en la última década se solidifica el uso de los índices de diversidad a nivel genético-poblacional (Washinton, 1984).

El índice de diversidad de Shannon se fundamenta en la uniformidad y la riqueza, su máximo valor $\ln(S)$ se presenta cuando todas los loci observados se encuentran en igual proporción en la amplificación, reflejándose en la uniformidad con valor máximo de 1 (Barry y Hubert, 2008). En este estudio la diversidad de Shannon registrada en las tortugas cabezonas provenientes de la playa Don Diego (Magdalena) fue de 2.19-2.48 y para las tortugas provenientes de Islas del Rosario fue de 0.69-1.38, siendo una diversidad baja debido posiblemente a la poca recombinación de genes que existe entre individuos (Moore y Ball, 2002) y a las pocas hembras que anidan actualmente en estas playas (1 a 3 hembras) (Moreno, 2006). El análisis de uniformidad de Pielou produjo valores de uno para todas las tortugas analizadas, indicando que existe una fuerte similaridad y parentesco genético entre las tortugas cabezonas de los dos grupos evaluados (Figura 8). En general, existen pequeños cambios en cuanto a pares de nucleótidos (SNPs) que permiten determinar los pequeños cambios poblacionales que pueden estar presentando estas tortugas. Hay que advertir que estos resultados no son concluyentes, debido al bajo número de individuos analizado y a la no utilización de un programa que de valores exactos de diversidad genética basado en bandas polimórficas y no en la abundancia y riqueza.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una metodología estandarizada para la obtención de marcadores moleculares RAPDs en tortugas marinas *Caretta caretta*. Los RAPDs obtenidos producen bandas claras, legibles, reproducibles y variables entre ocho oligonucleótidos-iniciadores evaluados. Estas condiciones así definidas sirven para la realización de estudios genético-poblacionales en *Caretta caretta*.

En general, la diversidad y la uniformidad, establecen que no completamente existen diferencias genéticas entre las tortugas de las playas Don Diego e Islas del Rosario, y además que poseen una baja variabilidad genética.

AGRADECIMIENTOS

A los acuarios Museo del Mar Acuario El Rodadero de Santa Marta y al Instituto CEINER de Islas del Rosario, por permitirme otorgar las muestras de la tortuga *C. caretta*, además doy gracias a la Universidad Jorge Tadeo Lozano de Bogotá, por permitirme utilizar el laboratorio de Biología Molecular, los equipos de trabajo y por formarme como un profesional en la rama de la Biología Marina, así mismo doy gracias a Dios por darme una familia que me apoyo económica y moralmente durante todos mis estudios y que permitieron que hoy mis estudios sean culminados con éxito.

BIBLIOGRAFIA

- Abreu, A. 2000. Genetica Poblacional & Filogeografia de las tortugas marinas golfina (*Lepidochelys olivácea*) y laúd (*Dermochelys coriácea*) en el Pacífico Mexicano. Universidad Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Estación Mazatlán, Laboratorio de Genética. 55p
- Álvarez-León, R. 2001. Las Tortugas Marinas de Colombia: Estado Actual de su Conocimiento. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 25 (95): 269-286.
- Atienzar, F., Evenden, A., Jha, A., Savva, D. & Depledge, M. 2000. Optimized RAPD analysis generates high quality genomic ADN profiles at high annealing temperature. *Biotechniques* 28: 52-54.
- Barry, J. & Rees, H. 2008. Use of Simulated Data as a Tool for Testing the Performance of Diversity Indices in Response to an Organic Enrichment Event. *ICES Journal of Marine Science.* 65: 1456-1461p
- Bowditch, B.M., Albright, D.G., Williams, J.G.K. & Braun, M.J. 1993. The use of RAPD markers in comparative genome studies. *Meth Enzymol* 224p
- Bowen, B., N. Fitzsimmons, & C. Mortiz. 2000. Identificación de poblaciones. En: Eckert, K.L., K.A., Bjørndal, F.A., Abreu-Grobois, & M. Donnelly, Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE. Publicación 4. UICN/CSE, Blanchard, Pensilvania, EEUU.
- Cañon, S. & Orozco, C. 2004. Anormalidades Encontradas en Nidadas Trasladas de Tortugas Marinas Gogo (*Caretta caretta*) y Carey (*Eretmochelys imbricata*) de las Playas de la Vertiente Norte de la Sierra Nevada de Santa Marta, Departamento del Magdalena, en la Temporada de Desove del 2001. Tesis de Pregrado para optar al Título de Biología Marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Biología Marina, Santa Marta. 107 p
- Martínez-Ortega, J.C. 2010

- Castaño-Mora, O. 2002. Libro rojo de reptiles de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales- Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional-Colombia, Bogotá. 129 p.
- Cavagnaro, P. & Masuelli, R. 2002. Optimizacion de la Tecnica RAPD para Identificar CV de Olivo. Rev. FCA UNCuyo. XXXV. 1: 107-117 p.
- Ceballos, C. 1996. Plan Nacional para la Conservación de las Tortugas Marina y Continentales con Distribución en Colombia. Subdirección de Fauna, Dirección General Forestal y de Vida Silvestre, Ministerio del Medio Ambiente. Propuesta elaborada en consultoría. Santafé de Bogotá DC, 45 p.
- Ceballos, C. 2004. Distribucion de Playas de Anidacion y Areas de Alimentacion de Tortugas Marinas y sus Amenazas en el Caribe Colombiano. Bol.Invest.Mar.Cost. 33:79-99p
- Cobb, B. & Clarkson, J. 1994. A Simple Procedure for Optimising the Polymerase Chain Reaccion (PCR) Using Modified Taguchi Metodods. Nucleic Acid Research. 22 (18): 3801-3805 p.
- CORPOGUAJIRA. 1992. Estudio de las lagunas costeras en el departamento de La Guajira. Riohacha Colombia.
- Dinesh, K., Chan, W., Lim, T. & Phang, V. 1995. RAPD Markers in Fishes: An Evaluation of Resolution and Reproducibility. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 3 (2): 112-118p
- Domingo, A., Sales, S., Giffoni, B., Mille, P., Laporta, M. & Maurutto, G. 2006. Captura Incidenta de Tortugas Marinas con Palangre Pelagico en el Atlantico Sur por las Flotas de Brasil y Uruguay. Col.Vol.Sci. Pap. 59 (3): 992-1002 p
- Dutton, P. 1996. Methods for collection and preservation of simple for sea turtle genetic studies, p. 17-24. En: B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), Proceedings of the International

Symposium on Sea Turtles Conservation Genetics, NOAA Technical memorandum
NMFS-SEFSC-396.173.

Eguiarte, L., Souza, V. & Aguirre, X. 2007. Ecología Molecular. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Mexico. 608 p

Eckert, K., Bjorndal, K., Abreu, F. & Donnelly, M. 2000. *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.

Eckert, K. & Abreu, F. 2001. Proceedings of the Regional Meeting: "Marine Turtle Conservation in the Wider Caribbean Region: A Dialogue for Effective Regional Management," Santo Domingo, 16-18 November 1999. WIDECAST, IUCN-MTSG, WWF, and UNEP-CEP. 154pp

García, J. 2003. Caracterización Molecular de las Poblaciones Costera y Fluvial de *Sotaliz fluvial* Mediante el uso de la Técnica de RAPD-PCR. Trabajo de Grado Presentado como Requisito Parcial para Optar por el Grado de Bióloga. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Bogotá. Colombia. 99p

Gibson, J. & G. Smith. 2000. Reducción de las amenazas a los hábitats de alimentación. 211-216. En: Eckert, K., K. Bjorndal, F. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Eds). *Técnicas de investigación y manejo para la conservación de tortugas marinas*. Grupo especialista en tortugas marinas UICN/CSE, México 278 p.

Gelfand, D. 1992. *Taq* DNA Polymerase. Chapter 2. In: PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. H.A. Erlich (Editor). W.H. Freeman and Company, New York, U.S.A. 246p

Martínez-Ortega, J.C. 2010

- Hernandez, J., Marinño, L., Orozco, C. & Narvaez, J. 1997. Uso de la Reaccion en Cadena de la Polimerasa para Caracterizar Aislamientos Nativos de *Bacillus thuringiensis*. Revista Corpoica. 2 (1): 1-9 p
- INVEMAR. 2002. Determinación de la distribución y del estado de conservación de las tortugas marinas en el Caribe colombiano. Informe Final. Convenio SECAB SECAB-INVEMAR, Santa Marta, Colombia.
- Jones, C., Edwards, K., Castaglione, S., Winfield, M., Sala, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A. & Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR Markers in Plant by a Network of European Laboratories. Molecular Breeding. 3: 381-390
- Kelez, S., Velez, X. & Manrique, C. 2003. New Evidence on the Loggerhead Sea Turtle *Caretta caretta* (Linnaeus 1758) in Peru. Ecologia Aplicada, Nota científica 2 (1): 141-142p
- Liu, Z. & Cordes, J. 2004. DNA Marker Technologies and their Applications in Aquaculture Genetics. Elsevier, Aquaculture 238:1-37p. En línea: www.elsevier.com/locate/aqua-online
- López, E., Hernández-Fernández, J. & Bernal-Villegas, J. 2008. Condiciones Optimas de Cultivo de Linfocitos y Analisis Parcial del Cariotipo de la Tortuga Cabezona, *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) en Santa Marta, Caribe Colombiano. Rev. Biol. Trop. 56 (3): 1459-1469
- Ludwig, J. & Reynolds, J. 1988. Statistical Ecology. Editado por John Wiley & Sons, Nueva York. 337p
- Marco, A., Carreras, C. & Abella, E. (2008). Tortuga boba – *Caretta caretta*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Carrascal, L. M., Salvador, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Martínez-Ortega, J.C. 2010

- Marrugo, Y. & Vásquez, A. 2001. Aspectos reproductivos de la tortuga "gogo" *Caretta caretta* (Linnaeus 1758) en las playas de Quintana, Don Diego, Buritaca, Guachaca y Mendiguaca, Caribe Central de Colombia. Informe preliminar, pp: 90-98. En Contribución al conocimiento del estado actual de las tortugas marinas y sus hábitats de anidación en los parques nacionales naturales de la costa Atlántica. Asociación Widecast Colombia, UAESPNN DTCA, Ministerio del Medio Ambiente, Colombia. 118 p.
- 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.
- Moore, M. & Ball, R. 2002. Multiple Paternity in Longgerhead Turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida: a Microsatellite Analysis. *Molecular Ecology*. 11: 281-288p
- Moreno, A. 2006. Tortugas Marinas Anidantes en los Sectores de Arrecifes y Cañaveral, Parque Nacional Natural Tayrona, Santa Marta Caribe Colombiano (1999-2003). Trabajo de Grado como Requisito para Optar al título de Biologo Marino. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Sede Santa Marta. 165 p
- McPherson, M. & Moller, S. 2000. PCR The Basics from Background to Bench. BIOS Scientific Publishers, Oxford U.K
- Newton, C. & Graham, A. 1994. PCR. Bios Scientific Publishers. The Alden Press Ltd. Oxford, U.K.
- Otero A., De la Cruz, M. & Oyama, K. 1997. El uso de los RAPDSs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 60:85-117.
- Penner, G., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. & Fedak, G. 1993. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis Among Laboratories. *Genome Research, PCR Methods and Applications*. 2: 341-345p

Pielou, E. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. J. Theoret. Biol. 13: 131-144p

Poutou, R., Burbano, M., Sierra, S., Torre., Carrascal, M. & Mercado, M. 2005. Estandarizacion de la Extraccion de ADN y Validacion de la PCR multiple para Detectar *Listeria monocytognes* en Queso, Leche, Carne de Res y Pollo. Universitas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias. 10 (2): 61-78p

Rincón, M. & Rodríguez, C. 2004. Caracterización de Playas de Anidación y Zonas de Alimentación de Tortugas Marinas en el Archipiélago de San Bernardo, Caribe Colombiano. Bol. Invest. Mar. Cost. 33: 137-158

Richardson, J. 2000. Prioridades para los Estudios sobre la Reproducción y la Anidación. En: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal., F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. (Editores). (Traducción al Español). Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE. Publicación No. 4. p 9-12

Sánchez, F., A. 2002. Parque Natural Nacional Tayrona (Sectores Arrecifes, Cañaveral, Naranjo), Contribución al conocimiento del estado actual de las tortugas marinas y sus hábitats de anidación en los parques nacionales naturales de la costa Atlántica. Informe Final. Popayán, 85 p.

Sansinforiano, M., Rabasco, A., Martinez-Trancon, M., Parejo, J., Hermoso de Mendoza, M. & Padilla, J. 2001. Optimizacion de las Condiciones RAPD-PCR en *Candida spp.* Y *Cryptococcus spp.* Rev. Iberoam. Micol. 18: 65-69 p

Martínez-Ortega, J.C. 2010

- Segnini, S. 2003. El uso de los Macroinvertebrados Bentonicos como Indicadores de la Condicion Ecologica de los Cuerpos de Agua Corriente. Sociedad Venezolana de Ecologia. ECOTROPICOS 16 (2): 45-63p
- Solano, G., Marquez, M. & Schuler, I. 2009. Optimización de la Extracción de ADN de *Passiflora ligularis* para el Análisis por Medio de Marcadores Moleculares. Universitas Scientiarum. 14 (1): 16-22p. Disponible en línea en: www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum
- Shannon, C. & Weaver, W. 1963. The Mathematical Theory of Communication. Univ. Illinois Press, Urbana.
- Staub, J. E. & Serquen, F. C. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. Hortscience. 31(5):729-741.
- Taguchi, G. & Wu, Y. 1980. Introduction to Off-Line Quality Control. Japan Quality Control Organisation. Nagoya, Japan.
- UICN. 1996. Resolución 1.4. Comisión de Supervivencia de Especies. *Resolución y Recomendaciones*, pp. 7–8. Congreso mundial por la naturaleza, 13–23 de octubre de 1996, Montreal, Canada, UICN, Gland, Suiza.
- Vivanco, M. 1999. Analisis Estadistico Multivariable. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 234p
- Wasington, B. 1984. Diversity, Biotic and Similarity Indices. A Review with special Relevance to Aquatic Ecosystems. Water Reasearch. 18: 653-694 p
- Welsh, J. & McClelland, M. 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primer. Nucleic Acid Resarch. 18 (24) 7213 – 7218 p

- Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J. & Tingey, S. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acid Research*. 18 (22) 6531-6535 p
- Williams, J., Hanafey, M., Rafalski, J. & Tingey, V. 1993. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA Mar
- Yoon, C. S. & Glawe, D. A. 1993. Pretreatment with RNase to improve PCR amplification of DNA using 10-mer primers. *BioTechniques* 14:908-910.

Tabla 1. Matriz ortóloga de 4 variables con 3 niveles de concentración (Codd and Clarkson, 1994). La parte superior izquierda indica, las 4 variables empleadas para la estandarización preliminar (Oligonucleótidos-iniciadores, ADN molde, Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) y Taq ADN polimerasa) y las letras A,B y C indican las diferentes concentraciones empleadas en cada una de las variables.

Reacciones	[1]	[2]	[3]	[4]	Reacción	Oligo. (μM)	[ADN] ng	$MgCl_2$ (μM)	Taq-Pol. (Uni.)
1	A	A	A	A	1	0,25	3	3	2
2	B	B	B	A	2	0,375	6	2,5	2
3	C	C	C	A	3	0,5	9	2	2
4	A	B	C	B	4	0,25	6	2	3
5	B	C	A	B	5	0,375	9	3	3
6	C	A	B	B	6	0,5	3	2,5	3
7	A	C	B	C	7	0,25	9	2,5	5
8	B	A	C	C	8	0,375	3	2	5
9	C	B	A	C	9	0,5	6	3	5

Tabla 2. Oligonucleótidos-Iniciadores OPA empleados en las reacciones de RAPD-PCR y sus secuencias nucleotídicas (Operon Technologies Inc. Alameda California, USA).

Decameros-Iniciadores	Secuencias
OPA1	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA2	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA3	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA4	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA5	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA6	5'-GGTCCCTGAC-3'
OPA8	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA9	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA10	5'-GTGATCGCAG-3'

Tabla 3. Variables evaluadas para una mejor definición en los patrones de bandeo en la optimización de la reacción de RAPDs empleando ADN de tortuga cabeza

REACTIVOS	CONCENTRACION
Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$)	2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mM
ADN molde	0.59, 1.95, 2.6, 3.8 y 7.8 ng
Taq polimerasa	1, 2, 3, 4, 5 y 6 Unidades
Oligonucleótidos-Iniciadores	2, 2.5, 3, 3.5 y 7.5 μM
Temperaturas de hibridación	35, 36, 37, 38 y 39°C

Lista de Figuras



Figura 1. Mapa del área de estudio señalando las zonas de anidación (A) Playa Don Diego; y zona alimentación (B) Islas del Rosario, donde fueron colectadas las muestras de la tortuga cabezona (modificado de IGAC, 2010)

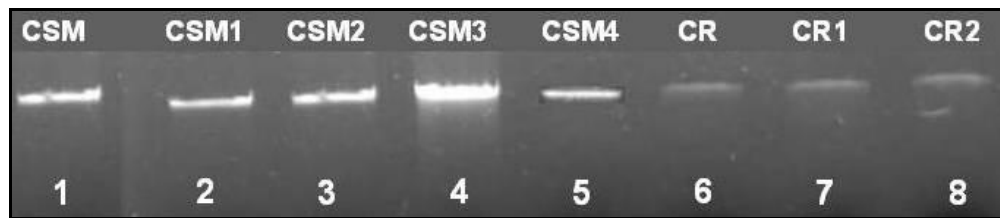


Figura 2. Productos de extracción de ADN de individuos de la tortuga marina *Caretta caretta* revelados en gel de agarosa al 1% y revelados con bromuro de etidio. CSM: tortugas provenientes de la playa Don Diego; CR: tortugas de Islas del Rosario

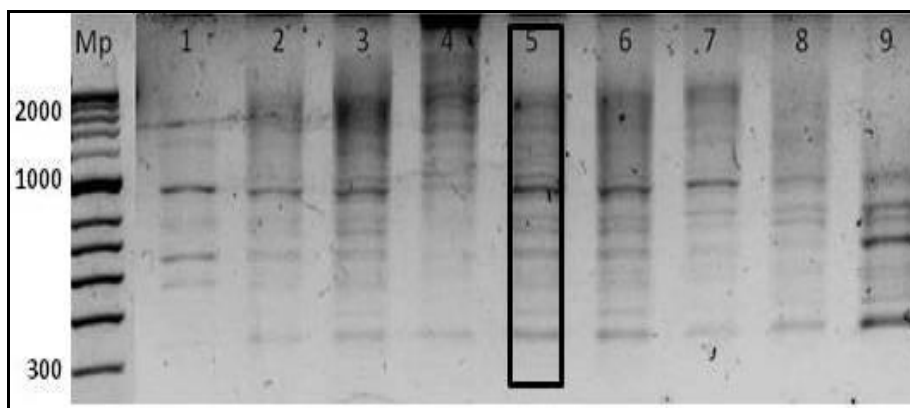


Figura 3: Amplificación por marcadores moleculares RAPDs de ADN de *Caretta caretta*, utilizando el método de Taguchi. Cada carril del 1 al 9 corresponden en el mismo orden a las reacciones presentadas en la Tabla 1. Se emplearon 200 μ M de dNTPs y 1X tampón de PCR en todas las reacciones. Mp: Marcador de peso, Hyperladder II (Bioline, California, USA)

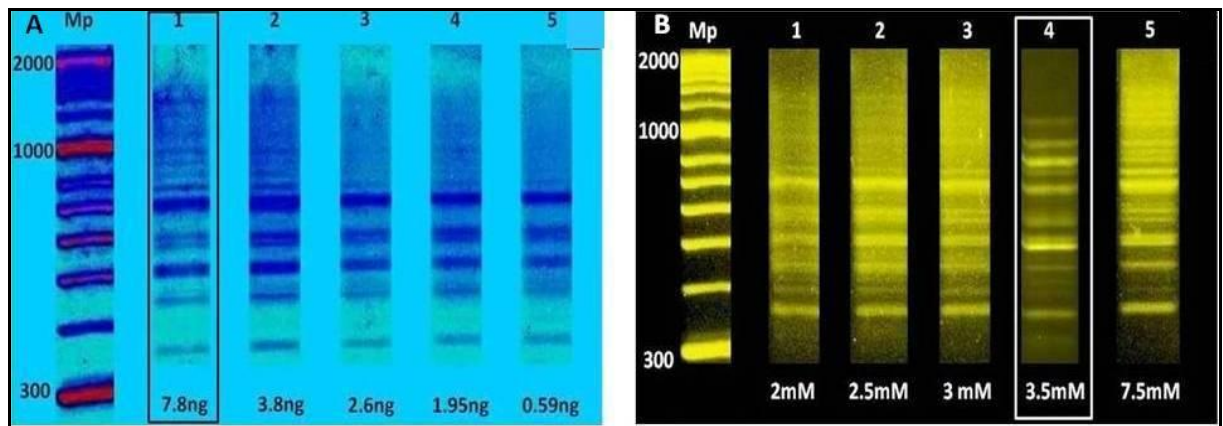


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de ADN molde (A) y de Cloruro de magnesio (B) sobre la obtención de marcadores moleculares RAPDs de *C. caretta*. En la parte de abajo en cada carril aparecen las concentraciones de DNA y $MgCl_2$ utilizadas. Se emplearon 200 μM de dNTPs, 1X tampón de PCR, 0.375 μM de oligonucleótido-iniciador y 3 unidades de Taq ADN polimerasa en todas las reacciones; en A se utilizó 3.0 mM de $MgCl_2$ y en B. 7.8 ng de ADN molde. Mp: marcador de peso Hyperladder II (Biolina, California, USA). (Cambio de color y contrastes con el Programa VisionWorks LS Image Acquisition and Analysis Software, UVP, Upland, USA, con la aplicación Image controls plug-in y pseudocolors plug-in)

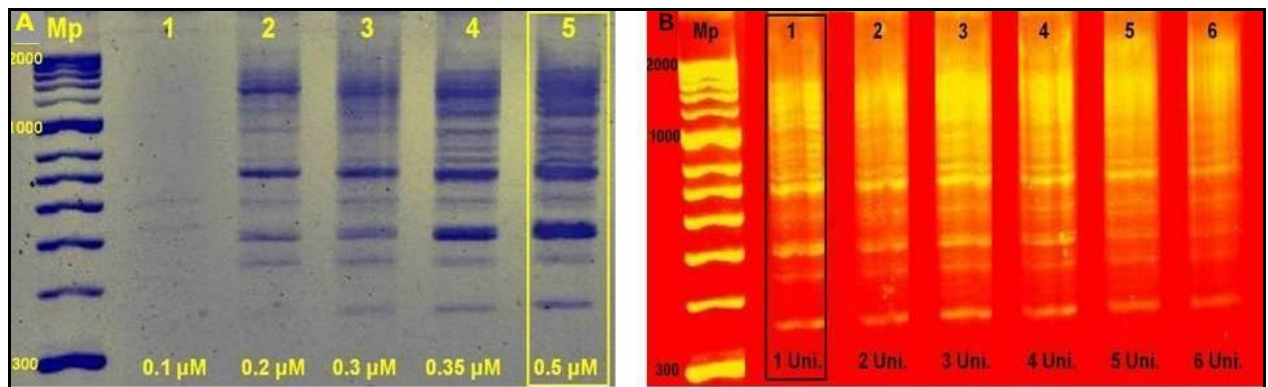


Figura 5. Influencia de las concentraciones de oligonucleótidos-iniciadores (A) y Taq polimerasa (B) sobre la obtención de marcadores moleculares RAPDs. Se empleó en todas las reacciones concentraciones de 200 μM de dNTPs, 1X tampón de PCR, 7.8 ng de ADN y 3.5 mM de MgCl₂. En A: 3 unidades de Taq ADN polimerasa y en B: 0.5 μM de oligonucleótidos-iniciadores. Mp: marcador de peso Hyperladder II (Bioline, California, USA). (Cambio de color y contrastes con el Programa VisionWorks LS Image Acquisition and Analysis Software, UVP, Upland, USA, con la aplicación Image controls plug-in y pseudocolors plug-in)

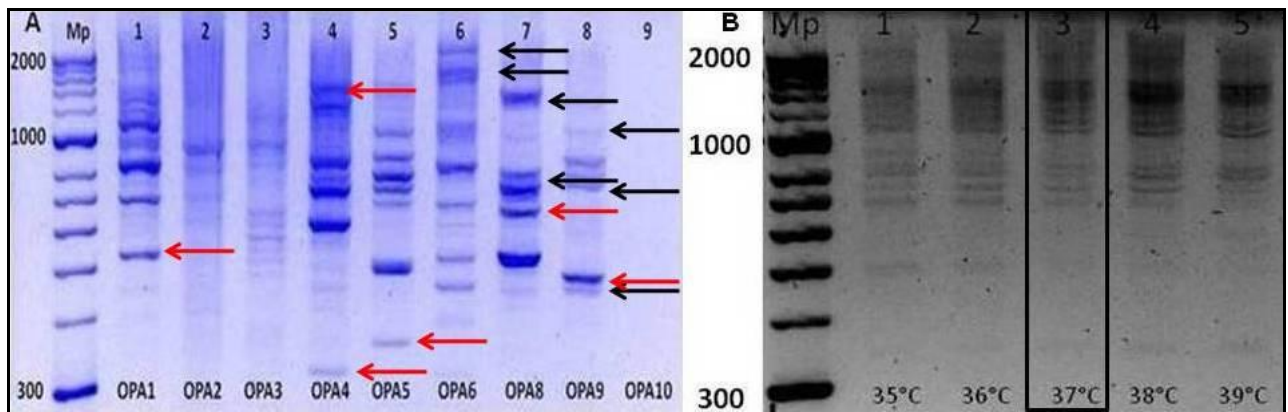


Figura 6. Variabilidad en la amplificación con diferentes oligonucleótidos-iniciadores OPA (A) (Operon Technologies Inc. Alameda California, USA) (A) y efecto de la temperatura en las condiciones optimas de reacción utilizando ADN de la tortuga *Caretta caretta* (B). Se utilizaron las condiciones estandarizadas (ver texto) Mp: marcador de peso Hyperladder II (Bioline, California, USA). (Cambio de contraste en A con el Programa VisionWorks LS Image Acquisition and Analysis Software, UVP, Upland, USA, con la aplicación Image controls plug-in y pseudocolors plug-in)

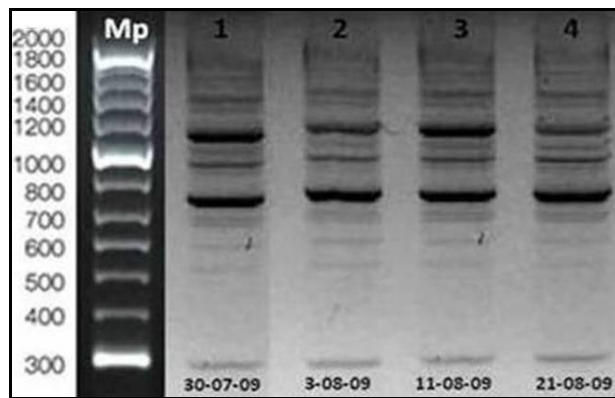


Figura 7. Reproducibilidad de marcadores RAPDs empleando las condiciones estandarizadas de reacción y el ADN del individuo CSM de playa Don Diego (ver texto). En la parte inferior de la figura se especifica la fecha en que se realizó la amplificación. Se utilizó el oligonucleótido-iniciador OPA4. Mp: marcador de peso Hyperladder II (Bioline, California, USA).

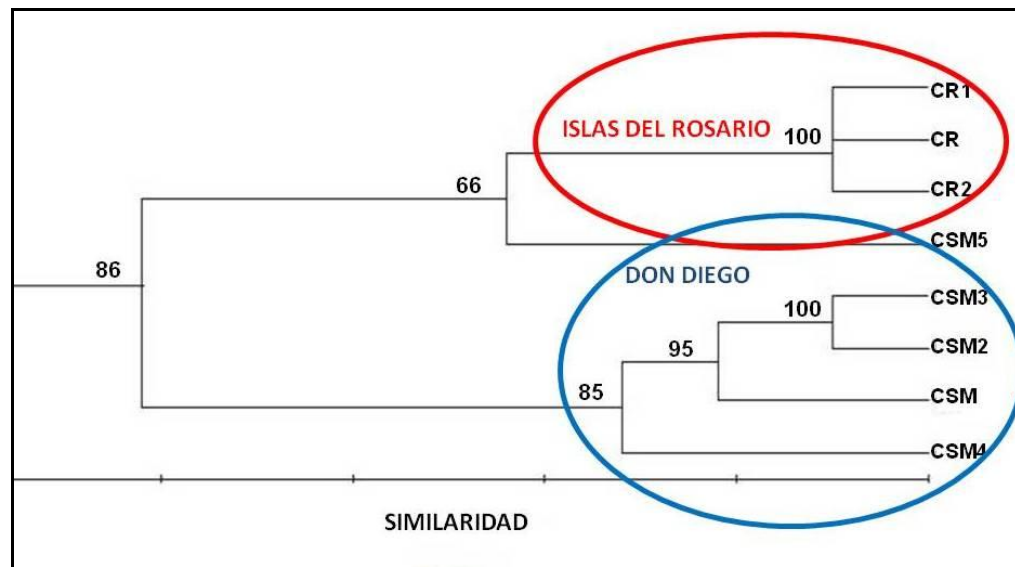


Figura 8. Cladograma de similaridad y distancias de Bray-Curtis de los dos grupos de tortugas *Caretta caretta* evaluados. El nodo de arriba encerrado en rojo presentan una similitud del 66% de CSM5 (Playa Don Diego) con las otras tres tortugas, y estas, (Islas del Rosario) del 100% entre ellas (CR1, CR y CR2). El nodo de abajo en azul presenta una similitud de 85% de CSM4 con las demás tortugas, del 95% de CSM con CSM2 y CSM3 y del 100% de estas dos últimas tortugas.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS REALIZADAS

XLIV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS

**GB 41. RAPD-PCR PARA LA CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE LA TORTUGA BOBA *Caretta
caretta* (TESTUDINES: CHELONIIDAE)**

Julio César Martínez Ortega, Carolina Franco
Espinosa & Javier Hernández Fernández.

“Genética, Biología Molecular & Bioinformática”
Laboratorio de Biología Molecular, Carrera de
Biología marina, Facultad de Ciencias Universidad
Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia.

La tortuga boba, se encuentran en un gran descenso poblacional, debido a la caza artesanal e industrial, el deterioro de las playas de anidamiento y la obstrucción de los corredores de alimentación. Es evidente la necesidad de implementar programas de conservación que permitan identificar las poblaciones de tortugas marinas que se encuentran presentes en el Caribe colombiano, ya que la falta de conocimiento sobre la estructura de estas poblaciones incrementa la dificultad para desarrollar planes para su manejo y conservación. Por este motivo, se estandarizó un método basado en la técnica de RAPD-PCR como paso previo para la caracterización molecular de la tortuga marina *Caretta caretta*. Utilizando muestras de tortugas de acuarios en Cartagena y Santa Marta se aisló el DNA

SOCIETY FOR CONSERVATION BIOLOGY “CONSERVATION FOR A CHANGING PLANET” 24th INTERNATIONAL CONGRESS FOR CONSERVATION BIOLOGY

RAPD-PCR TO DETERMINE THE GENETIC DIVERSITY OF THE LOGGERHEAD TURTLE *Caretta caretta* (TESTUDINES: CHELONIIDAE)

Julio Martínez, Carolina Franco, Aminta Jauregui and Javier Hernández

“GENBIMOL” Genética Biología Molecular, y Bioinformática, programa de Biología Marina, Facultad de Ciencias Naturales,
Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, D.C.-Colombia, South America

Introduction:

The loggerhead sea turtle, *Caretta caretta* is a widely distributed species found from Rio de la Plata (Argentina) to Murmansk (Russia) (García *et al.*, 2002). Among others, nesting populations of *Caretta caretta* along the beaches of the Colombian Caribbean. Due to human pressures, such as habitat degradation (Eckert, 2000), bycatch from industrial and subsistence fisheries (Camillas, 2006) and the marketing of its eggs, meat, and oil, this species is listed as endangered (IUCN, 1996). This situation has prompted the development of national laws (INVERMAR, 2002) and several international treaties (including CITES) to conduct scientific studies in order to support management and conservation of this species. In this study, we applied an optimized RAPD-PCR technique, and identified preliminary biodiversity indices that enabled us to recognize variations at the genetic level of two groups of sea turtles from two Colombian beaches, Don Diego and Islas del Rosario. We provide a framework for the study and conservation of the species in these particular areas. This is the first molecular-genetic study conducted in the Colombian Caribbean concerned with the management and conservation of *Caretta caretta*.

Materials and Methods:



Figure 1: Map of the study area. Islas del Rosario near Cartagena and Don Diego Beach in Santa Marta to obtain samples from loggerhead turtle *Caretta caretta*.



Figure 2: Blood was collected from cervical or caudal vein, according methodology Dutton (1996).

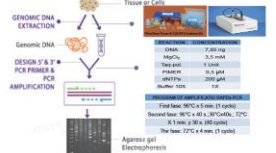


Figure 3: Blood was collected from cervical vein of eight loggerhead turtle measured according to methodology Dutton (1996) (Fig. 2), in the Don Diego and Islas del Rosario in Cartagena (Fig. 1). The nuclear DNA was isolated from the blood samples by UltraClean Tissue & Cells DNA Isolation Kit according to specification of MO BIO Laboratories, Inc. USA. To detect genomic equality, new primers were used: OPA1, OPA2, OPA3, OPA4, OPA5, OPA6, OPA7, OPA8 and OPA9. (Glycom Technologies Inc. Alameda CA, USA) the best primer used to construct binary matrix (presence (1) and absence (0)) to determine genetic diversity with PRIMER 6 program and Shannon diversity index (H') was also calculated. Margalef richness (R), Simpson's (1/Lambda) and Pielou Uniformity (J). Dendrogram was constructed by Bray-Curtis similarity for search index and interspecific relation between two population.

Results:

Using blood samples from eight loggerhead turtle, *C. caretta* collected from beaches in Don Diego (N=8) and Islas del Rosario (N=3), we isolated and quantified the DNA at a concentration of 40-111 ng/μl (Fig. 4). We used the Taguchi method (Codd and Clarkson, 1994), which reduces the number of RAPD-PCR reactions (Fig. 5 and Tab. 1). Optimal conditions for the RAPD-PCR reaction for *C. caretta* were obtained using a concentration of 3.5 mM MgCl₂ (Fig. 6B.), 0.5 μM of Primer (Fig. 7A.) and one unit of Taq DNA polymerase (Fig. 7B.)

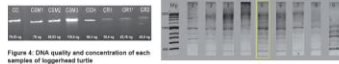


Figure 4: DNA quality and concentration of each sample of loggerhead turtle.

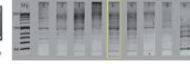


Figure 5: RAPD profile from amplification through the Taguchi method, of fragment of genomic DNA loggerhead turtle.

Table 1: Different concentration to maximizing the Taguchi method, using DNA loggerhead turtle and through amplification for RAPD

REACTION	PRIMER (μM)	DNA (ng)	MgCl ₂ (mM)	Temp (°C)
1	0.25	1	3	2
2	0.375	6	2.5	2
3	0.5	9	2	2
4	0.75	6	2	3
5	0.25	9	3	3
6	0.5	1	2.5	3
7	0.375	9	3.5	3
8	0.375	7	2	3
9	0.5	6	1	3

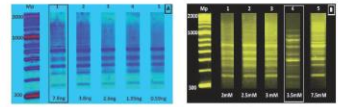


Figure 6: A) RAPD profile from amplification with different concentration of DNA loggerhead turtle. B) Agarose gel show a different concentration of Magnesium Chloride (MgCl₂)

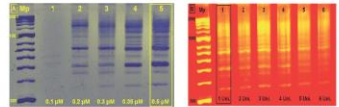


Figure 7: A) Variation of concentration Primer with Primer OPA3 in RAPD amplification B) Agarose gel profile show a different concentration of Taq polymerase

Genetic diversity, determined as band richness (Margalef index), ranged between 3.64 to 4.43 for turtles from Don Diego and 2.16-1.44 for turtles from Islas del Rosario. Genetic diversity, measured as Shannon diversity was low (2.48-0.66) (Tab. 2), probably as a result of small population size as a result of different human pressures operating on this species. The dendrogram obtained by RAPD-PCR revealed a high similarity between turtles nesting on Don Diego beach (88%) and Islas del Rosario (100%). One turtle nesting on Don Diego beach showed greater similarity to *C. caretta* of Islas del Rosario (44%) than with other turtle from Don Diego. One explanation for the higher similarity observed between groups than within groups might be that all turtles from part of the same population that feeds on Islas del Rosario and nests on Don Diego beach (Fig. 9)

Results:



Figure 8: Agarose gel show RAPD profile from amplification to best Primer OPA4 to determine variation in two population of loggerhead turtle

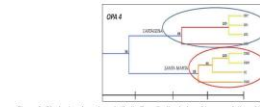


Figure 9: Cluster tree based on similarity Bray-Curtis index of two population of loggerhead turtle using UPGMA

Table 2: Different index of biodiversity on two population of loggerhead turtle

SAMPLES	MARGALEF	SHANNON	PIELOU	SHANNON
CC	4.028	1	2.489	1
CSM1	4.170	1	2.379	1
CSM2	4.170	1	2.379	1
CSM3	3.641	1	2.197	1
CSM4	3.384	1	1.981	1
CC1	1.402	1	0.611	1
CS1	2.164	1	1.361	1
CS2	2.164	1	1.361	1

Conclusion:

The analysis of RAPDs-PCR using the Taguchi method is suitable method for analyzing genetic diversity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) populations. Optimum conditions for *C. caretta* for the RAPDs-PCR reaction were: 7.85 ng DNA, 3.5 mM MgCl₂, 1 unit of Taq DNA polymerase, 0.5 μM of Primer, 200 mM dNTPs in a final reaction volume of 20 μl. The amplification program used included, 96°C for 40 s, 38°C for 40 s and an elongated phase of 72°C for 1.5 min. There were 263 bands with nine primers. The OPA 4 primer produced the largest number polymorphisms (30) among loggerhead turtles. Biodiversity indices showed poor differentiation within the two groups and low genetic diversity for turtles from Don Diego and Islas del Rosario. The low genetic diversity observed is likely to be a product of a reproductive bottleneck in *C. caretta* caused by anthropogenic pressures that affect turtles. In this area of the Colombian Caribbean, within groups might be that all turtles from part of the same population that feeds on Islas del Rosario and nests on Don Diego

Literature cited:

Camillas, J., Roca, A., Velez, A. and Roca, R. 2006. Differential loggerhead by-catch and direct mortality due to surface longlines according to boat size and gear type. *Scientific Marine*, 70 (4): 461-467.
Codd, B., Clarkson, J. 1994. A Simple Procedure for Optimizing the Polymerase Chain Reaction (PCR) Using Modified Taguchi Methods. *Nucleic Acid Research*, 22 (18): 3871-3879.
Dutton, P. 1996. Methods for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies. p. 17-24. In: S. W. Bowen & R. H. Wirth (Eds.), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtles Conservation Genetics*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFPO-368, 175.
Gómez, K., Grijalva, K., Abreu, F. y Connolly, M. 2002. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo Especializado en Tortugas Marinas (GECOTM) publicación final.
Jauregui, A., Jauregui, A., Rodríguez, E., San Félix, W., Jauregui, M. 2002. Tortuga bobo: Situación, amenazas y medidas de conservación. *Proyecto de WWF-Panamá, Panamá, Panamá*.
Hernández, J. 2002. Determinación de la distribución y del estado de conservación de las tortugas marinas en el Caribe colombiano. Informe Final. Convenio MFCAR-BOGOTÁ-BOGOTÁ, Santa Marta, Colombia.
IUCN. 1996. 1996 IUCN Red List of Threatened Animals. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 449p.

Acknowledgments:

This study was supported by the University Jorge Tadeo Lozano of Bogotá, Colombia. Also to Aquarum and Biocenosis Sea El Rosales and GENBIMOL Conservation in Cartagena, we would like to thank Carlos Ortega, María Pardo, María Martínez, Adriana Martínez, María Ortega, Luis Ortega, Wilson Ortega, Jacqueline Ortega and Dina Ortega for giving the necessary travel and loan of Molecular Biology laboratory to facilitate this research project.

For Further Information:

Contacting Javier Hernández (javier.hernandez@genbimol.edu.co)

http://www.utadodeloano.edu.co/genbimol/genbimol.htm

GENBIMOL
GENÉTICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOINFORMÁTICA

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ
JORGE TADEO LOZANO
http://www.utadodeloano.edu.co

PRESENTACIONES EN CONGRESOS APROBADAS

XLV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA GENETICA DE LA TORTUGA CABEZONA *Caretta caretta* (TESTUDINES: CHELONIIDAE): EN INDIVIDUOS DE LAS PLAYAS DON DIEGO (MAGDALENA) E ISLAS DEL ROSARIO (BOLIVAR)

Martínez-Ortega, Julio¹., Cárdenas-Stephens, Steve². & Hernández-Fernández, Javier²

¹Estudiante de *Biología Marina*, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias, GENBIMOL "Genética, Biología Molecular y Bioinformática", Cra. 4 No 22-61, Bogotá, D.C., Colombia.

²Profesores-Investigador, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias, GENBIMOL "Genética, Biología Molecular y Bioinformática", Cra. 4 No 22-61, Bogotá, D.C., Colombia

RESUMEN:

Caretta caretta es una especie circumtropical que anida las playas del Caribe colombiano. En los últimos años se ha registrado un alto declive poblacional, por lo que ha sido catalogada en peligro de extinción. Este es el primer estudio en Colombia, que pretende establecer la estructura genética de esta tortuga marina en el Caribe colombiano. Se colectaron 8 muestras de sangre de los senos sanguíneos cervicales de individuos pertenecientes a dos grupos del Caribe, Don Diego (Magdalena) (N=5) e Islas del Rosario (Bolívar) (N=3). Utilizando marcadores moleculares RAPDs y siete decameros-iniciadores OPA se obtuvieron 263 loci claros y reproducibles a partir de ADN de tortuga cabeza pertenecientes a la playa Don Diego (Magdalena) y 200 loci en las tortugas de Islas del Rosario (Bolívar). Se evidenciaron 69 fragmentos polimórficos en los individuos de Don Diego y 35 para Islas del Rosario. Con estos datos se estableció un modelo de la estructura genética de estos especímenes. La diversidad genética obtenida fue baja, obteniéndose niveles de heterocigocidad de $H^*=0,3095 \pm 0,2008$ y $H^*=0,1793 \pm 0,2298$ para las tortugas de Don Diego e Islas del Rosario respectivamente. La variación genética dentro ($H_s = 0,3394 \pm 0.0223$) y entre poblaciones ($H_t = 0,2444 \pm 0.0261$) también fue baja, debido posiblemente a la fuerte filopatría de las hembras y a la presencia de pocos machos reproductores en las playas de anidación. En general, la diferenciación genética ($G_{st} < 0,5$) entre poblaciones mostró ser baja pero mayor dentro de los dos grupos estudiados. El flujo genético ($N_m=1,2862$) cercano a uno, permite inferir que es lo suficientemente necesario para impedir un evento evolutivo (especiación o deriva génica) ya que según su estructura se comportan como una misma población ($F_{st}=0,1627$). Se recomienda el mismo manejo para estos dos grupos poblacionales para planes de conservación.

PALABRAS CLAVE: Diversidad Genética, RAPDs-PCR, flujo genético, *Caretta caretta*

III CONGRESO COLOMBIANO DE ZOOLOGIA

EVALUACION Y ESTANDARIZACION POR RAPDs-PCR EN LA TORTUGA CABEZONA *Caretta caretta* (TESTUDINES:CHELONIIDAE)

***Martínez- Ortega, J.C. Universidad Jorge Tadeo Lozano de Bogotá.

julioc.martinez@utadeo.edu.co

Hernández-Fernández, J. Universidad Jorge Tadeo Lozano de Bogotá

*Autor de correspondencia: javier.hernandez@utadeo.edu.co

RESUMEN:

Este estudio evaluó y estandarizó la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RAPD-PCR) con el fin de obtener marcadores genéticos moleculares que permitan estimar la diversidad genética de la tortuga cabeza. Se aisló ADN de *C. caretta* de 2 zonas del Caribe colombiano (Don Diego N=5 e Islas del Rosario N=3) y se cuantificó obteniendo entre 8.63 -78.5 ng/μl. Se aplicó una matriz ortogonal de Taguchi que permitió reducir de 81 a 9 el número de reacciones. Las mejores condiciones de reacción se determinaron evaluando concentraciones de 0.59 a 7.85 ng de ADN, 2.0 a 4.0 mM MgCl₂, 1 a 6 unidades de Taq polimerasa y de 0.1 a 0.5 μM de oligonucleótidos. Las condiciones estandarizadas se dieron con 7.85 ng/μl de ADN, 3.5 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTP's, 0.5 μM de oligonucleótido, 5 unidades de Taq Polimerasa, en un volumen de reacción de 20 μl. La diversidad genética se determinó por el índice de Shannon obteniendo valores entre 2.19-2.48 para los individuos de Don Diego y entre 0.39-1.38 para los de Isla del Rosario. La uniformidad (Índice de Pielou) fue de 1, indicando una fuerte similaridad genética en los dos grupos de tortugas. En general, los RAPDs son una alternativa confiable para futuros estudios en la tortuga cabeza, teniendo en cuenta las condiciones de reacción ya estandarizadas.

RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPDs) PARA LA DETERMINACION GENETICA DE *Caretta caretta* (LINNAEUS, 1758): ESTUDIO PRELIMINAR EN EL CARIBE COLOMBIANO

RESUMEN:

Caretta caretta es una especie que anida las playas del Caribe colombiano, sin embargo se ha registrado en los últimos años un alto declive poblacional, por lo que está catalogada en peligro de extinción. Se colectaron muestras de sangre de los senos sanguíneos cervicales de 8 individuos, pertenecientes a dos grupos del Caribe, Don Diego, Magdalena (N=5) e Islas del Rosario, Cartagena(N=3). Por marcadores RAPDs-PCR, se estimó la variación genética para estos grupos. La diversidad genética fue considerada en los dos grupos como baja. Los niveles de heterocigocidad para Don Diego $H^*=0,3095$ e Islas del Rosario $H^*=0,1793$. La variación genética dentro ($H_s = 0,3394$) y entre ($H_t = 0,2444$) poblaciones también fue baja, debido posiblemente a la fuerte filopatría de las hembras y a la presencia de pocos machos reproductores en las playas de anidación. En general, la diferenciación genética $G_{st} < 0,5$ manifestado una poca diferenciación genética entre poblaciones y una mayor diferenciación dentro individuos de una misma población, así mismo, el $N_m=1,2862$ o flujo genético es cercano a uno, permitiendo inferir que es lo suficientemente necesario para impedir un evento evolutivo (especiación o deriva génica) ya que según su estructura se comportan como una misma población ($F_{st}=0,1627$)