

VARIACIÓN GENÉTICA TEMPORAL DEL CARACOL PALA (*STROMBUS GIGAS*) EVIDENCIADA POR MICROSATÉLITES EN EL ATOLÓN BOLÍVAR, ARCHIPIÉLAGO DE SAN ANDRÉS, PROVIDENCIA Y SANTA CATALINA

R.M. Landínez-García¹, J.D. Rangel-Medrano¹, Erik R. Castro-González², Edna Márquez^{1*}

¹Grupo de Biotecnología Animal, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Universidad Nacional de Colombia, Calle 59ª No 63–20, Medellín, Colombia. * E-mail: ejmarque@unal.edu.co. ²Secretaría de Agricultura y Pesca del Departamento Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina.

RESUMEN

El atolón Bolívar es uno de los sitios del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina que presenta una baja recuperación en la densidad poblacional del caracol pala *Strombus gigas*, por lo tanto el monitoreo de la diversidad genética de la especie en este sitio constituye un punto crucial en la selección de alternativas adecuadas de manejo sostenible y actividades de conservación. Con el fin de detectar diferencias en la diversidad genética del caracol pala en este atolón, en el presente trabajo se compararon muestras recolectadas en los años 2007 y 2008 empleando seis *loci* microsatélites, el estadístico Φ_{ST} y análisis de varianza molecular (AMOVA). Los resultados del análisis genético indicaron que todos los *loci* fueron polimórficos, presentaron déficit de heterocigosidad y desviación del equilibrio Hardy-Weinberg. Las muestras recolectadas en 2008 presentaron un menor número de alelos por *locus* y fueron genéticamente diferentes de las recolectadas en 2007 ($\Phi_{ST} = 0,070$ P= 0.000). Los resultados en conjunto sugieren una disminución significativa de la variación genética de poblaciones de *Strombus gigas* ocurrida en un periodo muy corto de tiempo en el atolón Bolívar lo que amerita tomar medidas urgentes que permitan la recuperación de la densidad poblacional de la especie dentro de esta área.

ABSTRACT

Temporal genetic variation of the Queen Conch (*Strombus gigas*) as evidenced by microsatellites in East-South East Atoll, San Andrés, Providencia and Santa Catalina Archipelago. East-South-East (ESE) is one of the atolls of the Archipelago of San Andres, Providence and Santa Catalina, which has a low recovery of density population of *Strombus gigas*, therefore monitoring of genetic diversity of the species on this site is a crucial point in the choice of suitable alternative for sustainable management and conservation activities. Here, we compared samples collected in the years 2007 and 2008 using six microsatellite *loci*, the statistical Φ_{ST} and analysis of molecular variance (AMOVA) to detect temporal genetic variation in queen conch populations from this atoll. All *loci* were polymorphic, showed deficits of heterozygosity and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Samples collected in 2008 showed a lower number of alleles per *locus* and were genetically different from those collected in 2007 ($\Phi_{ST} = 0.070$ $P = 0.000$). Our results suggest a significant decrease in genetic variation of populations of *Strombus gigas* occurred in a very short period on the ESE atoll which demand urgent action to recovery of the population density of the species within this area.

Palabras claves: Diversidad genética, Microsatélites, AMOVA, Conservación.

INTRODUCCIÓN

El caracol pala (*Strombus gigas*) es una de las siete especies de la familia Strombidae que habita las aguas del océano Atlántico, desde la costa norte de América Latina, hasta el sur de la Florida y Bermuda (Catarci, 2004). Su pesca, consumo y aprovechamiento artesanal hace parte del acervo cultural y mitológico de larga tradición en el Caribe, desde épocas pre colombinas (Álvarez-León *et al.*, 2007).

En la actualidad los sitios de mayor pesca de *S. gigas* en Colombia están concentrados en los Archipiélagos de San Andrés y de Providencia y la península de la Guajira, sin embargo, estas regiones han experimentado una considerable reducción de sus poblaciones naturales debido

principalmente a la sobreexplotación a la que se encuentran sometidas y a la destrucción de su hábitat natural (Theile, 2001; Ardila *et al.*, 2002; Álvarez-León *et al.*, 2007).

A pesar del diseño e implementación de medidas de manejo nacionales e internacionales con el fin de controlar la sobreexplotación y el acceso a estos recursos, tales como vedas de capturas, talla de captura mínima, cuotas de captura y en muchos casos el cierre total de la pesquería (Prada *et al.*, 2009), en la mayoría de los casos las poblaciones actuales presentan una disminución en su densidad poblacional (Ballesteros *et al.*, 2005), estado bajo el cual se cree insostenible mantener las poblaciones en condiciones propicias para su auto-recuperación (Stoner y Ray-Culp, 2000).

Este es el caso del atolón Bolívar, localizado al suroeste del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, donde se presenta baja recuperación en la densidad poblacional de *S. gigas*. Debido a que las poblaciones con densidades poblacionales críticamente bajas presentan un tamaño efectivo poblacional reducido (bajo número de adultos que aporten gametos a la población), es razonable pensar que están expuestas a alta tasa de endogamia, deriva y pérdida de variación genética. En este trabajo se contrastó la hipótesis anterior con el análisis de seis *loci* microsatélites recientemente desarrollados para esta especie.

ÁREA DE ESTUDIO

Se utilizaron muestras de tejido muscular de la región del manto de 55 especímenes recolectados durante los años 2007 y 2008 en cayo Bolívar (12°24 'N 81°27 'O), atolón ubicado a 25 km al Suroeste de la Isla de San Andrés. Las muestras se preservaron en Alcohol etílico al 90% hasta la llegada al Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

MATERIALES Y MÉTODOS

Amplificación y genotipificación de microsatélites

La extracción del ADN se realizó con la ayuda del kit comercial DNAeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Duesseldorf, Alemania), se cuantificó mediante fluorimetría utilizando el equipo VersaFluor (Bio-Rad, Philadelphia, USA) con el respectivo Fluorescent DNA quantification Kit (Bio-Rad, Philadelphia, USA). Para la genotipificación, las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 10 μL , con amortiguador de PCR 1X (Invitrogen, California, USA), 2.75 mM de MgCl_2 , 0.1 mM de dNTPs, 0.5 μM de cada uno de los cebadores, 0.04 unidades μL^{-1} de Taq recombinante (Invitrogen, California, USA) y 5 ng μL^{-1} de ADN. El cebador derecho de todos los pares de cebadores fue marcado fluorescentemente con Cy5.0 o Cy5.5 (MWG Biotech, Atlanta, USA). Se programó el termociclador T3 (Biometra, Göttingen, Alemania) con una rampa de dos, una desnaturalización inicial de 2 min a 90°C, seguida de 32 ciclos con el siguiente perfil: 15 seg a 94°C, 10 seg a la temperatura específica de cada cebador (59°C para DQ533622, DQ533624; 61°C para DQ533623, AY707892; y 63°C para AY707890, AY707891), 10 seg a 72°C, y una extensión final de 15 min a 72°C. Los productos de PCR se desnaturalizaron por incubación a 80°C por 3 minutos en una mezcla 1:1 (v/v) del producto de amplificación y el buffer: 99% formamida (Amresco, Ohio, USA) y 0.1% de azul de bromofenol (Sigma, St. Louis, USA). Los fragmentos se separaron en un secuenciador automático Long-Read Tower™ System (Siemens AG, Munich, Germany) con sus accesorios y reactivos, según los manuales provistos por el fabricante. El equipo se programó bajo las siguientes condiciones de corrido: 1500 V, 58°C de temperatura , 50% de potencia del láser, 1 seg de lectura y 45 min de corrido en presencia de TBE 1X. El tamaño de cada amplificado se calculó con el software Gene Objects V3.0 (Siemens AG, Munich, Germany) utilizando como referencia marcadores internos de tamaño conocido (102, 137 y 216 pb). Para la selección del pico verdadero y la determinación de su condición de homocigoto o heterocigoto, se siguieron las recomendaciones de Butler (2001).

Análisis de datos

La diversidad genética de cada una de las poblaciones de estudio se estimó mediante el cálculo del promedio de alelos por *locus* (N_a), el número de *loci* polimórficos (P), la heterocigosidad media observada (H_o), la esperada (H_e) en el equilibrio Hardy Weinberg y el índice de fijación F_{is} conocido como índice de endogamia. Para llevar a cabo la determinación del grado de diferenciación genética entre las poblaciones examinadas se utilizó el estadístico Φ_{ST} y el análisis de varianza molecular

(AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), utilizando el programa GenAEx versión 6.2 (Peakall y Smouse, 2006). La significancia estadística de las pruebas se estimó con 10000 permutaciones al 95%. Las comparaciones múltiples fueron ajustadas por la Prueba de *Bonferroni* (Dunn-Sidak) al 95% (Sokal y Rohlf, 1995).

RESULTADOS

Todos los *loci* fueron polimórficos, presentaron déficit de la heterocigosidad y sus frecuencias alélicas estuvieron alejadas del equilibrio Hardy-Weinberg. La muestra recolectada en 2007 presentó mayor diversidad genética debido a su mayor número de alelos por *locus* (Tabla 1, Figura 1). De manera adicional, el análisis AMOVA mostró diferencias genéticas estadísticamente significativas entre las muestras recolectadas en los dos períodos ($\Phi_{ST} = 0,070$ P= 0.000).

DISCUSIÓN

El presente estudio mostró que las muestras recolectadas en los dos períodos fueron significativamente diferentes. La metodología empleada ha servido para realizar el análisis genético de 189 especímenes provenientes del Caribe colombiano, el cual sugirió que el déficit de heterocigosidad observado en todos los *loci* reflejan más un problema biológico que técnico (Segura, 2010).

La diferencia genética entre muestras temporales, sumada a la reducción en el número de alelos por *locus*, sugiere una disminución de la variabilidad genética en el atolón Bolívar ocurrida en un breve periodo de tiempo. Lo anterior puede ser el resultado de fenómenos recientes de origen antrópico como la sobrepesca, factor ampliamente reconocido como precursor de la pérdida de variabilidad genética (Myers *et al.*, 1995; Hauser *et al.*, 2002; Ahlroth *et al.*, 2003; Hoarau *et al.*, 2005). Este aspecto puede estar potenciado por el efecto Allee debido a la disminución de la reproducción

(Castro *et al.*, 2007) y a la baja densidad media de adultos registrada para Cayo Bolívar en 2007 (8.7 ind/ha) (Ballesteros *et al.*, 2005; Prada *et al.*, 2009), la cual es inferior a la densidad mínima requerida para que ocurran eventos reproductivos (50 ind/ha, efecto Allee) (Stoner y Ray-Culp, 2000).

Nuestros resultados indican que las poblaciones de Cayo Bolívar son susceptibles a los efectos nocivos de la deriva genética y la endogamia. Por lo anterior, la recuperación de estos stocks requerirá del esfuerzo concertado de la comunidad y organismos estatales para la implementación conjunta de diferentes medidas de conservación. Estos esfuerzos deben considerarse en una escala geográfica mayor para garantizar el abastecimiento natural de individuos a partir de poblaciones fuente.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue financiada por el Instituto para la Ciencia y la Investigación “Francisco José de Caldas” Proyecto 111809-17772, Contrato 212/2005. Esta investigación se realizó bajo el permiso de acceso a recursos genéticos emanado del Ministerio Colombiano de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial N° 18 del 8 de julio de 2008.

BIBLIOGRAFIA

- Ahlroth, P., R. Alatalo, A. Holopainen, T. Kumpulainen, y J. Suhonen. 2003. Founder population size and number of source populations enhance colonization success in waterstriders. *Oecologia*, 137: 617-620.
- Álvarez-León, R., F. d. P. Gutiérrez-Bonilla, J. F. Ospina-Arango, y E. Chiquillo-Espítia. 2007. El caracol de pala (*Strombus gigas* Linnaeus, 1758) en el Caribe Colombiano: Revisión monográfica. *Bol. Cient. Mus. His. Nat.*, 11: 301-332.
- Ardila, N., G. R. Navas, y J. O. Reyes. 2002. Libro rojo de invertebrados marinos de Colombia. INVEMAR. Ministerio de Medio Ambiente, Bogotá. 177 p.
- Ballesteros, F., C. García, M. Rueda, K. Gómez, y L. S. Mejía. 2005. Relative abundance and fishery characterization of queen conch *Strombus gigas* (Mesogastropoda: Strombidae) in the archipelago of San Bernardo, Colombian Caribbean. *Proc. GCFI*, 58: 393-398.
- Butler, J. 2001. Forensic DNA typing: Biology & technology behind STR markers. Academic Press, USA. 322 p.
- Castro, E. R., L. Frenkiel, E. Baqueiro, y D. Aldana. 2007. Atypical reproductive cycle of the queen conch *Strombus gigas* (Mollusca: Gastropoda). *Proc. GCFI*, 58: 443-450.
- Catarci, C. 2004. World markets and industry of selected commercially-exploited aquatic species with an international conservation profile. FAO, Rome. 186 p.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, y J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Hauser, L., G. J. Adcock, P. J. Smith, J. H. Bernal, y G. R. Carvalho. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of new zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Natl. Acad. Sci.*, 99: 11742-11747.
- Hoarau, G., E. Boon, D. N. Jongma, S. Ferber, J. Palsson, H. W. Van der Veer, A. D. Rijnsdorp, W. T. Stam, y J. L. Olsen. 2005. Low effective population size and evidence for inbreeding in an

overexploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa* L.). Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci., 272: 497-503.

Myers, R. A., N. J. Barrowman, J. A. Hutchings, y A. A. Rosenberg. 1995. Population dynamics of exploited fish stocks at low population levels. Science, 269: 1106-1108.

Peakall, R., y P. E. Smouse. 2006. Genalex 6: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes, 6: 288–295.

Prada, M., E. R. Castro, E. Taylor, V. Puentes, R. S. Appeldoorn, y N. Daves. 2009. Non-Detrimental findings for the Queen Conch in Colombia. NOAA Fisheries-Blue Dream LTDA, San Andres Island. 51p.

Segura, J. A. 2010. Análisis genético de caracol pala *Strombus gigas* en el Caribe colombiano. Tesis de Maestría. Posgrado en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 57 p.

Sokal, R. R., y F. J. Rohlf. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Co, New York. 887 p.

Stoner, A. W., y M. Ray-Culp. 2000. Evidence for Allee effects in an over-harvested marine gastropod: Density-dependent mating and egg production. Mar. Ecol. Prog. Ser., 202: 297-302.

Theile, S. 2001. Queen conch fisheries and their management in the Caribbean. TRAFFIC Europe, Brussels. 95 p.

Tabla 1. Variación temporal de la diversidad genética de dos poblaciones de *Strombus gigas*. N: número de individuos; Na: número de alelos por *locus*; Ho: heterocigosidad media observada; He: heterocigosidad media esperada; F_{is} : índice de endogamia. *Significancia estadística para el equilibrio Hardy-Weinberg a $P < 0.001$.

Locus(Código)	Bolívar 2007					Bolívar 2008				
	N	Na	Ho	He	F_{is}	N	Na	Ho	He	F_{is}
AY707889 (H)	19	14	0.158	0.896	0.824*	21	11	0.190	0.848	0.775*
DQ533624 (B)	31	12	0.452	0.807	0.440*	20	12	0.550	0.860	0.360*
DQ533622 (A)	30	10	0.233	0.723	0.677*	22	4	0.409	0.646	0.366*
AY707892 (G)	29	6	0.276	0.641	0.570*	23	5	0.609	0.684	0.110*
DQ533623 (D)	31	5	0.710	0.549	-0.293*	22	3	0.273	0.616	0.557*
AY707891 (F)	30	5	0.133	0.624	0.786*	24	3	0.083	0.457	0.818*
Promedio	28	9	0.327	0.707	0.501*	22	6	0.352	0.685	0.498*

LEYENDA DE LAS FIGURAS

Figura 1. Alelos por *locus* en el atolón Bolívar en las muestras tomadas en los años 2007 y 2008.

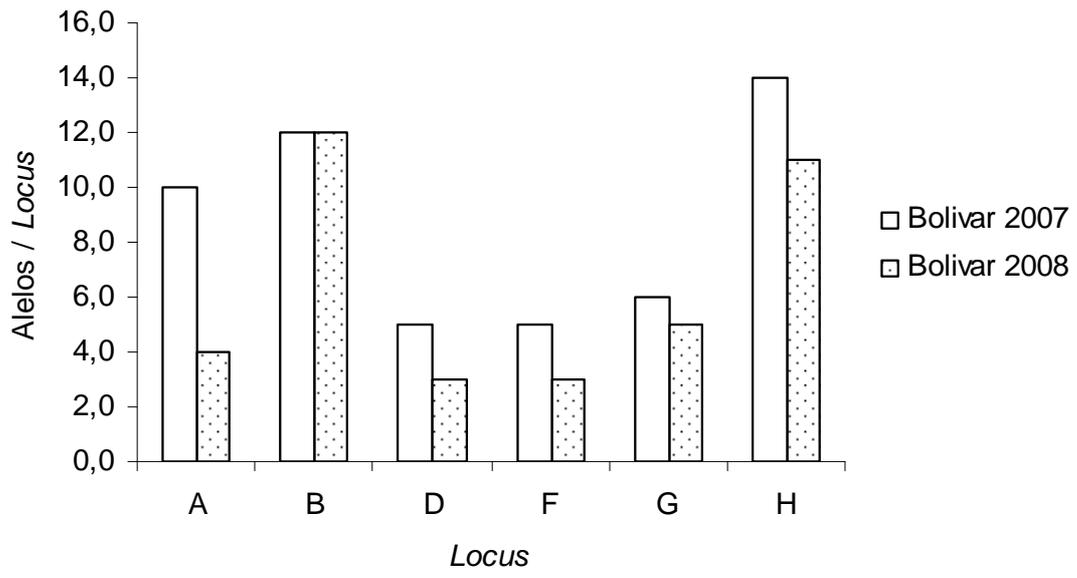


Figura 1.