CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS MANATÍES *Trichechus manatus manatus* DEL MAGDALENA MEDIO

Katerin Arévalo-González
PVS/Cabildo Verde

Junio, 2021

ACLARACIÓN

El presente documento hace parte de la colaboración pre-existente entre la Organización Cabildo Verde y el Laboratorio de Ecología Molecular de Vertebrados Acuáticos (LEMVA) del Departamento de Ciencias Biológicas en la Universidad de los Andes. Gracias a los aportes realizados por el Proyecto Vida Silvestre, las muestras de manatíes del Magdalena Medio han sido incluidas en un esfuerzo nacional de cooperación interinstitucional que permite un mejor entendimiento y análisis de los resultados acá presentados.

La información que a continuación se presenta está incluida en la publicación, sometida el pasado 17 de junio de 2021 a la revista Frontiers (Anexo 1):

Caballero, S., Ortiz-Giral, M.C., Bohorquez, L., Lozano, J.D., Arévalo-González, K., y D. Caicedo. *In press*. Mitochondrial genetic diversity, population structure and detection of Antillean and Amazonian manatees in Colombia: new areas and new techniques.

Para el proyecto, fueron adquiridos 50 kits para purificación de ADN y 1000 OneTaq de AND polimerasa con los que se espera trabajar muestras de heces para extracción de AND, sin embargo, estos materiales fueron entregados en su totalidad hasta el 12 de julio de 2021 (Anexo 2) a razón del paro nacional que retrasó la entrada y distribución de materiales al país, adicionalmente los laboratorios de la Universidad de los Andes se encontraban cerrados por la misma razón. Por tales motivos, se espera que para el segundo semestre de 2021 sea posible continuar con esta parte de la investigación.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN 4
OBJETIVO 4
METODOLOGÍA 4
Obtención de muestras 4
Análisis en laboratorio 6
Extracción, amplificación t secuenciación de ADN 6
Análisis de datos de ADNmt 6
RESULTADOS 7
Estructura de la población y diversidad genética de la región de control del ADN mitocondrial 7
DISCUSIÓN 9
Confirmación de resultados anteriores para T. manatus y resultados iniciales de nuevas áreas de muestreo 9
Implicación de conservación de este estudio 10
AGRADECIMIENTOS 10
Referencias 11

INTRODUCCIÓN

Si bien en Colombia contamos con la presencia del manatí Antillano – *Trichechus manatus manatus* en varias cuencas y afluentes de ríos principales como Atrato, Sinú, Magdalena, Cauca, San Jorge y Orinoco (Montoya-Ospina et al., 2001), es poco lo que conocemos de información genética de la especie que nos de luces sobre su pasado, presente y potencial futuro para enmarcar estrategias de conservación. Con la información existente, se ha separado la población del Magdalena Medio específicamente con muestras de la Ciénaga de Paredes de las que habitan en los ríos Río Sinú, Río Magdalena Norte, Río San Jorge, y los Ríos Meta y Orinoco (Satizábal *et al.,* 2012). Esta separación se puede sustentar posiblemente dado al aislamiento que los manatíes pueden presentar en esta zona media de la cuenca del Magdalena, ya que esta ciénaga en particular no está conectada directamente al río principal y el camino que recorre su cauce para encontrar el afluente más cercano presenta una gran degradación por acciones antrópicas que puede estar generando barreras para la migración de los manatíes en el área. A nivel regional y nacional, se ha reiterado la necesidad de investigaciones genéticas que aclaren más el panorama del estado de las poblaciones y den directrices para acciones de conservación que propendan la supervivencia de la especie en el territorio (Trujillo *et al.,* 2006; Arcila *et al.,* 2013). Pese a esta información, no se conoce la diversidad genética ni la estructura poblacional de los manatíes en la parte media de la cuenca del Magdalena, la cual cuenta con múltiples afluentes con la presencia de esta especie.

OBJETIVO

Describir la diversidad genética y la estructura poblacional de manatíes antillanos (*Trichechus manatus manatus*) distribuidos en el Magdalena medio a partir de análisis de ADN mitocondrial.

METODOLOGÍA

Obtención de muestras

Para la consecución de material genético se utilizaron muestras provenientes de varamientos de animales muertos atendidos por Cabildo Verde en el departamento de Santander entre 2006 y 2020 por medio de autorización

de la Corporación Autónoma Regional de Santander – CAS y se incluyó una muestra de tejido adicional proporcionada por el señor Silfredo Campo de la comunidad de San Miguel del Tigre, obtenida de un manatí muerto en el Complejo Cenagoso de El Totumo (Antioquia) (Tabla 1).

Tabla 1. Proveniencia de muestras usadas para caracterización genética de manatíes en el Magdalena medio

Código	Fecha	Lugar		Sexo	Clase etárea	Estado del animal	Causa de muerte
		Depto	Cuerpo de agua				
Tmm_20160310_1	10/03/2016	Santander	Ciénaga de San Silvestre	Hembra	Juvenil	Muerto	Aplastamiento
Tmm_20160818_1	18/08/2016	Antioquia	Complejo Cenagoso El Totumo	Indet.	Cría	Muerto	No determinada
Tmm_20160913_1	13/09/2016	Santander	Ciénaga de San Silvestre	Hembra	Cría	Muerto	Herido
Tmm_20160925_1	25/09/2016	Santander	Caño San Silvestre	Macho	Cría	Muerto	Cría
Tmm_20200519_1	19/05/2020	Santander	Ciénaga de Paredes	Hembra	Adulto	Muerto	No determinada
Tmm_20200915_1	15/09/2020	Santander	Ciénaga de Paredes	Macho	Adulto	Muero	Natural

Fuente: Equipo de trabajo Cabildo Verde, 2021

Infortunadamente, las dos muestras de la Ciénaga de San Silvestre no se lograron amplificar, probablemente porque el ADN estaba muy degradado, al haber sido obtenido de tejidos de dos animales en alto grado de descomposición. Sin embargo, se logró la amplificación exitosa de las cuatro muestras restantes. Todas estas muestras fueron consideradas como la región el Magdalena Medio.

Durante el análisis se incluyeron muestras obtenidas de animales libres, varados, muertos o en programas de rehabilitación en Colombia (Tabla 2) entre 2014 y 2020.

Tabla 2. Muestras adicionales tenidas en cuenta para análisis de resultados

Lugar	Región geográfica o cuenca	Número de muestras
Aguachica, Cesar	Depto. Cesar	9
Magangué, Bolívar	Bajo Magdalena	1
Canal del Dique, Bolívar	Canal del Dique	2
El Corchal, Bolívar	Golfo de Morrosquillo	1
Bahía de Cispatá, Córdoba	Golfo de Morrosquillo	3
Ciénaga grande de Lorica, Córdoba	Cuenca Sinú	6
Ciénaga de Ayapel, Córdoba	Cuenca San Jorge	1
Necoclí, Antioquia	Golfo de Urabá	2
Río Meta, Vichada	Cuenca Meta/Orinoco	2

Fuente: *LEMVA. Universidad de los Andes*, 2021

Análisis en laboratorio

Extracción, amplificación t secuenciación de ADN

El ADN total fue extraído de dichas muestras utilizando el kit Quick-DNA Miniprep de Zymo Research. Las concentraciones de ADN se comprobaron en una nanogota y se procesaron en un gel de agarosa al 0,8% para evaluar la calidad del ADN. Aproximadamente 410 pb de la región de control mitocondrial (mtDNA CR) fueron amplificados utilizando los cebadores CR-4 y CR-5 y siguiendo los protocolos de Satizábal et al. (2012) y Vianna et al. (2006). Los productos de PCR amplificados con éxito se limpiaron utilizando perlas magnéticas y se secuenciaron en un ABI 3500 en la Universidad de los Andes.

Análisis de datos de ADNmt

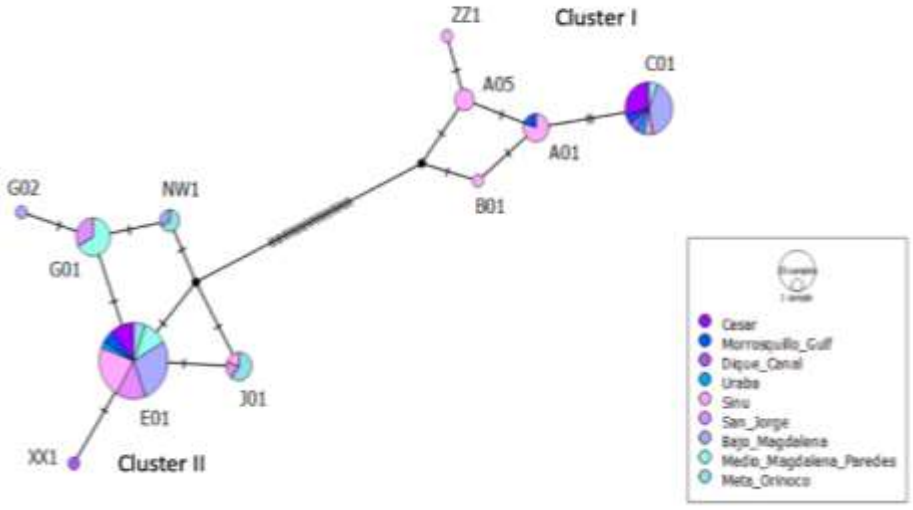
Las secuencias se editaron y alinearon manualmente con Geneious Prime (ww.geneious.com). Con el fin de detectar posibles nuevos haplotipos entre las nuevas muestras incluidas en este estudio, las comparaciones con los haplotipos definidos por García-Rodríguez et al., (1998), Vianna et al. (2006), Satizábal et. al., (2012), Luna et al., (2021).

Se utilizó la longitud total de la secuencia de 410 pb para las comparaciones y las secuencias de las muestras de este estudio se combinaron con secuencias obtenidas previamente por Satizábal et al. (2012). Los haplotipos se definieron utilizando MacClade (Maddison y Maddison, 2000). Las redes de haplotipos se construyeron utilizando la metodología de parsimonia estadística implementada en el software TCS Vs. 1.21 (Clement, Posada y Crandall, 2000). Se construyó la red de haplotipos que incluyó los resultados de este estudio y Satizábal et al. (2012). Los análisis de diferenciación genética se realizaron usando un análisis de varianza molecular (AMOVA) como se implementó en Arlequin (Excoffier et al., 2005) basado en estadísticas convencionales F_{ST} y Φ_{ST}, usando 10,000 permutaciones aleatorias. Los cálculos de diversidad de haplotipos (h) y nucleótidos (π) se realizaron en el programa Arlequin (Schneider, Roessli y Excoffier, 2000).

RESULTADOS

Estructura de la población y diversidad genética de la región de control del ADN mitocondrial

Se identificaron once haplotipos CR de ADNmt entre un total de 82 muestras recolectadas en lugares de muestreo colombianos (este estudio y Satizábal et al., 2012). En este estudio se identificaron dos nuevos haplotipos (haplotipos XX1 y ZZ1, números de acceso de Genbank...), identificados en una muestra del Canal del Dique y en una muestra de la cuenca del río Sinú. En la red de haplotipos agrupando los encontrados solo en los lugares de muestreo de Colombia (Figura 1) estos 11 haplotipos se distribuyeron entre dos grupos (grupo o cluster I y II), previamente identificados para la especie CR (Vianna et al., 2006; Satizábal et al., 2012). Cada uno de los haplotipos identificados recientemente pertenecía al grupo I y al grupo II, respectivamente. El Haplotipo ZZ1, encontrado en una nueva muestra del río Sinú, diferenciándose en un paso mutacional del A05, agrupado en el grupo I, previamente identificado también en muestras del río Sinú. El Haplotipo XX1, identificado en una muestra de Canal del Dique, que difiere en un paso mutacional del E01, agrupado en el grupo II. Los haplotipos C01 (grupo I) y E01 (grupo II) parecen ser los dos haplotipos ancestrales en las poblaciones colombianas.



Fuente: *LEMVA. Universidad de los Andes*, 2021

Figura 1. Red de haplotipos de ADNmt de manatíes Antillanos encontrados y organizaos en dos grupos (cluster)

Las muestras del Golfo de Urabá y del Canal del Dique no pudieron incluirse en el análisis poblacional debido a su reducido tamaño de muestra (n ≤ 2). Se encontró diferenciación poblacional significativa a nivel F_{st} entre el río Sinú y Cesar, el río Medio Magdalena y el río Bajo Magdalena; entre el Cesar y Magdalena Medio y el río Meta/Orinoco; entre el Bajo Magdalena y el Medio Magdalena y el río Meta/Orinoco y entre el Magdalena Medio y el río Meta/Orinoco. En el nivel Φ_{st}, se encontró diferenciación entre las muestras del Cesar y Magdalena Medio, el río San Jorge y el río Meta/Orinoco; entre el Golfo de Morrosquillo y el Magdalena Medio y entre el río San Jorge y el Bajo Magdalena (Tabla 3).

Tabla 3. Comparaciones pareadas para valores de F_{st} (bajo la diagonal) y Φ_{st} (sobre la diagonal) Para la región control del ADN mitocondrial (410 pb) entre siete regiones geográficas de Colombia para T. manatus their small sample size.

Φ_{st} / F_{st}	Cesar (n=9)	Golfo de Morrosquillo (n=4)	Sinu (n=19)	San Jorge (n=9)	Bajo Magdalena (n=19)	Medio Magdalena/ Paredes (n=11)	Meta/Orinoco (n=7)
Cesar	-	0.197	0.045	**0.489**	0.015	**0.347**	**0.430**
Golfo de Morrosquillo	0.058	-	0.165	0.508	0.129	**0.281**	0.416
Sinú	**0.130**	0.112	-	**0.388**	0.015	**0.286**	**0.346**
San Jorge	0.207	0.001	0.057	-	**0.234**	0.021	0.044
Bajo Magdalena	0.044	0.096	**0.079**	0.116	-	0.126	0.196
Medio Magdalena/ Paredes	**0.253**	0.117	**0.160**	0.020	**0.205**	-	0.000
Meta/Orinoco	**0.253**	0.075	0.097	0.121	**0.191**	**0.238**	-

Valores de probabilidad basados en 10,000 permutaciones. Valores significativamente diferentes (P < 0.05) en negrita.

Fuente: *LEMVA. Universidad de los Andes*, 2021

La diversidad de haplotipos (*h*) fue más alta para Canal del Dique y Urabá con un haplotipo definido para cada una de las dos muestras en cada ubicación. El Golfo de Morrosquillo también mostró una alta diversidad de haplotipos, seguido por el río Sinú y el río Meta/Orinoco. Las cuencas de los ríos San Jorge, Medio Magdalena y Bajo Magdalena tuvieron niveles similares, pero ligeramente más bajos de diversidad de haplotipos y Cesar mostró la menor diversidad de haplotipos (Tabla 4). Las diversidades de nucleótidos (π) fueron más altas para el Canal del Dique y el Golfo de Urabá, seguidos

por el Golfo de Morrosquillo, Cesar, el río Sinú y el río Bajo Magdalena, con los valores más bajos en el río Medio Magdalena y los ríos Meta/Orinoco.

Tabla 4. Estadísticas de diversidad genética de T. manatus en lugares de muestreo y otras áreas de comparación en Colombia. Diversidad haplotípica (h) y nucleótida (π) (en %) mostrada para cada lugar (±SD).

	Cesar	Golfo de Morrosquillo	Canal del Dique	Golfo de Urabá	Sinú	San Jorge	Bajo Magdalena	Medio Magdalena/ Paredes swamp	Meta /Orinoco
No. individuos	9	4	2	2	19	9	19	11	7
No. Haplotypos	2	3	2	2	7	3	4	3	3
h	0.556 ± 0.090	0.833 ± 0.222	1.000 ± 0.500	1.000 ± 0.500	0.784 ± 0.074	0.639 ± 0.126	0.614 ± 0.075	0.618 ± 0.104	0.762 ± 0.115
π	3.6 ± 0.020	4.5 ± 0.030	6.8 ± 0.069	6.6 ± 0.067	3.5 ± 0.018	0.2 ± 0.002	3.3 ± 0.017	1.3 ± 0.008	0.4 ± 0.003

DISCUSIÓN

Confirmación de resultados anteriores para T. manatus y resultados iniciales de nuevas áreas de muestreo

Estos nuevos análisis confirman los patrones de estructura poblacional descritos anteriormente, incluida una diferenciación significativa entre las poblaciones de manatíes Antillanos en la parte baja y media del río Magdalena, entre el río Magdalena y las cuencas del Meta/Orinoco y entre el río Sinú y el río Magdalena (Satizabal et al., 2012). Posiblemente el pequeño tamaño de muestra del Golfo de Morrosquillo impidió evidenciar una diferenciación significativa entre este lugar de muestreo y los otros lugares de muestreo en el nivel F_{st}, sin embargo, en el nivel Φ_{st} se evidenció una diferenciación significativa entre el Golfo de Morrosquillo y el Magdalena Medio, posiblemente debido a la presencia de un haplotipo (A1) que no se ha encontrado en el río Magdalena. La falta de una diferenciación significativa en el nivel F_{st} entre el río San Jorge y los ríos Sinú y Magdalena (incluida la ubicación de muestreo en Cesar) podría confirmar aún más el potencial de conectividad entre estas dos cuencas a través de llanuras aluviales (es decir, pantanos en la cuenca del río San Jorge y en la cuenca del

río Magdalena) de por la conectividad mantenida por los animales que se desplazan desde el río Sinú hacia la costa y luego al Canal del Dique y luego al Bajo Magdalena y al río San Jorge, como se sugiere en Satizábal et al. (2012). Realizando análisis de diferenciación genética global se confirma la diferenciación de las poblaciones colombianas con la población de la mayoría de las otras ubicaciones geográficas en Florida, el Caribe, Centroamérica y Sudamérica (Caballero et al., *in press*). La falta de diferenciación entre algunos lugares de muestreo puede ser un resultado probable del intercambio de algunos haplotipos, como los haplotipos A01, C01 y E01, haplotipos que parecen ser ancestrales y están muy extendidos en la población de América Central, Colombia y el Caribe. La diversidad genética mitocondrial parece ser alta para la mayoría de los lugares de muestreo colombianos y similar a los niveles encontrados en la Guayana Francesa y México, lo que confirma los resultados de Vianna et al. (2006) y Satizábal et al. (2012).

Implicación de conservación de este estudio

Con estos resultados, se ratifica la necesidad de la realización de un monitoreo genético para las poblaciones de manatí Antillano en toda su distribución, y especialmente en la cuenca del río Magdalena donde se demuestra la presencia de más de una población con características muy interesantes. Es necesario contemplar estudios genéticos que involucren otros aspectos, se debería considerar la información de marcadores nucleares para esta especie. También se propone el uso de nuevas herramientas como la detección de presencia manatíes por medio de ADN ambiental, la cual sería útil en procesos de detección de área para nuevos proyectos de conservación y vinculación de comunidades con ciencia ciudadana.

Se espera que, con los aportes del Proyecto Vida Silvestre, la activación d la Red de Varamientos, el conocimiento tanto de las comunidades como de las entidades competentes y la Guía de Atención a Emergencias de manatíes en el Magdalena Medio, sea posible obtener mejores muestras para continuar con estudios como este, que den luces de la situación genética de la población de *Trichechus manatus manatus* en la región y sea posible aportar a las acciones concretas de conservación

AGRADECIMIENTOS

Colegas y voluntarios de la Cabildo Verde, Fundación Asomanatí, Fundación Omacha y las autoridades ambientales (CVS, CAS) que proporcionaron muestras para este proyecto. El financiamiento para este proyecto provino de una donación privada a la Universidad de los Andes, de la iniciativa del Programa de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes y al Proyecto Vida Silvestre (Ecopetrol, Fundación Santo Domingo, Fondo Acción, WCS y Cabildo Verde).

REFERENCIAS

Arcila, D., F. Trujillo, Á. Botero-Botero y L. S. Benjumea -Sánchez. 2013. Mamíferos acuáticos de la región de los Andes colombianos. En: Trujillo, F., A.

Crandall, M. C. D. P. K., Clement, M., & Posada, D. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular ecology, 9, 1657-1660.

Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary bioinformatics, 1, 117693430500100003.

García-Rodríguez, A. I., Bowen, B. W., Domning, D., Mignucci-Gioannoni, A. A., Marmontel, M., Montoya-Ospina, R. A., Morales-Vela, B., Rudin, M., Bonde, R. y McGuire, P. M. 1998. Phylogeography of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*): how many populations and how many taxa? Molecular Ecology 7: 1137-1149.

Gärtner, D. Caicedo y M. C. Diazgranados (Eds.). 2013. Diagnóstico del estado de conocimiento y conservación de los mamíferos acuáticos en Colombia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Fundación Omacha, Conservación Internacional y WWF. Bogotá, 312 p

Luna, F. D. O., Beaver, C. E., Nourisson, C., Bonde, R. K., Attademo, F. L., Miranda, A. V., ... & Hunter, M. E. 2021. Genetic connectivity of the West Indian manatee in the southern range and limited evidence of hybridization with Amazonian manatees. Frontiers in Marine Science, 7, 1089.

Maddison, D. R., & Maddison, W. P. 2000. MacClade 4. Sinauer, Sunderland, MA.

Montoya-Ospina, R. A., Caicedo-Herrera, D., Millán-Sánchez, S. L., Mignucci-Giannoni, A. A., & Lefebvre, L. W. 2001. Status and distribution of the West Indian manatee, Trichechus manatus manatus, in Colombia. Biological conservation, 102(1), 117-129.

Satizábal, P., Mignucci-Giannoni, A. A., Duchene, S., Caicedo-Herrera, D., Perea-Sicchar, C. M., García-Dávila, C. R. Trujillo, F. y Caballero, S. 2012. Phylogeography and sex-biased dispersal across riverine manatee

populations (*Trichechus inunguis* and *Trichechus manatus*) in South America. Plos One 7(12): e52468.
Satizábal, P., Mignucci-Giannoni, A. A., Duchene, S., Caicedo-Herrera, D., Perea-Sicchar, C. M., García-Dávila, C. R., ... & Caballero, S. J. 2012. Phylogeography and sex-biased dispersal across riverine manatee populations (*Trichechus inunguis* and *Trichechus manatus*) in South America. PLoS one, 7(12), e52468.
Schneider, S., Roessli, D., & Excoffier, L. 2000. Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual ver, 2, 2496-2497.
Trujillo, F., D. Caicedo, N. Castelblanco, S. Kendall, V. Holguín. 2006. Manatí del Caribe *Trichechus manatus*. p. 161. En: Rodríguez-M, J. V., Alberico, M., Truji - llo, F., Jorgenson, J. (Eds.). 2006. Libro Rojo de los Mamíferos de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Conservación Internacional Colombia, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá, Co - lombia. 433 pp
Vianna, J. A., Bonde, R. K., Caballero, S., Giraldo, J. P., Lima, R. P., Clark, A. M., Marmontel, M., Morales-Vela, B, Souza, M. J., Parr, L., Rodríguez-López, M. A., Mignucci-Giannoni, A. A., Powell, J. y Santos, F. R. 2006. Phylogeography, phylogeny and hybridization in trechechid sirenians: implications on manatee conservation. Molecular Ecology 15:433-447.