

Diversidad haplotípica en el manatí *Trichechus manatus* en Cuba: Resultados preliminares

Damir Hernández Martínez¹ , Anmari Álvarez-Alemán¹, Robert K. Bonde², James A. Powell³, Erik García-Machado¹

¹Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Calle 16, No. 114 entre 1ra y 3ra, Miramar, Playa, Ciudad Habana 11300, Cuba.

²United States Geological Survey, Sirenia Project, 7920 NW 71 Street, Gainesville, Florida, 32653, USA.

³NGO Sea to Shore Alliance, 4411 Bee Ridge Road, Sarasota, Florida, 34233, USA.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue obtener información preliminar acerca de la composición de haplotipos del ADN mitocondrial (ADNmt) del manatí (*Trichechus manatus*) que habita en el archipiélago cubano. Se analizó un total de 13 individuos, 12 de Cuba y uno procedente de la Florida, EU. Las secuencias de un fragmento de 410 pb de la región de control del ADNmt (*D-loop*) permitieron identificar dos haplotipos. El haplotipo A1, único encontrado en la Florida (incluida la muestra aquí analizada), pero también presente en México, Puerto Rico y República Dominicana. Este haplotipo fue mayoritario (11 de los 12 individuos muestreados en Cuba). El segundo haplotipo fue el A3, referido anteriormente como endémico de Belice, se encontró en un individuo varado en Isabela de Sagua, al norte de Cuba. Los resultados preliminares, sobre la base de las muestras examinadas y el marcador analizado, brindan información importante sobre tres aspectos fundamentales de la biología del manatí: 1) En Cuba la diversidad genética del ADNmt puede ser baja, similar a lo encontrado en otras partes de su ámbito de distribución; 2) los individuos analizados forman parte del grupo constituido por la Florida y las Antillas Mayores; 3) los territorios de Belice y Cuba han intercambiado individuos en el presente o en un pasado relativamente reciente.

Palabras clave: ADNmt, Caribe, diversidad genética, haplotipo, Trichechidae.

ABSTRACT

The aim of this analysis was to obtain information regarding the mtDNA haplotype composition of the manatee (*T. manatus*) occupying the Cuban archipelago. A fragment of 410 bp of the non coding region was analyzed for 12 individual manatees from Cuba and one from Florida, USA. Only two haplotypes were identified. Haplotype A1, found exclusively in Florida (including in the sample analyzed here) but also found in Mexico, the Dominican Republic and Puerto Rico, was the most frequent haplotype (11 of the 12 samples from Cuba) and widely distributed. The second haplotype A3, previously referred to as endemic from Belize, was identified from an individual stranded in Isabela de Sagua, north of Cuba. These preliminary results provide information about three major aspects of manatee biology: (1) the mtDNA genetic diversity of *T. manatus* in Cuba seems low as compared to other regions of the Caribbean; (2) the Cuban population likely belongs to the group comprising Florida and the portions of the Greater Antilles; and (3) the territories of Belize and Cuba have exchanged individuals at present or in a relatively recent past.

Key words: mtDNA, Caribbean, genetic diversity, haplotype, Trichechidae.

INTRODUCCIÓN

El manatí, *Trichechus manatus* Linnaeus, 1758 (Sirenia: Trichechidae), se distribuye desde la península de la Florida en Estados Unidos de América hasta la costa noreste de Brasil. Debido a la caza indiscriminada a que ha sido sometida, entre otros factores, la especie está considerada como vulnerable en todo su rango de distribución y se encuentra en el libro rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en Inglés) y en el apéndice I de CITES. Además para las Antillas, la

especie está considerada en peligro de extinción (Deutsch *et al.*, 2008).

Recientemente, la reevaluación del estado de conservación de *T. manatus* en Cuba, basada en la disminución de los registros de avistamiento y el aumento en los registros de mortalidad, condujo a considerarla como especie en peligro de extinción en el archipiélago (Álvarez-Alemán, 2012). Por lo anterior, son de gran importancia realizar estudios enfocados a la ecología, etología, composición genética y dinámica

de las poblaciones. Para determinar la composición y estructura genética de *T. manatus*, así como los patrones de conectividad entre las poblaciones a lo largo de la distribución geográfica de la especie, se han llevado a cabo varios trabajos con el uso de marcadores moleculares tanto nucleares como mitocondriales (García-Rodríguez et al., 1998; Cantanhede et al., 2005; Vianna et al., 2006; Hunter et al., 2010; Nourisson et al., 2011).

El análisis de la región de control del ADN mitocondrial ADNmt (*D-loop*) evidenció la presencia de 20 haplotipos representativos de la variación genética de *T. manatus* en toda su área de distribución (García-Rodríguez et al., 1998; Vianna et al., 2006). Recientemente se ha identificado un nuevo haplotipo en Brasil (M04, Luna et al. 2012), con una elevación del número de haplotipos conocidos a 21. El análisis de las relaciones entre estos haplotipos permitió reconocer tres grupos genéticamente distintivos, aunque heterogéneos geográficamente: grupo I (representado por haplotipos distribuidos en Florida, México, América Central, Las Antillas Mayores y la costa caribeña de América del Sur), Grupo II (México, América Central y la costa caribeña de América del Sur), Grupo III (Brasil y Las Guyanas en la costa noreste de América del Sur) (García-Rodríguez et al., 1998; Vianna et al., 2006). Sin embargo, hasta la fecha no existe información sobre la composición y estructura genética de las poblaciones de manatíes en Cuba, ni su relación con poblaciones adyacentes, información de gran importancia para el conocimiento básico y para el establecimiento de estrategias de manejo y conservación de esta especie.

El presente trabajo tiene como objetivo fundamental hacer una evaluación preliminar de la diversidad haplotípica de las poblaciones naturales de *Trichechus manatus* en Cuba. A partir de esta información se evalúan las relaciones de los individuos colectados con respecto a los del resto del área, mediante la comparación de los haplotipos encontrados con los referidos en la literatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 12 muestras de tejido se colectaron de cadáveres de individuos adultos de *Trichechus manatus* encontrados en seis localidades del archipiélago cubano (Figura 1). Los tejidos se almacenaron en etanol al 95 % hasta su posterior análisis. Se dispuso además de una muestra de tejido de una cría cadáver procedente de La Florida EU.

El ADN total se obtuvo siguiendo el método descrito por Kocher et al. (1989). Se amplificó un fragmento de 410 pb de la región de control del ADN mitocondrial utilizando los cebadores CR4 (5' AGA TGCTTTATTTAAGAGGAA) y CR5 (5' TCACCATCAAC ACCCAA) (García-Rodríguez et al. 1998). Los pro-

ductos del PCR fueron purificados utilizando el *QIAquick® PCR purification kit* (QIAGEN). Las muestras purificadas se secuenciaron en ambos sentidos con el *Big Dye Terminator Sequencing Kit* (Applied Biosystems) en un secuenciador automático ABI 3100 *genetic analyzer* (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas utilizando el programa BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Los alineamientos fueron rectificados por inspección visual. La identificación de los haplotipos se realizó comparando las secuencias obtenidas en este trabajo con secuencias disponibles en Gene Bank (Números de acceso AF046157-AF046159, AY963840-AY963860) representativas de los haplotipos descritos para la región de control en *T. manatus* por García-Rodríguez et al. (1998) y Vianna et al. (2006) utilizando el programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010). Este programa se empleó en la estimación de las diversidades haplotípica y nucleotídica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de 13 individuos analizados fueron identificados dos haplotipos: el haplotipo A1 descrito previamente para la Florida, México, República Dominicana y Puerto Rico y el haplotipo A3, cuya distribución se restringía a Belice (García-Rodríguez et al., 1998, Vianna et al., 2006, Hunter et al., 2010). La frecuencia del haplotipo A1 fue la más alta, detectándose en 11 de los individuos colectados en Cuba y en el procedente de la Florida. El haplotipo A3 fue encontrado en un ejemplar varado en Isabela de Sagua, en la costa norte de Villa Clara, Cuba (Figura 1).

La similitud en la composición de las variantes genéticas entre los individuos de Cuba, la Florida y las Antillas Mayores no es un hecho inesperado debido a que otros organismos presentan patrones similares. Por ejemplo, las poblaciones de anidación de tortugas marinas de Cuba muestran una alta similitud con otras islas del Caribe y el sur de la Florida, mientras que presentan un aislamiento efectivo respecto a zonas geográficas muy cercanas como México (Ruiz-Urquiola et al., 2010), posiblemente propiciado por el sistema de corrientes marinas que presentan una componente poderosa y permanente hacia el golfo de México, mientras que otras corrientes favorecen el flujo entre Cuba y la Florida (Ochoa et al., 2001). Adicionalmente, datos de foto-identificación han evidenciado que los manatíes son capaces de migrar desde la Florida hasta Cuba (Álvarez-Alemán et al., 2010).

Por el contrario, el descubrimiento de un individuo portador de un haplotipo hasta el momento endémico de Belice, y de baja frecuencia, sugiere que esta especie es capaz de franquear eventualmente las barreras oceánicas (también sugerido por la presencia del haplotipo A1 en la costa del Caribe de México) y no en el golfo de México (Castañeda y

Morales, 2005 en Nourisson, 2011). Aunque la frecuencia en la muestra analizada es muy baja, se debe investigar si se trata solo de un hecho fortuito de migración o si ha ocurrido recurrentemente entre estos territorios y si los individuos han aportado genéticamente a la comunidad actual del archipiélago. De forma similar, se abre la hipótesis de la posible presencia del haplotipo B identificado, en alta frecuencia, en República Dominicana y Puerto Rico (Vianna et al., 2006), teniendo en cuenta su cercanía geográfica respecto a estas islas.

Comparativamente con las poblaciones de manatí de otras áreas del Caribe la muestra analizada de Cuba muestra niveles de variación haplotípica $h=0,167$ y nucleotídica $\pi=0,0004$ situados entre los menores, por encima de la población de la Florida que solo presenta el haplotipo A1 y muy similar a los valores estimados para Brasil. No obstante, con excepción de Colombia, la generalidad de las poblaciones se caracteriza por una relativamente baja cantidad de haplotipos (1 – 5) (Tabla 1; ver además Vianna et al., 2006).

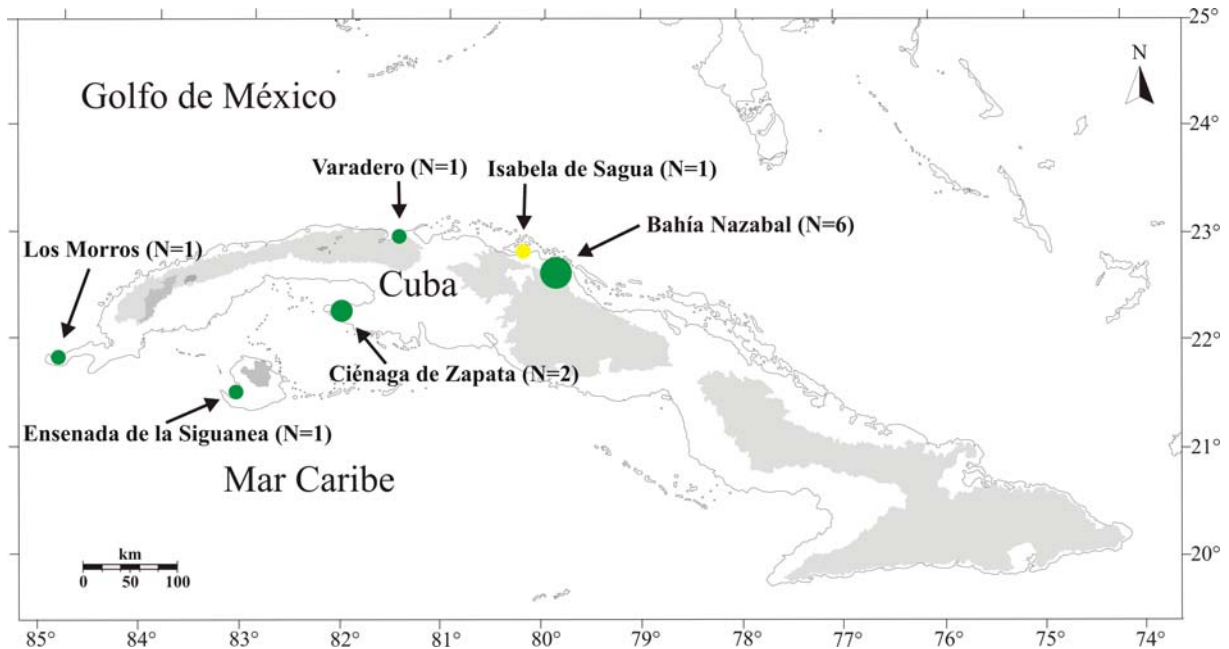


Figura 1. Localidades de muestreo de *Trichechus manatus* al norte y sur del archipiélago cubano. Para representar los haplotipos encontrados en cada localidad se siguió el código de colores utilizado por Vianna et al. (2006): color verde (A1) y color amarillo (A3). El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos analizados.

Tabla 1. Estimados de diversidad de *Trichechus manatus* en Cuba comparado con otras localidades de distribución de la especie, referidos por Vianna et al. (2006) y Luna et al. (2012).

Población	N	S	Número de Haplotipos	h	π
Cuba	12	1	2	0,167	0,0004
Belice	43	28	3	0,558	0,0367
Brasil	73	2	3	0,080	0,0002
Colombia	33	31	8	0,780	0,0312
EUA	28	0	1	0,000	0,0000
Guyana	4	4	4	1,000	0,0058
México	14	27	3	0,615	0,0405
Puerto Rico	62	2	3	0,543	0,0015
República Dominicana	6	1	2	0,533	0,0013
Venezuela	4	3	3	0,833	0,0037

(N) tamaño de la muestra, (S) sitios polimórficos, (h) diversidad haplotípica, (π) diversidad nucleotídica.

De los resultados preliminares de este trabajo se pueden extraer tres informaciones preliminares:

- 1) En Cuba la diversidad genética del ADNmt puede ser baja, similar a lo encontrado en otras regiones.
- 2) Los ejemplares de Cuba forman parte del grupo de haplotipos I representado geográficamente en la Florida, México, las Antillas Mayores, América Central y la costa caribeña de América del Sur.
- 3) Los territorios de Belice y Cuba han intercambiado individuos en el presente o en un pasado relativamente reciente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen los comentarios de tres revisores y el editor, que contribuyeron a mejorar el documento. El presente trabajo fue realizado con fondos de la ONG Sea to Shore Alliance, Fundación Mac Arthur y Fundación Eppley. Agradecimientos al Dr. Didier Casane y al Laboratoire Evolution Génomes et Spéciation, Université Paris Diderot – Paris 7, por su ayuda en la secuenciación de las muestras. La colecta de las muestras fue posible con la colaboración de la Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna, el Centro Nacional de Áreas Protegidas de Cuba y el Parque Nacional Ciénaga de Zapata.

REFERENCIAS

- Álvarez-Alemán, A. (2012) *Trichechus manatus* Linnaeus, 1758. En H. Gonzáles Alonso, L. Rodríguez Schettino, A. Rodríguez, C.A. Mancina y I. Ramos García, (Eds.), *Libro Rojo de los vertebrados de Cuba* (pp. 289-291), La Habana, Editorial Academia.
- Álvarez-Alemán, A., Beck, C.A., Powell, J.A. (2010) First Report of a Florida Manatee (*Trichechus manatus latirostris*) in Cuba. *Aquatic Mammals* **36**(2), 148-153.
- Castañeda, A., Morales, B. (2005) Informe técnico sobre los análisis de DNA de las muestras de sangre de los manatíes de Quintana Roo, Tabasco y Campeche. ECOSUR, Chetumal.
- Cantanhede, A.M., Silva, V.M., Farias, I.P., Hrbek, T., Lazzarini, S.M., Alves-Gomes, J. (2005) Phylogeography and population genetics of the endangered Amazonian manatee, *Trichechus inunguis*, Natterer, 1883 (Mammalia, Sirenia). *Molecular Ecology* **14**, 401-413.
- Deutsch, C.J., Self-Sullivan, C., Mignucci-Giannoni, A. (2008) *Trichechus manatus*. En The IUCN Red List of Threatened Species Version 2009.1. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Disponible en Internet, <http://www.iucnredlist.org>.
- Excoffier, L., Lischer, H.E. (2010) Arlequin suite ver.3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.
- García-Rodríguez, A.I., Bowen, B.W., Domning, D., Mignucci-Giannoni, A.A., Marmontel, M., Montoya-Ospina, R., Morales-Vela, B., Ruden, M., Bonde, R.K., McGuire, P.M. (1998) Phylogeography of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*): how many populations and how many taxa? *Molecular Ecology* **7**, 1137-1149.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hunter, M.E., Auil-Gomez, N.E., Tucker, K.P., Bonde, R.K., Powell, J., McGuire, P.M. (2010) Low genetic variation and evidence of limited dispersal in the regionally important Belize manatee. *Anim. Conserv.* **13**, 592-602.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6196-6200.
- Luna, F.O., Bonde, R.K., Attademo, F.L.N., Saunders, J.W., Meigs-Friend, G., Passavante, J.Z.O., Hunter, M. (2012). Phylogeographic implications for release of critically endangered manatee calves rescued in Northeast Brazil. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* **22**, 665-672.
- Nourisson, C. (2011) *Estructura genética de los manatíes en México*. Tesis de doctorado, El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal, Quintana Roo, México. 124 pp.
- Nourisson, C., Morales-Vela, B., Padilla-Saldívar, J., Tucker, K. P., Clark, A., Olivera-Gómez, L.D., Bonde, R., McGuire, P. (2011) Evidence of two genetic clusters of manatees with low genetic diversity in Mexico and implications for their conservation. *Genetica* **139**(7), 833-842.
- Ochoa, J., Sheinbaum, H., Badan, A., Candela, J., Wilson, D. (2001) Geostrophy via potential vorticity inversion in the Yucatan Channel. *J. Mar. Research* **59**, 725-747.
- Ruiz-Urquiola, A., Riverón-Giró, F.B., Pérez-Bermúdez, E., Abreu-Grobois, F.A., González-Pumariega, M., James-Petric, B.L., Díaz-Fernández, R., Álvarez-Castro, J.M., Jager, M., Azanza-Ricardo, J., Espinosa-López, G. (2010) Population genetic structure of Greater Caribbean green turtle (*Chelonia mydas*) based on mitochondrial DNA sequences, with an emphasis on rookeries from southwestern Cuba. *Rev. Invest. Mar.* **31**(1), 33-52.
- Vianna, J.A., Bonde, R.K., Caballero, S., Giraldo, J.P., Lima, R.P., Clark, A., Marmontel, M., Morales-Vela, B., de Souza, M.J., Parr, L., Rodríguez-López, M., Mignucci-Giannoni, A.A., Powell, J.A., Santos, F.R. (2006) Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation. *Molecular Ecology* **15**, 433-447.