

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis genético de la población guatemalteca del manatí antillano
(*Trichechus manatus manatus*)

Trabajo de investigación presentado
por Grecia Minerva Méndez Pérez
para optar al grado de Licenciada en Biología

Guatemala
2012

Análisis genético de la población guatemalteca del manatí antillano
(*Trichechus manatus manatus*)

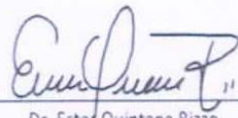
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




Análisis genético de la población guatemalteca del manatí antillano
(*Trichechus manatus manatus*)

Vo.Bo.:

(f) 
Dr. Ester Quintana Rizzo

Tribunal:

(f) 
M.Sc. Margarita Palmieri

(f) 
Lcda. Elena Dardón

(f) 
M.Sc. María Jose González Bernat

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de Diciembre de 2012

PREFACIO

Estoy muy agradecida con el momento en que se me abrieron las puertas hacia la posibilidad de hacer este estudio. Realmente ha sido muy enriquecedor tanto en mi vida profesional como a nivel personal y estoy segura que me encuentro más preparada para tomar otros retos que me ofrece la vida. Por esta razón extiendo un gran agradecimiento a las personas que abnegadamente me ofrecieron su apoyo, paciencia y sabiduría durante este proceso. La realización de esta investigación no fue fácil y todas las personas involucradas han marcado una diferencia no solo en esta investigación, que ya es bastante, sino que en el desarrollo científico del país y en la conservación de la magia que lleva la vida.

Primero me gustaría agradecer a mi mamá, Lesly Pérez, por darme la oportunidad de soñar y desarrollarme en lo que me apasiona. A mi asesora, Ester Quintana Rizzo, le estaré eternamente agradecida por dejarme explorar el fascinante mundo de los manatíes y siempre estar allí para guiarme a través del laberinto magnífico de la investigación biológica. A Andrés Avalos que con su ayuda y experiencia mantuvo mi tesis a flote y la guió por mucho tiempo en su recorrido. Susan Carney también me ayudó inmensamente y siempre estuvo muy atenta durante todo el desarrollo del estudio. Me gustaría agradecer también al equipo del proyecto “Fortalecimiento institucional para consolidar el manejo y conservación del manatí (*Trichechus manatus manatus*) en la Costa Atlántica de Guatemala”, Oscar Hugo Machuca, Heidy Garcia, Arnoldo Chaal y Marco Tulio Milla, que ejercen un rol muy importante y admirable en Guatemala. A mi directora de departamento que me ha ayudado durante toda la carrera, Margarita Palmieri, le estoy eternamente agradecida. A las fuentes financieras del proyecto que apoyan el crecimiento de la ciencia y conservación de la naturaleza en Guatemala, FONACON y Defensores de la Naturaleza, les agradezco mucho su ayuda y el cambio que hacen en el país. Por último, sigo agradecida y maravillada con la vida, me ha dado mucho por lo cual luchar, sonreír y seguir viviendo.

INDÍCE

Contenido	Página
LISTA DE CUADROS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XV
SINOPSIS.....	XVII
ABSTRACT.....	XIX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes.....	1
B. Justificación.....	15
C. Objetivos.....	18
II. METODOLOGÍA.....	19
A. Área de estudio.....	19
B. Métodos de campo.....	20
C. Métodos de laboratorio.....	26
D. Análisis de resultados.....	32
III. RESULTADOS.....	35
A. Diversidad genética del manatí en Guatemala.....	35
B. Evaluación de técnicas de muestreo no invasivo y de invasión mínima para el estudio de la diversidad genética de manatí.....	37
C. Evaluación de métodos de laboratorio utilizados para el análisis de la diversidad genética del manatí.....	41
IV. DISCUSIÓN.....	53
A. Filogeografía y diversidad del <i>Trichechus manatus manatus</i> en Guatemala.....	53
B. Desempeño del estudio de diversidad genética del manatí en Guatemala.....	55
C. Implicaciones para la conservación.....	63
V. CONCLUSIONES.....	65
VI. RECOMENDACIONES.....	67
VII. LITERATURA CITADA.....	71
VIII. APÉNDICES.....	81

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Condiciones estandarizadas y características de cada microsatélite empleado para estudiar la diversidad nuclear de la población de manatí en Guatemala.....	37
2. Hoja de campo de datos de interés tomados para cada avistamiento de manatí antillano (<i>T. manatus manatus</i>), durante la fase de campo entre julio 2010- Febrero 201.....	81
3. Hoja de campo de los datos tomados por cada día de campo en la zona costera (la Bahía La Graciosa) y la zona del lago (Bocas del Polochic).....	82
4. Hoja de campo de los datos tomados a la hora de encontrar restos fecales en la superficie del agua.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. La distribución de los 24 haplotipos de <i>Trichechus manatus</i> junto con el tamaño de muestras colectadas por país.....	7
2. Mapa geográfico del departamento de Izabal, Guatemala, señalando ambos sitios de estudio.....	11
3. El tomador de muestra de tejido epidérmico, modelos utilizado por Carney (2007).....	13
4. Raspador utilizado para frotar la piel del manatí al ser avistado a la par de la lancha, modificación del modelo utilizado por Carney (2007).....	23
5. Diagrama de flujo demostrando el esquema utilizado para evaluar la factibilidad de realizar un estudio de análisis genético en muestras fecales, al igual que en muestras de tejido de animales varados.....	27
6. Integridad de muestras de tejido de manatí.....	42
7. Gráfica de dispersión de extracciones de tejido de manatí utilizando el protocolo estándar de fenol: cloroformo y un protocolo a base de sílice.....	43
8. Integridad de extracciones fecales de animales de zoológico y muestras de manatí.....	45
9. Productos amplificados de 3 muestras utilizando el protocolo de extracción de Zhang (2006) y 3 muestras utilizando el protocolo de Marrero (2009)....	46
10. Cambio en el rendimiento en términos de concentración y pureza en la extracción de ADN utilizando el protocolo Zhang (2006), Marrero (2009) y el “nuevo” protocolo.....	48
11. Productos amplificados con el marcador de ADN mitocondrial CR-4 y CR-5 (Southern <i>et al.</i> 1988).....	49
12. Productos amplificados de muestras de heces con el uso del marcador CR-4 y CR-5 que muestran la falta de especificidad generada en las muestras.....	50
13. Gel de poliacrilamida mostrando la amplificación de bandas inespecíficas al aplicar el microsatélite K01 en extracciones de muestras de heces.....	51
14. Alineamiento de las secuencias obtenidas durante el estudio. Se utilizó el programa de Clustal 2.1.....	83

SINOPSIS

Los estudios genéticos de la especie vulnerable, el manatí de las Indias Occidentales (*Trichechus manatus*) ha demostrado que esta especie tienen una diversidad genética menor a la de los guepardos y los pandas. En Guatemala, la conservación del manatí es difícil porque la población es reducida y enfrenta muchas amenazas. De estas, la caza ilegal aun no ha sido controlada. Esta situación promueve la pérdida de alelos en la población, poniendo en riesgo su estabilidad y sobrevivencia. El objetivo de esta investigación fue el de estudiar la diversidad genética de los manatíes antillanos (*Trichechus manatus manatus*) en aguas guatemaltecas. La información que fue generada resuelve incógnitas sobre el origen de esta población y evalúa los métodos para estudiar la genética del manatí.

La investigación se llevó a cabo en dos sitios importantes para la conservación de los manatíes antillanos en Guatemala, pero que son ecológicamente diferentes. Estos fueron, la Bahía La Graciosa y Bocas del Polochic, localizados en el departamento de Izabal. Para prevenir cualquier posible daño a la población de manatíes se utilizaron 3 técnicas de muestreo no invasivas o de invasión mínima: la técnica de raspado de piel, la colección de heces y muestras de tejidos de animales muertos. Las técnicas de laboratorio incluyeron: la extracción de ADN de tejido y heces, la amplificación de ADN a través de tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la secuenciación de la región control D-loop, y un análisis de múltiples marcadores de microsatélites específicos para la especie.

Los resultados indican que la población guatemalteca de manatíes antillanos tiene una distribución bimodal, comprende por los menos dos linajes distintos de la especie *Trichechus manatus*. El primer linaje ha sido reportado desde la Florida a las Antillas mayores, y el otro por todo Mesoamérica. De acuerdo a la evaluación de los métodos de muestreo, la colección de heces fue la más efectiva de colecta basado en el número de muestras obtenidas y el esfuerzo de campo requerido. Las muestras de heces deben estar frescas (menos de 2 días) para maximizar los resultados de PCR. Además, es importante minimizar el tamaño del segmento de los marcadores de PCR debido a que el ADN en heces se encuentra degradado. Se espera que este estudio incentive otras investigaciones a nivel nacional y regional para lograr la sobrevivencia de la población del manatí.

ABSTRACT

The study genetic study of the vulnerable species, the West Indian manatee (*Trichechus manatus*) has reported a lower genetic diversity than other endangered animals like the cheetahs and the pandas. In Guatemala the conservation of the manatee is difficult because the population is reduced due to many anthropogenic factors, such as illegal hunting. This situation promotes the loss of alleles in the population, putting at risk the stability and survival of species. The main objective of this investigation was to study the genetic diversity of the Antillean manatee (*T. manatus manatus*) on Guatemalan shores. The information generated helps to improve conservation plans of the Guatemalan manatee and solves questions about the origin of the population and evaluated methods used to study the genetics of the manatee.

This investigation was carried out in two sites that are important to the conservation of the Antillean manatee in Guatemala, but both sites are ecological distinct, la Bahía La Graciosa and Bocas del Polochic, situated in the department of Izabal. To prevent any damage to the manatee population, three non invasive or minimally invasive sampling techniques were employed. The laboratory techniques included: DNA extractions of tissue and fecal samples, DNA amplification using PCR technology (polymerase chain reaction), sequencing of the control D-loop region, and the analysis of multiple microsatellite markers designed specifically for the species.

The results showed that the Guatemalan manatee population has a bimodal distribution, since it comprises of at least two lineages. They are part of the Florida and Greater Antilles lineage and also of the Mesoamerican lineage. According to an evaluation of the field methods, faecal collection proved to be the most effective in terms of the number of samples collected and the required field effort. On the other hand, these samples must be fresh (at least 2 days) at the moment of collection in order to maximize PCR results. Also, it is recommendable to minimize the segment size of the PCR makers used since the DNA in faecal samples is degraded. This study hopes to promote other investigation at a national and regional level to secure the survival of the manatee population.

I. INTRODUCCIÓN

Durante la última década, el avance tecnológico en áreas como la alta producción de secuencias genéticas, el análisis de microsatélites y el muestreo no invasivo, han contribuido a la expansión del rol de la genética en la conservación y en el manejo de vida silvestre (DeSalle & Amato 2004). Esto representa una gran esperanza en la conservación de la biodiversidad y particularmente en la recuperación de poblaciones amenazadas (O'Brien 1994, Taberlet *et al.* 1999, Kellogg 2008). Una especie indicadora de estos esfuerzos es el manatí de las Indias Occidentales (*Trichechus manatus*); esta especie considerada vulnerable desde 1982 (Thornback & Jenkins 1982) ha sido el enfoque de varios estudios de genética poblacional con el propósito de mejorar los planes de manejo y de reintroducción. En Guatemala, en donde la ecología del manatí aún no se ha estudiado, el potencial de información ofrecido por los análisis genéticos puede marcar un gran salto en el entendimiento de la población y subsecuente conservación.

A. Antecedentes

1. El rol de la genética en la recuperación del manatí de las Indias Occidentales (*Trichechus manatus*). Las técnicas moleculares han sido una herramienta poderosa para la biología de la conservación; esto es porque hacen posible la cuantificación de la variación genética. La diversidad genética es un reflejo del estado o el grado de adaptación presente en una población (O'Brien 1994), por lo tanto esta información fundamenta los planes de manejo de las poblaciones silvestres. Además, los estudios de genética molecular permiten evaluar las poblaciones que presentan una baja variabilidad, identificándolas como poblaciones únicas (Kellogg 2008), y/o a las poblaciones amenazadas. También, permiten obtener información acerca de la historia evolutiva de la especie; por ejemplo si la población ha pasado por un cuello de botella (O'Brien 1994). La evaluación del pasado y el estado presente de la especie ayudan a generar una visión más amplia sobre cada población y su futuro, y así formular planes de manejo y de recuperación más eficientes (Kellogg 2008).

Una especie que se ha beneficiado de los avances en los estudios genéticos es el manatí de las Indias Occidentales (*Trichechus manatus*). Este mamífero marino, conocido como la vaca marina, se distribuye desde Bahía, Brasil hasta Rhode Island, Estados Unidos (Quintana-Rizzo & Reynolds III 2010). Desde los años noventa la protección de esta especie ha sido prioridad para la región del Caribe Occidental y se han hecho muchos esfuerzos conservacionistas, sin embargo, ha diferido en cada país (Quintana-Rizzo & Reynolds III 2010). En la mayoría de países el estado poblacional es desconocido; esto es porque el tamaño de la población nunca ha sido estimado y la información sobre los patrones de movimiento es imprecisa (Quintana-Rizzo & Reynolds III 2010).

En los últimos años en países donde se cuenta con apoyo infraestructural, como los Estados Unidos y Brasil, han surgido estudios sobre la filogeografía y filogenia de todo el género *Trichechus* (García-Rodríguez *et al.* 1998, Vianna *et al.* 2006). Dichos estudios han esclarecido los procesos evolutivos y la estructura de variación genética para *Trichechus manatus*. Además, se identificaron barreras del flujo genético de la especie (García-Rodríguez *et al.* 1998, Vianna *et al.* 2006). Este es un gran paso para la conservación del manatí, permitiendo así la formulación de planes de manejo dirigidos hacia cada región de variación.

Conociendo las diferencias genéticas existentes entre los hábitats del manatí facilita la implementación y/o mejoramiento de los programas de reintroducción. El bienestar y consecuente propagación de los genes de un individuo es influido por la compatibilidad genética entre tal individuo y la población del área de reubicación (Schonewald-Cox *et al.* 1983). En los últimos años se han derivado propuestas pioneras para la reintroducción del manatí. Un ejemplo es la iniciación del proyecto de reintroducción del manatí en la isla de las Antillas menores, Guadalupe (Reynolds III & Wetzel 2008). La compatibilidad genética con las poblaciones adyacentes, como Puerto Rico y Trinidad y Tobago junto con la variabilidad genética de cada individuo a reintroducir serán criterios esenciales para escoger a los animales que repoblarán esta isla (Reynolds III & Wetzel 2008).

La disciplina que estudia las variables genéticas en una población se denomina, genética de poblaciones (Hamilton 2009). Ésta se basa en la cuantificación de la variabilidad de los cambios genéticos a través del tiempo con el propósito de articular una matriz de predicciones acerca de los procesos biológicos que dan paso a la variación

genética de determinada especie (Hamilton 2009). Por lo tanto, al aplicar tales estudios se producen beneficios tangibles para la especie, como la optimización de su propia variación genética, y a la vez provee un enfoque a largo plazo, que es asegurar la sobrevivencia de una población amenazada o aislada ante cambios estocásticos (O'Brien 1994, Kellogg 2008).

2. Estudio de la genética poblacional aplicada a la conservación. La diversidad genética está determinada principalmente por la cantidad de alelos y de genotipos en una población (Garner *et al.* 2005). Los marcadores utilizados para medir este tipo de diversidad son los cromosomas, aloenzimas, ADN mitocondrial y microsatélites. Los más utilizados hoy en día son los marcadores mitocondriales y microsatélites porque poseen una alta variabilidad, son fáciles de utilizar, y la tasa de mutación es bastante elevada (Kellogg 2008). Existen diferencias entre estos dos tipos de marcadores, como el origen del segmento genómico a estudiar y su tasa de mutación; por eso se utilizan simultáneamente para poder generar aspectos distintos sobre la diversidad y estructura de la población.

Los marcadores de ADN mitocondrial son utilizados para distinguir relaciones taxonómicas y pueden diferenciar poblaciones dentro de una misma especie (Kellogg 2008). El genoma en las mitocondrias es haploide; lo que implica que es heredado por medio del citoplasma del gameto de uno de los padres (herencia uniparental) (Hamilton 2009). Por lo tanto el mismo patrón histórico de descendencia común es compartido entre cada individuo (Hillis *et al.* 1996); en otras palabras, la deriva genética queda grabada en estas regiones (Hamilton 2009). Al estudiar estos marcadores en una especie se observan las divergencias poblacionales (Hamilton 2009) y esto permite la construcción de árboles filogenéticos. Entre los marcadores de mitocondria más comunes están los que pertenecen a la región control D-loop (Kellogg 2008). Esta región es transmitida por línea materna y se utiliza para caracterizar haplotipos (conjuntos de diferencias secuenciales) (Kellogg 2008).

La deriva genética y el flujo genético solamente dividen la variabilidad y no dan paso a ella. La fuente primaria de la variabilidad genética son las mutaciones, el cambio azaroso del genoma entre los ancestros y la descendencia (Hamilton 2009). Por lo tanto,

para estudiar la variabilidad de una población se necesitan marcadores de sitios con una tendencia más alta a mutar, como los locus polimórficos o más específicamente los microsátélites (SSR). Estos son locus de polimorfismos nucleares con repeticiones de unidades de 2-6 pares de bases (bp) (Kellogg 2008). Estos marcadores proveen suficiente variabilidad para distinguir genéticamente cada individuo de una población.

Los microsátélites son neutrales en cuanto a la selección natural, y además, se heredan de ambos padres durante la recombinación, lo cual maximiza su variabilidad (Kellogg 2008). La abundancia genómica y el alto grado de polimorfismo de los SSR los hace aptos para el estudio de patrones de evolución y de variabilidad genética de poblaciones (Li *et al.* 2002). El nivel de heterogeneidad o variabilidad entre poblaciones y dentro de la misma es analizado con el uso de las frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas son estimados empíricos calculados a través de muestreos directos y procesamientos posteriores (Hamilton 2009). La comparación de las frecuencias alélicas entre cada población de estudio determina si existe un intercambio genético entre tales, es decir migración, y por lo tanto determina el grado de estratificación poblacional (Hamilton 2009).

La variabilidad genética de una especie disminuye con la reducción poblacional (Kellogg 2008, O'Brien 1994). Esto es porque la muerte o extracción de un individuo de su hábitat disminuye a cero la probabilidad de propagar sus genes; por lo tanto la muerte habitual a largo plazo disminuye el pozo genético de toda la población. Además, si el tamaño es muy reducido aumenta la probabilidad de que dos individuos emparentados, con copias de alelos idénticos, se reproduzcan, causando un desbalance en la proporción de frecuencias alélicas. Este efecto es conocido como endogamia. La endogamia causa el incremento en la homocigocidad y consecuentemente la probabilidad de la expresión de rasgos destructivos para el individuo y la población (Hamilton 2009).

Los efectos de la endogamia dañifican profundamente a los mamíferos por varias razones. Primero, la densidad poblacional en mamíferos es normalmente baja (Garner *et al.* 2005), lo cual los hace vulnerables a cambios demográficos. Por ejemplo, la pérdida de hábitat y la fragmentación aceleran la reducción poblacional (Garner *et al.* 2005). Segundo, los mediadores de las defensas inmunes en mamíferos dependen de locus con una extensiva variabilidad genética. Por lo tanto, si disminuye la variabilidad disminuye

la capacidad de crear una respuesta rápida ante la aparición de nuevos patógenos (O'Brien 1994). En otras palabras la homocigocidad debilita el sistema inmune en mamíferos y por lo tanto incrementa la susceptibilidad a enfermedades (McClenaghan & O'Shea 1988, O'Brien 1994). Tercero, en los mamíferos también se ha verificado que la baja heterocigocidad causa un incremento en el crecimiento fetal retardado, en la mortalidad juvenil y en la infecundidad (McClenaghan & O'Shea 1988).

3. La genética del manatí de las Indias Occidentales (*Trichechus manatus*). El manatí de las Indias Occidentales (*T. manatus*) tradicionalmente, se subdivide en dos subespecies: el manatí de la Florida (*T. m. latirostris*) y el manatí antillano (*T. m. manatus*). Estas subespecies son diferentes en su distribución. El manatí de la Florida se encuentra solamente en el sureste de los Estados Unidos mientras que el manatí antillano se encuentra desde las costas y ríos de México, hasta el norte de Sur América, e incluye las costas de las islas caribeñas como: Cuba, República Dominicana, Haití, Jamaica y Puerto Rico, comprendiendo también algunos avistamientos excepcionales en las Bahamas (Marsh & Lefebvre 1994).

En el campo, las dos subespecies son prácticamente indistinguibles, pero se ha reportado que el manatí de la Florida es más robusto. Esto parece ser una adaptación para optimizar el mantenimiento de calor corporal (Rommel & Reynolds III 2000). Es más importante señalar que la identificación de estas dos subespecies se ha basado principalmente en diferencias craneales (Quintana-Rizzo & Reynolds III 2010). Sin embargo, García-Rodríguez (1998) sugirió que *T. manatus* se separa genéticamente en tres linajes diferentes, poniendo en riesgo esta clasificación tradicional de la especie (García-Rodríguez *et al.* 1998, Kellogg 2008, Quintana-Rizzo & Reynolds III 2010).

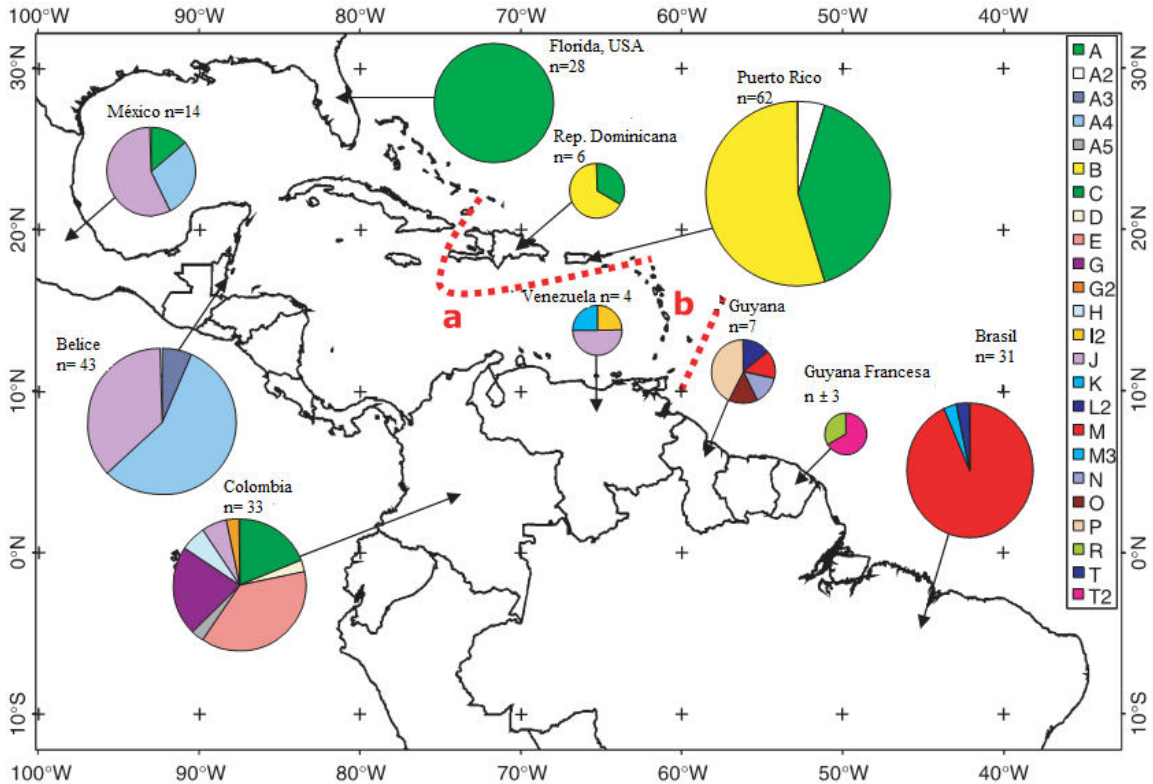
La evolución y la especiación de la familia Trichechidae aún está por definirse en su totalidad y permanece un gran misterio en el estudio de los mamíferos acuáticos. Esto crea una brecha que limita los estudios genéticos de clados taxonómicos menores. Sin embargo, si se considera la distribución de los pocos registros fósiles existentes, es posible que los Trichechidos más primitivos hayan aparecido por un aislamiento genético en Sur América desde el Terciario Medio. Dicha especiación pudo haber sido consecuencia de la migración del grupo ancestral *Protosiren* Abel, 1907, perteneciente al

reino Tetiano Cretácico (Domning 1982). Este reino denomina la fauna y flora alrededor del mar Tethys que existió en el viejo mundo durante el Jurásico y Cretácico (Allaby 2008). En 1982, Domning propuso la posible migración de Trichechidae a Norte América durante el Pleistoceno temprano, hace 1.3 millones de años, y esto pudo haber causado la especiación de *Trichechus manatus*, debido a una presión para ampliar su nicho alimentario (Domning 1982).

Los recientes estudios genéticos de *Trichechus manatus* han logrado trazar una historia evolutiva más detallada con respecto al patrón de expansión de la especie en el Caribe y Latinoamérica. Dichos descubrimientos han utilizado principalmente análisis de ADN mitocondrial (ADNmt), específicamente en la región control D-loop (García-Rodríguez *et al.* 1998, Vianna *et al.* 2006). Esta región es conocida por su capacidad para acumular mutaciones a un ritmo muy acelerado (Kasamatsu *et al.* 1971). Hasta el momento se han registrado 24 haplotipos para la especie, *Trichechus manatus* (Figura 1) (García-Rodríguez *et al.* 1998, Vianna *et al.* 2006). La distribución de los mismos indica una estructuración filogeográfica muy fuerte entre las poblaciones muestreadas.

Los países que participaron en estos estudios fueron: los Estados Unidos (Florida y Puerto Rico), México, Colombia, La República Dominicana, Venezuela, Guyana, Brasil (García-Rodríguez *et al.* 1998), Guyana Francesa y Belice (Vianna *et al.* 2006). Con el uso de parámetros de divergencia secuencial se identificaron tres linajes bastante concretos entre los haplotipos, y éstos fueron nombrados y clasificados por Vianna (2006). El primer linaje incluye los haplotipos de A-D (4 en total) y se encuentran exclusivamente en la Florida, Puerto Rico, La República Dominicana y Colombia. El linaje fue nombrado como el cluster I, y corresponde a la Florida, México, Grandes Antillas, Centro América y la Costa Caribeña de Sur América. El segundo linaje conocido como el cluster II también se distribuye en México, Centro América, y la costa Caribeña de Sur América pero no en la Florida; incluye los haplotipos de E-K (6 en total). Por último, el tercer linaje, cluster III, corresponde a la costa noreste de Sur América, y representa a los haplotipos que se restringen a Brasil y Guyana.

Figura 1: La distribución de los 24 haplotipos de *Trichechus manatus* junto con el tamaño de muestras colectadas por país. Las barreras principales del flujo genético son dos: (a) una que separa las Antillas mayores del resto de poblaciones y (b) otra que separa Guyana y Brasil de América Latina. Fuente: Vianna *et al.* 2006.



Los resultados de los estudios sobre la nueva filogenia de la familia Trichechidae indican que el factor más influyente en la distribución genética, es su hábitat, estrictamente costero y ripario, limitando así las posibilidades de migración a larga distancia (García-Rodríguez *et al.* 1998, Vianna *et al.* 2006) y separando las poblaciones. Tomando esto en perspectiva, el manejo, investigación y conservación se hace más eficiente a nivel de país, ya que cada país podría ser hábitat de poblaciones completamente diferenciadas. Dentro del país, la propagación genética del manatí está determinada por las características propias del lugar, como los recursos disponibles y geografía, que a su vez influyen en el comportamiento y movimiento del animal (García-

Rodríguez *et al.* 1998, Vianna *et al.* 2006). Por ejemplo, la estructura y diversidad genética del manatí en la Florida y Belice, dos sitios de suma importancia para la conservación de la especie, son bastantes diferentes, y una razón son las diferencias en los factores ambientales.

Los manatíes de la Florida migran largas distancias debido al cambio estacional de temperatura acuática (Deutsch *et al.* 2003). En el verano, tienen un rango de distribución hacia el norte, y en el invierno, tienen un rango de distribución hacia el sur (Deutsch *et al.* 2003). Este cambio recurrente de temperatura, el consecuente cambio en la salinidad, y las mareas rojas que brotan en la Florida, obligan a los manatíes a desarrollar patrones de adaptación. Este ritmo de adaptación influye en la composición genética de la población, ya que a mayor variabilidad genética mayor es el ritmo de adaptación, y viceversa (Hillis *et al.* 1996). Debido a esto la población del manatí de la Florida ha demostrado ser una de las poblaciones del manatí con mayor heterocigocidad en cuanto a la diversidad de microsátélites (McClenaghan & O'Shea 1988). Otra explicación de la diversidad genética de esta población es el fuerte flujo genético causado por la misma migración estacional (McClenaghan & O'Shea 1988). Este flujo genético incrementa la frecuencia de cada alelo en la población debido a la constante introducción de gametos externos o inmigrantes, sirviendo así como una fuente de variabilidad para cada hábitat (Hamilton 2009).

El movimiento estacional y flujo genético en la población del manatí de la Florida por otro lado limita la presencia de alelos raros o la formación de subpoblaciones. Los estudios de diversidad genética reportan una alta homocigocidad entre las distintas regiones muestreadas (McClenaghan & O'Shea 1988). Esta ausencia de estratificación poblacional o barrera del flujo genético causa que la diversidad genética del manatí sea similar por todo el país (McClenaghan & O'Shea 1988). Además, la población de la Florida ha pasado por un cuello de botella lo que explica la baja diversidad haplotípica, solamente se ha registrado un haplotipo. Por lo tanto, en cuanto al ADN mitocondrial es la población de *Trichechus manatus* menos diversa (García-Rodríguez *et al.* 1998, Vianna *et al.* 2006).

La población beliceña de manatíes antillanos posee una dinámica y diversidad genética distinta al manatí de la Florida. Esta población, adyacente a la de Guatemala, ha

reportado 3 haplotipos y posee una distribución bimodal. La distribución bimodal se debe a que esta área tiene haplotipos de dos linajes distintos: Cluster 1 (Florida, México, las Antillas mayores, Centro América y la costa caribeña de Sur América) y Cluster 2 (México, Centro América y la costa caribeña de Sur América) (Vianna *et al.* 2006). Sin embargo, en cuanto a la heterocigocidad nuclear reportada por microsatélites, esta población es menos diversa que la de la Florida. Dieciséis microsatélites fueron analizados y detectaron menos alelos que 14 microsatélites estudiados para la población de la Florida (Hunter *et al.* 2010a).

Dentro de Belice, se ha identificado dos subpoblaciones de manatíes genéticamente distintas, los cayos de la ciudad de Belice y el Sistema Lagunar Sureño; una zona de mezcla también se estableció dentro de estas dos subpoblaciones (Hunter *et al.* 2010a). La estratificación genética es más evidente en las diferencias haplotípicas y menor en la diversidad de microsatélites, lo que implica que existe una migración ocasional por parte de los machos y una fuerte fidelidad a los sitios de reproducción por parte de las hembras (Hunter *et al.* 2010a). Esta dinámica poblacional también se ha reportado en México (Nourisson *et al.* 2011) y Puerto Rico (Kellogg 2008).

En Guatemala, existen dos áreas destacadas por su alta abundancia del manatí, La Reserva de Vida Silvestre (RVS) Bocas del Polochic y la Bahía La Graciosa (Quintana-Rizzo 2005a, 2005b & 2010). Diferencias ambientales como la salinidad y temperatura entre estos sitios puede que fomenten una migración periódica desde la costa hacia aguas lacustres. Sin embargo, existe una distancia de aproximadamente 91 km entre la RVS Bocas del Polochic y la Bahía La Graciosa (Google 2012). Esta separación baja las probabilidades de que la migración entre estos sitios sea fácil y recurrente ya que lo manatíes no acostumbran a migrar largas distancias. Esto puede indicar que la estructura poblacional del manatí en Guatemala puede estar dividida en por lo menos dos subpoblaciones. Además, entre estos dos sitios se encuentra el Golfete, este canal ha reportado el índice más alto de tráfico de lanchas y más bajo de avistamientos del manatí (Quintana-Rizzo 1993, 2005a, 2005b). Por lo tanto, esta área puede estar actuando como una barrera antropogénica al flujo genético.

En la presente investigación se estudió la diversidad haplotípica de los manatíes en Guatemala para aportar al conocimiento filogeográfico de la especie. Se evaluaron y

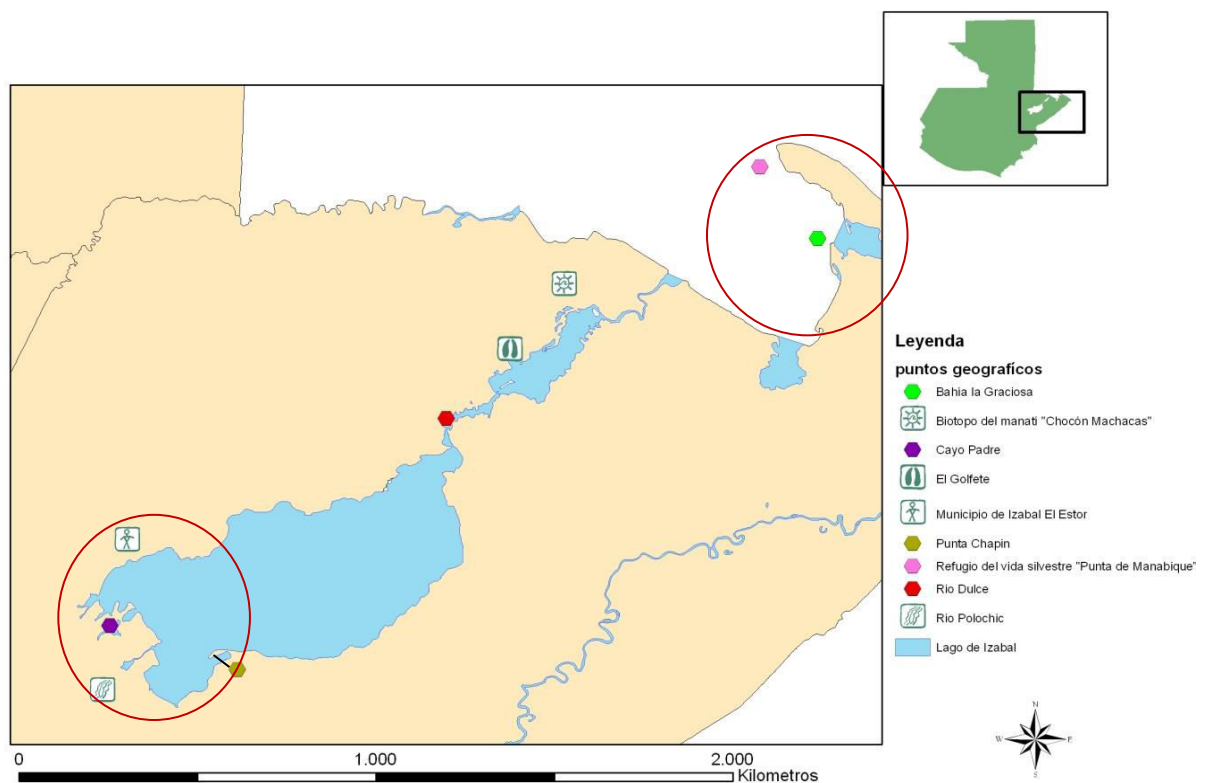
aplicaron dos marcadores, HV1 y CR, para lograr tal objetivo, ambos marcadores amplifican un segmento de la región control D-loop pero difieren con respecto al tamaño que amplifican. El marcador HV1 es amplificado por los cebadores L15926 y H16498 (L y H) y amplifican un segmento de ~550 bp y los cebadores CR-4 y CR-5 amplifican un segmento de 441 bp.

Existen algunas diferencias entre los dos tipos de marcadores, sin embargo, ambos han sido aplicados en el estudio de diversidad genética de la población del manatí; el marcador H y L fue utilizado en el estudio de Vianna *et al.* (2006) y el marcador CR-4 y CR-5 se usó en la investigación de García-Rodríguez *et al.* (1998). H y L fue diseñado para amplificar segmentos homólogos de más de 100 especies de animales, incluyendo mamíferos, aves, anfibios, peces y hasta algunos invertebrados (Kocher *et al.* 1989). Su amplia aplicabilidad ha conducido a que sea usando con gran frecuencia en investigaciones de población y de filogenia. Por el otro lado, el marcador CR-4 y CR-5 fue diseñado a partir de segmentos conservados de delfín y de vaca (Southern *et al.* 1988), por lo tanto este marcador tiene mayor rango de especificidad al genoma del manatí. Esta fue la primera vez que estos marcadores fueron aplicados al estudio de manatíes muestreados en las aguas de Guatemala.

4. Estatus ecológico de *Trichechus manatus* en Guatemala. De acuerdo al plan regional para la conservación del manatí antillano (PNUMA 1995), el hábitat para los manatíes en la mayoría de áreas de avistamiento en Guatemala parece ser bueno. Sin embargo, observaciones llevadas a cabo indican que la población es pequeña, porque: 1) el país posee el menor porcentaje de costa Atlántica en Centro América y 2) la incidencia de muertes anuales debido a la caza ilegal mantienen la población baja (PNUMA 1995, Quintana-Rizzo & Reynolds III 2010). Janson (1977) postuló una posible distribución cercana a la costa y con menos ocurrencia en el norte de Puerto Barrios, Lago de Izabal y Río Dulce. La distribución fue examinada en más detalle después del primer sondeo aéreo conducido en toda la costa Atlántica en 1991 (Quintana-Rizzo 1993). Sin embargo, fue hasta en 1993, que se llevaron a cabo la primera serie de sondeos aéreos con los objetivos de estimar el tamaño poblacional y establecer las principales áreas de distribución y de mayor importancia ecológica para el manatí en Guatemala (Quintana-Rizzo 1993).

La población promedio de manatíes se ha estimado en 53 manatíes con un rango de densidad poblacional entre 0.147 y 0.549 manatíes/km². El Lago de Izabal fue identificado como el hábitat más importante para los manatíes en Guatemala, específicamente la zona extremo sureste, que comprende desde Punta Chapín hasta el Cayo Padre (Figura 2). Dicha zona también fue identificada como un sitio importante de reproducción (Quintana-Rizzo 1993). Estos mismos sitios fueron re-identificados como hábitats principales para los manatíes en estudios llevados a cabo diez años después (Quintana-Rizzo 2005a, 2005b). Otro hábitat que fue reconocido por la alta abundancia de animales es la Bahía La Graciosa (Figura 2) (Quintana-Rizzo 2005a, 2005b, 2010).

Figura 2: Mapa geográfico del departamento de Izabal, Guatemala. Este mapa señala ambos sitios de estudio (círculos rojos), la Bahía La Graciosa y Bocas del Polochic y resalta la ubicación de varios sitios importantes para el manatí, un sitio de reproducción importante se encuentra entre Cayo Padre y Punta Chapín.



La Bahía La Graciosa y el Lago de Izabal son áreas importantes para el manatí. Sin embargo, se desconoce si existe algún tipo de relación genética entre los manatíes de ambas áreas. Una hipótesis sugiere que debido a que las aguas de la Bahía La Graciosa son más salinas que las del Lago de Izabal, los manatíes se desplazan hacia el Lago de Izabal en búsqueda de agua dulce (Quintana-Rizzo 1993). El movimiento de los manatíes en estas aguas puede no ser evidente ya que ellos tienen que pasar por el Golfete, un canal con una densidad baja de manatíes en el país (Quintana-Rizzo 1993, 2005a, 2005b, Quintana-Rizzo y Reynolds III 2010).

5. El uso de técnicas de invasión mínima y no invasivas para análisis genéticos.

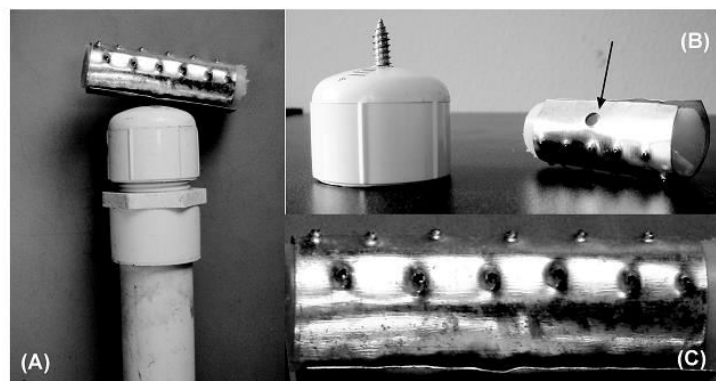
Las técnicas de muestreo para estudios genéticos de poblaciones de vida silvestre se dividen en tres: las técnicas destructivas, las no destructivas y las no invasivas o de invasión mínima (Taberlet *et al.* 1999). Las técnicas destructivas consisten en sacrificar al animal, las no destructivas consisten en capturar al animal para extraer una biopsia o muestra de sangre, y las técnicas no invasivas o de invasión mínima consisten en rastros o raspados de la epidermis del animal que se colectan sin capturarlo o estorbarlo (Taberlet *et al.* 1999). De todos los tipos de muestreo de poblaciones silvestres, la extracción de tejido y de sangre ha probado ser la más fácil y factible de procesar (Taberlet *et al.* 1999).

La técnica invasiva mínima extensivamente utilizada para la colecta de biopsias en mamíferos marinos consiste en lanzar una especie de dardo al animal (Carney *et al.* 2007). Este dardo está diseñado para perforar la piel ante el impacto con el animal; el dardo luego rebota al mar. Desafortunadamente, esta técnica no ha probado ser aplicable en manatíes silvestres debido a que su piel consiste de un cuero muy grueso (Carney *et al.* 2007). En respuesta, otras técnicas se han desarrollado exitosamente en poblaciones del manatí (Carney *et al.* 2007 y Muschett *et al.* 2009), las cuales se detallarán a continuación.

a. Técnica de invasión mínima para el estudio genético del manatí. La técnica de muestreo de invasión mínima hace uso de animales vivos (Carney *et al.* 2007). La ventaja de esta técnica es que permite la determinación de relaciones familiares y ofrece un mejor entendimiento de relaciones sociales al combinarlos con records de foto-

identificación (Carney *et al.* 2007). La técnica desarrollada específicamente para el manatí consiste en el uso de una vara de PVC de 2 m de largo con un extremo de la vara sujetando una varilla de aluminio perforada (Figura 3). Esta varilla de aluminio se frota en el dorso del animal para coleccionar la muestra de tejido. Los manatíes que han sido expuestos a esta técnica de muestreo no han demostrado efectos negativos mientras los investigadores permanecieron en el área de estudio (Carney *et al.* 2007). La técnica ha demostrado ser exitosa en el manatí de la Florida (*T. m. latirostris*) pero se ha reportado que solamente puede ser utilizado en áreas en donde el manatí está acostumbrado al contacto humano (Muschett *et al.* 2009). En la distribución restante del manatí, siendo desde México hasta el norte de Brasil, incluyendo las islas del Caribe, las poblaciones no están expuestas a un monitoreo intenso como en la Florida, y por lo tanto los manatíes tienden a sumergirse rápidamente al ser avistados (Nowacek *et al.* 2004, Muschett *et al.* 2009), haciendo difícil la adquisición de tejido. Esto desafía la aplicación de esta técnica en aguas guatemaltecas.

Figura 3: El tomador de muestra de tejido epidérmico para el manatí. (A) El aluminio es doblado alrededor de una vara de nylon que está sujeta a un extremo de tubo de PVC de 2 m de largo. (B) El aluminio y la vara tiene un hoyo para poder enroscarlos en la tapadera del tubo de PVC. (C) Una vista de cerca Fuente: Carney *et al.* 2007.



b. Técnicas no invasivas. Muchos estudios genéticos utilizan técnicas no invasivas, debido a que el ADN colectado utilizando estas técnicas ofrece el potencial completo para cubrir todos los análisis ofrecidos por la técnica de PCR (Adams *et al.* 2003, Bellemain *et*

al. 2005, Constable *et al.* 2001, Gardipee 2007, Taberlet *et al.* 1999). La fuente de ADN de técnicas no invasivas incluyen: pelos, heces, orina, plumas, células bucales de comida regurgitada, piel y cascarones de huevos (Taberlet *et al.* 1999).

Las muestras fecales se han utilizado con frecuencia para la aplicación de marcadores de identificación de especie y de linaje, estos estudios se enfocan en el análisis de ADN mitocondrial (Taberlet *et al.* 1999). Sin embargo, el completo potencial de los marcadores moleculares incluye el estudio de ADN nuclear. Los marcadores de ADN nuclear se utilizan para estudios de identificación de individuos, parentesco, reconstrucciones de pedigrée, identificación de sexo, estimación de censos y el nivel de polimorfismos entre y dentro de las poblaciones (Taberlet *et al.* 1999). La condición y naturaleza del ADN encontrado en las heces limita el libre empleo de esta gran gama de marcadores. Además, aunque ya ha habido un gran avance en esta área, todavía existen muy pocos estudios comprensivos para la aplicación y procesamiento de muestras fecales (Taberlet *et al.* 1999).

Las limitaciones en el procesamiento de heces resultan de una baja calidad de ADN (Taberlet *et al.* 1999). El ADN del hospedero se encuentra muy fragmentado debido los procesos digestivos del animal y subsecuente exposición al sol, cuyos rayos ultravioleta degradan el ADN (A. Ávalos, com. pers.). La calidad de la extracción se ve afectada por una alta cantidad de inhibidores (Taberlet *et al.* 1999), como las sales biliares y la bilirrubina (Zhang *et al.* 2006). También, la concentración de ADN es normalmente baja (Taberlet *et al.* 1999) y además, durante la extracción existe un alto riesgo de contaminación (Taberlet *et al.* 1999). Estas restricciones se han ido superando desde 1991, al mejorar y proponer nuevos protocolos de extracción como: el método de guanidinio tiocianato y sílice, el de dos fases acuosas, el método de fenol-cloroformo y el método Chelex (Zhang *et al.* 2006). Sin embargo aún existen grandes inconvenientes, especialmente al aplicarlos a herbívoros (Zhang *et al.* 2006).

En las muestras de heces es más fácil obtener resultados analizables con marcadores de ADN mitocondrial que con microsatélites. Esto es porque en cada célula existen miles de copias de ADN mitocondrial en comparación al ADN nuclear que por lo general solo hay dos en cada célula (Taberlet *et al.* 1999, Gardipee 2007, Panasci 2009). Además, en 1995, se detectó que la amplificación de microsatélites en heces, puede

generar resultados falsos (Taberlet *et al.* 1999). Cuando un heterocigoto reporta ser homocigoto puede ser debido a la estocasticidad de muestreo que resulta al pipetear extractos muy diluidos; este fenómeno se llama 'pérdida de alelo'. También el homocigoto a veces resulta ser heterocigoto y se produce un 'alelo falso'; esto es por la presencia de otros artefactos en la extracción (Taberlet *et al.* 1999). En el caso del 'alelo falso' si el individuo en realidad es heterocigoto se podrá observar la presencia de tres bandas y subsecuentemente detectar el error. Se predice que el error de genotipo normalmente se produce en un 5 por ciento de los resultados, y tiene la capacidad de cambiar las conclusiones finales de cualquier estudio de diversidad genética (Gardipee 2007, Panasci 2009, Taberlet *et al.* 1999).

Como ya se ha discutido, las técnicas de muestreo no invasivas representan una oportunidad extraordinaria para avanzar en el entendimiento de poblaciones silvestres (Taberlet *et al.* 1999). Sin embargo, presentan muchas limitaciones que sólo pueden ser superadas al invertir tiempo, fondos y sabiduría de laboratorio (Taberlet *et al.* 1999). A comparación de la extracción de heces, las técnicas convencionales en donde utilizan tejido o sangre son mucho más fáciles y por lo tanto el factor decisivo en el diseño muestral son las restricciones de campo (Taberlet *et al.* 1999). De acuerdo a Taberlet (1999), la colección de heces debe ser considerada en casos donde la captura del animal no es una opción; como es el caso de las poblaciones pequeñas y en peligro de extinción y cuando el comportamiento de la especie es hermético (Taberlet *et al.* 1999). El estado en el cual se halla el manatí ejemplifica un caso en donde este tipo de muestreo es recomendable, ya que es una especie vulnerable y se caracteriza por tener un comportamiento sigiloso y elusivo (Quintana-Rizzo & Reynolds III 2010).

B. Justificación

La población del manatí en Guatemala se encuentra en una situación alarmante. La densidad poblacional es bastante baja, con un máximo de 0.549 manatíes/km² (Quintana-Rizzo 1993). En otras palabras, hay solamente un manatí por cada 2 km² en el lago de Izabal y en la costa Atlántica de Guatemala. Aun así, esta especie sigue estando sujeta a actividades de explotación, como la cacería ilegal, y a pesar de los esfuerzos, esta

actividad ilegal no se ha logrado controlar. Para contrarrestar esta situación es necesario llevar a cabo planes de conservación más efectivos. En la conservación efectiva de cualquier especie es necesario llevar a cabo investigación, para comprender al organismo y su entorno, estudiar el impacto de los esfuerzos conservacionistas y encontrar nuevos métodos de trabajo. El presente estudio, enfocado en estudiar la diversidad genética de la población del manatí en Guatemala responde a la necesidad de llevar a cabo investigación de aplicación directa y de alto impacto para la conservación del manatí y así contribuir de manera significativa a la comprensión de la población, para asegurar la sobrevivencia de esta especie.

Los fundamentos y el estudio de la genética de poblaciones es un recurso valioso para la conservación de especies vulnerables (O'Brien 1994, Taberlet *et al.* 1999, Kellogg 2008). Esto es porque permite la identificación de las poblaciones genéticamente más variables y las menos variables, haciendo posible la formulación de planes de manejo dirigidos hacia cada tipo de población. De esta forma se optimiza la continua propagación de toda la diversidad genética actual de determinada especie. Esto aumenta las probabilidades de establecer poblaciones futuras genéticamente más diversas y por lo tanto más estables ante cualquier cambio ambiental. Los estudios genéticos de vida silvestre también son importantes porque generan datos ecológicos esenciales para entender a determinada especie, como su abundancia, rango geográfico, hibridación, dieta y presencia de patógenos (Schwartz *et al.* 2006).

El manatí es una especie vulnerable (Thornback & Jenkins 1982) cuyo comportamiento es elusivo, haciendo difícil la realización de estudios ecológicos mediante observaciones directas. Al estudiar la genética de la población del manatí en Guatemala, la conservación de este animal dará un gran salto adelante ya que generará mucha información acerca de la dinámica poblacional a través del estudio de la variabilidad genética y la distribución de tal variabilidad. Esto dará una idea del grado de estabilidad de la población y los sitios más importantes para su conservación. Esto es esencial para entender la ecología de la especie a nivel nacional e internacional. El manatí es genéticamente menos variable en los extremos latitudinales de su distribución, la Florida y Brasil son los países con menos variabilidad genética y por lo tanto la región centro americana puede o no servir como un puente genético (Quintana-Rizzo &

Reynolds III 2010). Un análisis en Guatemala ayudará a la comprensión de este dilema muy importante para la conservación.

Esta investigación representa el tercer estudio de Centro América enfocado en estudiar la genética poblacional de manatíes dentro de un país. La primera investigación fue ejecutada en Panamá (Muschett *et al.* 2009) y la segunda se basó en Belice (Hunter *et al.* 2010a). Todas las poblaciones del manatí en Centro América son similares, porque enfrentan las mismas amenazas, como la cacería ilegal, contaminación ambiental, además son poco estudiadas. Por lo tanto estos estudios (Muschett *et al.* 2009, Hunter *et al.* 2010a y el presente) van en conjunto hacia la conservación del manatí en países en vías de desarrollo.

Es indeterminada la frecuencia de desplazamiento de los manatíes fuera del Lago de Izabal, y en el contexto de que no hubiera un desplazamiento, se pueden dar diferencias en aspectos conductuales y ecológicos dentro de las dos áreas de estudio, El Refugio de Vida Silvestre Bocas del Polochic y la Bahía La Graciosa. El conocer estas diferencias ecológicas ayuda a tener un entendimiento más visionario de la especie, esencial a la hora de medir cualquier impacto ambiental que pueda afectar a la población. En este caso las futuras actividades de minería por ejemplo, pueden causar un daño severo a la misma. Por lo tanto, Quintana-Rizzo y Reynolds III (2010) recomiendan la realización de tales evaluaciones ecológicas para poder medir el posible efecto que esta actividad y las que ya se están llevando a cabo, como la industria de la palma africana, tendrán en la población de manatíes. Con esto, se postula que a nivel nacional esta investigación, al rendir una valoración de la diversidad genética de la población, espera dar una cuantificación general de la problemática situación a la que se enfrenta el manatí. También espera incitar otras investigaciones recomendadas para el país de Guatemala, tales como la aplicación de radiotelemetría y análisis de contaminación.

C. Objetivos

1. General

Estudiar la diversidad genética de la población del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) en aguas guatemaltecas, específicamente en las dos áreas más importantes para la conservación de la especie en el país pero ecológicamente distintas, la Bahía La Graciosa y Bocas del Polochic, en Izabal.

2. Específicos

- a. Aportar al primer objetivo específico de la “Estrategia nacional para la conservación del manatí y su hábitat”, que dice: “Fomentar el desarrollo de estudios de investigación que permitan mejorar el conocimiento del manatí, su hábitat y la percepción social y cultural del mismo por parte de la población del departamento de Izabal”.
- b. Evaluar tres técnicas de muestreo de tipo no invasivo o de invasión mínima para el estudio genético de la población del manatí en Guatemala, tales técnicas son: el raspado de piel, colección de heces y colección de tejido de cadáveres.
- c. Evaluar y desarrollar un protocolo de extracción para el análisis de muestras de tejido de cadáveres y el análisis de muestras fecales de manatí.
- d. Utilizar y evaluar marcadores de ADN mitocondrial para determinar la variabilidad haplotípica de la población del manatí en Guatemala, y realizar comparaciones cuantitativas con otros países, de manera que se tenga un mejor entendimiento de la distribución de los linajes de la especie.
- e. Aplicar y analizar marcadores de microsatélites para el estudio de la diversidad de ADN nuclear en la población del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) en Guatemala.

II. METODOLOGÍA

A. Área de estudio

El trabajo de campo se realizó desde julio de 2010 a febrero de 2011. Cada mes se colectaron muestras de heces y de tejido para su posterior análisis genético. Las áreas de muestreo fueron la Bahía La Graciosa y Bocas del Polochic, en el departamento de Izabal. Estos sitios fueron escogidos porque presentan los mayores índices de avistamiento del manatí y además son ecológicamente distintos.

La Bahía La Graciosa forma parte del “Refugio de Vida Silvestre de Punta de Manabique,” decreto 23-2005, que cubre un área terrestre de 44 km² y corresponde a las coordenadas de 15° 51'18.50"N y 88° 31'30.48"O (Google 2012). Según el modelo de Holdridge, esta reserva se encuentra dentro de la zona de vida Bosque muy Húmedo Subtropical (bmh-S) (Fundación Mario Dary Rivera FUNDARY *et al.* 2006). De esta reserva, dos terceras partes corresponden al área de ambientes marinos, e incluyen la Bahía La Graciosa, la Bahía de Amatique y el Golfo de Honduras (Fundación Mario Dary Rivera FUNDARY *et al.* 2006). En esta área se descargan las corrientes de mayor caudal del país, por la vía de Río Dulce (Fundación Mario Dary Rivera FUNDARY *et al.* 2006). La Bahía La Graciosa atrapa vastas cantidades de sedimentos, caracterizándola con una alta productividad y diversidad biológica acuática (Fundación Mario Dary Rivera FUNDARY *et al.* 2006). Aquí se incluye vegetación ideal para la alimentación del manatí, como *Thalassia testudinum*, el pasto marino más dominante en el área, seguido por *Halophila baillonis* (Yañez-Arancibia *et al.* 1999, Galán-Villagrán 2006). Además, la calidad del hábitat para el manatí es realizada por la baja densidad poblacional humana presente en la bahía (Quintana-Rizzo & Reynolds III 2010). De acuerdo a los monitoreos periódicos realizados por medio de avistamiento aéreos, la Bahía La Graciosa es la segunda área con estimados más altos de manatíes en Guatemala.

La segunda área de estudio, Bocas de Polochic, comprende el “Refugio de Vida Silvestre Bocas del Polochic”, decreto 38-96, la superficie total de esta reserva esta dividida en 143.60 km² de superficie terrestre y 64 km² de superficie lacustre (El Congreso de la República de Guatemala 1996). Esta forma parte de los 212.27 km² reconocidos como sitio RAMSAR. Bocas del Polochic se encuentra dentro de la zona de vida Bosque Muy

Húmedo, de acuerdo a Holdridge (Fundación Defensores de la Naturaleza 1996) y constituye varios ecosistemas compuestos por bosques latifoliados, en donde se dan muchos fenómenos naturales que le otorgan su importancia a la reserva (Fundación Defensores de la Naturaleza 2002). El refugio está localizado en el delta del Río Polochic, y se abre en el extremo oeste del Lago de Izabal, entre los paralelos 15° 22'05'' y 15° 29'55''. A las orillas de esta área protegida se sitúa el municipio del Estor, Izabal (Fundación Defensores de la Naturaleza 1996). Esta área protegida fue reconocida en 1996 y una de las justificaciones que se utilizó en determinar su importancia fue su identificación como un área de crianza para los manatíes (E. Quintana-Rizzo, com. pers.). El ente encargado del refugio es la Comisión Nacional de Áreas Protegidas (CONAP) pero fue delegado a la Fundación Defensores de la Naturaleza (El Congreso de la República de Guatemala 1996).

B. Métodos de campo

Los viajes mensuales de campo consistieron en un promedio de cuatro días en cada área de estudio. Los manatíes fueron localizados y observados utilizando varios métodos de campo estandarizados para el estudio de la especie. En general, el trabajo de campo fue organizado para incrementar el tiempo de observación del animal, optimizar el acercamiento, e incrementar el éxito de la colección de las muestras genéticas. Se utilizaron cuatro técnicas de campo: los sondeos por lancha, los avistamientos aéreos, el sonar lateral y la colección de muestras.

1. **Avistamientos aéreos.** El avistamiento aéreo se llevó a cabo desde una avioneta ultraliviana. Los sondeos se condujeron en base a la técnica de Lefebvre y Kockman (1991) (Quintana-Rizzo 2005a, 200b), en donde la avioneta vuela a un promedio de velocidad de 150-160 km/hr. Como consecuencia de un accidente previo usando la avioneta designada, la altura requerida por la técnica fue modificada de 200 metros a 250 metros, esto fue para dar más tiempo que el piloto tome control sobre la avioneta. Durante estos avistamientos, el observador principal (Heidy García, Fundación Defensores de la Naturaleza, FDN) iba a la par del piloto (Hans Droege). La avioneta viajaba a 500 metros

desde la costa y para confirmar la observación siempre se daban giros para el lado derecho para beneficiar la vista del observador principal. Al localizar a los manatíes, el observador principal indicaba al equipo de campo ubicado en una lancha tipo tiburonera la localidad específica de los animales acelerando la avioneta en el área donde los animales se encontraban (leer siguiente sección). El equipo de campo sostuvo una bandera blanca para indicar la detección positiva y una bandera roja para indicar que los manatíes no habían sido detectados. En el primer caso, la señal también fue utilizada para indicarle al equipo de la avioneta que podía retirarse. Una vez la avioneta ya no estaba en el área de observación, el seguimiento de los manatíes tomaba inicio por el equipo de campo.

2. Sondeos por lancha. Los monitoreos por lancha se llevaban a cabo en coordinación con la técnica del avistamiento aéreo. Se utilizó una lancha tiburonera de 25 pies de largo con un motor 50 de cuatro tiempos. El equipo de campo fue conformado por Grecia Méndez (Universidad del Valle, UVG), Oscar Machuca (FDN), Arnoldo Chaal (FDN), y Marco Tulio Milla (FDN). Al recibir la señal de la avioneta de la ubicación del manatí, la lancha partió hacia tal sitio y al detectarlo se le indicó a la avioneta que podía retirarse (bandera blanca). Durante los seguimientos, todos los miembros enfocaron la vista en el animal focal. En los casos en donde se encontró un grupo, el observador principal (Oscar Machuca) escogió el animal a seguir.

3. Sonar lateral. Antes de comenzar la fase de campo en Guatemala, se tomó un curso de entrenamiento del sonar lateral dirigido por el Dr. León Oliviera, un experto en manatíes encargado del Proyecto Manatí, Tabasco, México. Dicho entrenamiento se llevó a cabo del 22 al 25 de marzo del año 2010. El Dr. Oliviera proveyó clases teóricas al igual que prácticas de campo en las lagunas encerradas de Tabasco. Estas lagunas proveyeron un ecosistema excelente para familiarizarse con el uso del equipo y además las aguas de dichas lagunas son someras sirviendo como un ecosistema modelo.

El sonar de escaneo lateral fue originalmente diseñado para detectar escuelas de peces; sin embargo ha llegado a ser popular en el estudio del manatí. En este estudio se utilizó un sonar de marca Hummingbird® modelo 998 c SI, para detectar manatíes

sumergidos en aguas guatemaltecas. Para determinar la distancia al objeto, este sonar midió el tiempo entre la transmisión del haz de sonido y la ola de sonido cuando esta fue reflejada del objeto. La señal reflejada se utilizó para poder interpretar la localización, tamaño y composición del objeto. El sonar de escaneo lateral estuvo equipado con haces en cada lado que producían franjas muy delgadas que juntas formaban una imagen de alta resolución y podían ser vistas a diferentes frecuencias.

González-Socoloske (2007) desarrolló la técnica del uso del sonar lateral específicamente para la detección de manatíes en aguas someras y oscuras. El equipo producía una imagen de sombra de derecha a izquierda conforme la lancha pasaba por el fondo. La composición del fondo determinaba la intensidad de reflexión; por ejemplo, la roca y gravilla proveían vistas más claras que el lodo y la arena. De acuerdo a la técnica, la lancha viajó en línea recta para no distorsionar la imagen producida. Los manatíes se detectaban principalmente porque en la imagen se producía una sombra asociada a ellos que se forma cuando el manatí bloqueaba el haz acústico, dando una buena idea de la forma y dimensión del animal (González-Socoloske 2007).

4. Obtención de muestras para análisis genéticos. Se emplearon tres técnicas de muestreo para su posterior evaluación genética. Los tipos de muestra que fueron colectados son heces y tejido. Las técnicas que se emplearon fueron: la colección de muestras de tejidos por medio de un raspado de piel (Carney *et al.* 2007), la colección de muestras de heces, y la colección de tejidos de animales varados encontrados muertos. Entre ellas varió mucho el porcentaje de éxito, el esfuerzo en el campo y la calidad de la muestra.

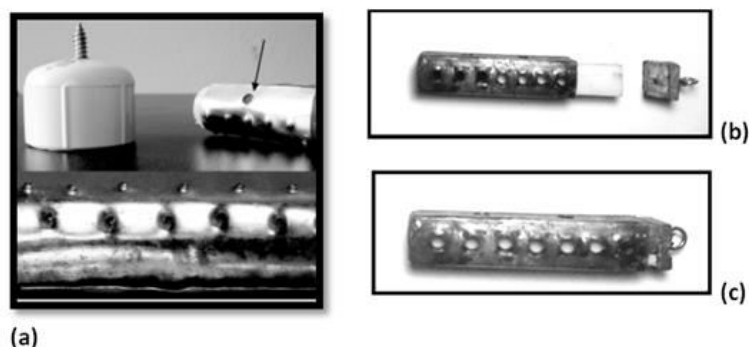
a. Colección de muestras de tejido de manatí. La técnica principal de muestreo en este estudio fue el raspador de piel (Carney *et al.* 2007), para extraer muestras de la epidermis del manatí desde la lancha. Esta fue la primera vez que dicha técnica fue utilizada en el país. Por esta razón, se ejecutó una fase de exploración para detectar e implementar las modificaciones necesarias a la técnica, y además, establecer la dinámica del equipo de campo a la hora de tomar la muestra. Como resultado de esto se hicieron

dos modificaciones principales de la técnica de Carney *et al.* (2007): 1) en el diseño del raspador y 2) en el protocolo o plataforma de colección de muestra.

Raspador de muestras. El modelo del raspador consistió en un tubo de PVC de 2 m de largo (Carney *et al.* 2007). El tubo sostiene una varilla de nylon rodeada por una lámina de aluminio perforada (Figura 3). Esta lámina de aluminio fue la que raspó directamente la piel del manatí. El tamaño de las perforaciones de la lámina fueron pequeñas y con poca profundidad para minimizar los posibles daños al animal. En el presente estudio, las siguientes modificaciones del modelo se hicieron para incrementar las posibilidades de raspar el tejido de manatí.

El tubo se hizo más largo (aproximadamente 4 metros), y su peso se redujo utilizando un tubo de aluminio en lugar de PVC. El raspador consistió en una unidad rectangular de metal de 12 cm de largo y 3 cm de ancho (Figura 4). Se diseñó una placa de plástico de aproximadamente 11 cm de largo y aproximadamente 2 cm de ancho para insertarla adentro del dispositivo; la placa sirvió para guardar el tejido depositado al raspar el animal. Las perforaciones del raspador se hicieron a un costado de la unidad de metal y se hicieron más pronunciadas (cambió de 1 mm de profundidad a 5 mm) (Carney *et al.* 2007) y más anchas (cambió de aproximadamente 2 mm a aproximadamente 5 mm) para asegurar la obtención de tejido.

Figura 4: Comparación del raspador utilizado y diseñado por Carney (2007). (a) Muestra el diseño original, utilizado por Carney (2007), (b) muestra el raspador abierto y (c) muestra el raspador cerrado. Las flechas señalan los hoyos en donde se insertan los tornillos del tubo que sostiene el raspador.



1) Plataforma de colección de muestras. La técnica original fue diseñada para coleccionar las muestras de manatí desde una lancha, muelle o dique de mar (Carney *et al.* 2007). Esto funciona bien en aéreas donde los manatíes pueden ser aproximados con facilidad desde una lancha y desde tierra (Carney *et al.* 2007). La toma de muestra original consiste en raspar firmemente la parte dorsal del manatí o en una parte libre de percebes o algas. El raspado es más fácil cuando los animales se encuentran en descanso o copulando (Carney *et al.* 2007).

En el presente estudio, durante las observaciones preliminares de campo y entrevistas hechas a antiguos pescadores, se observó que los manatíes en Guatemala detectan rápidamente el sonido del motor de una lancha y el movimiento de la lancha sobre las olas. El resultado es que los manatíes se sumergen rápidamente por el ruido. Por esta razón, se decidió cambiar la plataforma utilizada para la colección de muestras. Se utilizó un cayuco sin motor para el acercamiento a remo hacia los manatíes. El cayuco se llevó sujeto a la lancha durante los días de campo. En el momento de colección de muestras, dos personas (la autora y un guardarecursos) se trasladaban al cayuco donde se llevaba el raspador y una hielera para almacenar las muestras.

Para perseguir al manatí, se establecieron roles en el equipo de campo, de la lancha y del cayuco; ambos equipos poseían un raspador. La lancha se concentraba en quedarse en las afueras con el motor apagado, viajando lentamente a remo a una distancia de no menos de 20 metros de la costa. Mientras que el cayuco viajaba en dirección del área donde se observaron los manatíes para poder raspar el animal.

Cuando la muestra de tejido fue tomada, el raspador se desenroscó del tubo de aluminio y el raspador entero se colocó en un tubo de centrifuga de 50 ml marca Falcon. El tubo se llenó con etanol al 75% y 1X TE (pH 8) (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8) (Carney *et al.* 2007) con el propósito de lavar la muestra y fijarla temporalmente. El tubo Falcon se rotuló con un código de identificación junto con la fecha de colección. Este luego se almacenó en una hielera antes de ser transportado a la estación biológica. Además, para cada muestra se tomaron datos sobre la localización geográfica, las condiciones climáticas y la fecha.

En caso de que las extracciones de ADN de las muestras de tejido no fueron realizadas inmediatamente después de ser colectadas, éstas se trasladaron al fijador

DMSO salino (Apéndice D) (Carney *et al.* 2007). La ventaja de este fijador es que puede ser almacenado temperatura ambiente y además ha probado ser uno de los mejores medios para la preservación a largo plazo de muestras de tejido de mamíferos (Kilpatrick 2002). El traslado de las muestras de tejido a DMSO salino se llevó a cabo en una mesa previamente limpiada con etanol al 75%. Eso se hace en la estación biológica para después transportar las muestras al laboratorio.

b. Colección de muestras de heces de la población del manatí. La búsqueda de muestras de heces se llevó a cabo al final de cada avistamiento. Los sitios donde fue común encontrar manatíes correspondieron a posibles sitios de alimentación y por lo tanto, aquí fue factible encontrar heces flotando en la superficie del agua. Por lo general, la búsqueda fue *ad libitum* haciendo un enfoque en encontrar los “cortes de agua” que es donde se depositan componentes de la superficie del agua, como algas y pastos marinos. Además, se llevó a cabo búsquedas en las orillas de los humedales, específicamente donde había vegetación.

Todas las muestras fueron colectadas utilizando bolsas de plástico y guantes de látex, los cuales fueron descartados después de cada colecta individual. Cada muestra se colocó en una pesa manual y se anotó el peso, el tamaño y el color. Las muestras fueron almacenadas en frascos estériles para muestras fecales utilizando pinzas estériles, para disminuir las probabilidades de contaminación. Las heces se fijaron en etanol al 95% usando una proporción de 1:3. Todas las muestras se identificaron con: las coordenadas geográficas del área de colecta, fecha de colecta, número de submuestras colectadas, condiciones climáticas y una descripción de la zona de colecta (Apéndice A). Las muestras colectadas fueron almacenadas a temperatura ambiente (Zhang *et al.* 2006, Panasci 2009) en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala hasta su posterior análisis.

c. Colección de muestras de tejido de animales varados encontrados muertos. Se colectaron muestras de tejido de animales varados en los últimos cinco años. Cinco muestras fueron de animales varados encontrados muertos entre los años 2007-2009. También se desenterró el cadáver de una cría difunta en 2008, localizada en el centro de

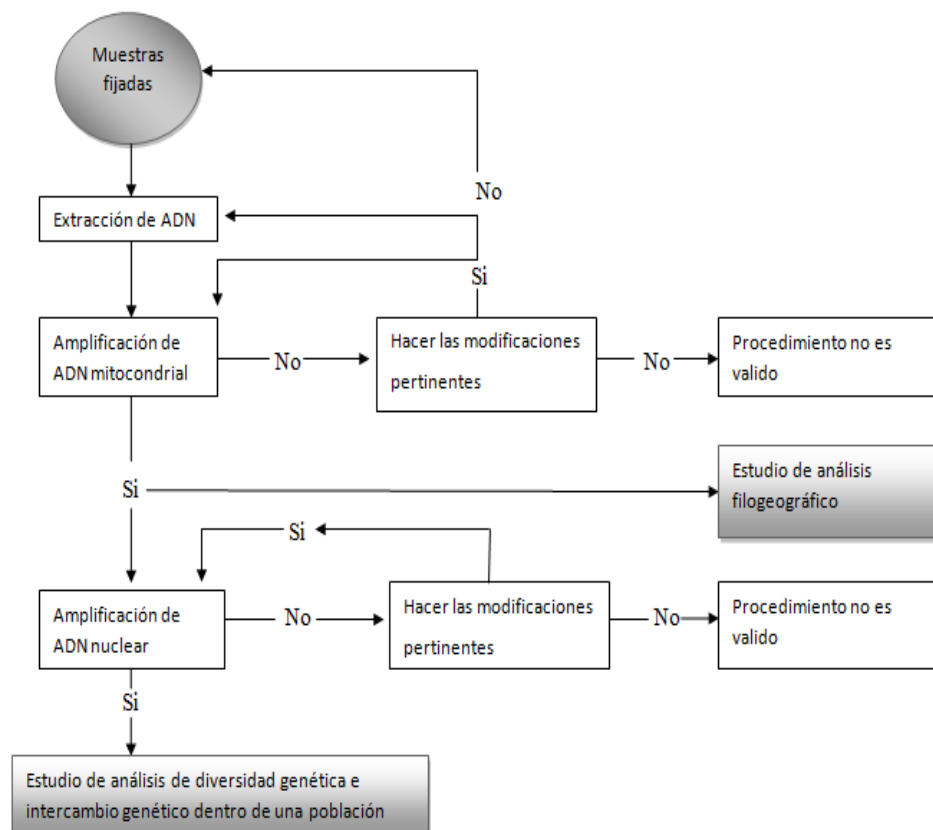
rehabilitación del manatí, Wildtracks, Belice. Otra muestra fue tomada de carne fresca de manatí que fue confiscada por CONAP, oficina de Puerto Barrios, durante la ejecución del proyecto. En todas las muestras se anotó la procedencia y el método de almacenamiento en el cual se encontraba la muestra antes de su ingreso al laboratorio de Biotecnología, UVG. Este método consistía por lo regular en la congelación del tejido a temperatura de -20° C. Las muestras normalmente consistían en recortes del músculo y la dermis y epidermis del animal.

C. Métodos de laboratorio

Los marcadores de ADN mitocondrial y de ADN nuclear (microsatélites) se utilizaron para estudiar la diversidad genética y dinámica poblacional del manatí. El 80% de las muestras colectadas fueron muestras de heces ($n=29$), y el 20% ($n=7$) fue de tejido de animales varados muertos. Las muestras de tejido no fueron colectadas frescas y la naturaleza de las muestras de heces puede limitar la aplicación de análisis genético. Debido a la incertidumbre generada acerca del grado de degradación de las muestras, cada fase que conlleva el análisis genético fue evaluada con el propósito de maximizar la eficiencia de cada una. El análisis genético en este estudio se dividió y se evaluó con respecto a los siguientes pasos: (1) extracción de ADN, (2) análisis de ADN mitocondrial y (3) análisis de ADN nuclear (microsatélites). Esta evaluación se puede mostrar en un diagrama de flujo (Figura 5).

El diagrama de flujo describe un sistema de retroalimentación en donde primero las muestras extraídas se someten a un análisis de ADN mitocondrial. Si esto prueba ser positivo se procede a la amplificación de microsatélites. Si prueba ser negativo, es decir, no hay amplificación, se modifica el método de extracción o las condiciones de PCR. Si aún no se obtiene una amplificación, la limitante radica en la naturaleza de la muestra y por lo tanto el procedimiento no es válido. Este sistema de análisis fue aplicado primero a las muestras de tejido y luego a las muestras de heces para amplificar ADN mitocondrial y ADN nuclear (microsatélites). En el caso de los microsatélites, las posibles modificaciones radicaron únicamente en las condiciones de reacción de PCR.

Figura 5: Diagrama de flujo demostrando el esquema utilizado para evaluar la factibilidad de realizar un estudio de análisis genético en muestras fecales, al igual que en muestras de tejido de animales varados.



1. Extracción de ADN. Los dos tipos de muestra que fueron colectados durante la fase de campo no son de alta calidad (Gardipee 2003, Carney *et al.* 2007) como antes mencionado. El análisis y los protocolos para estas muestras se han desarrollado en laboratorios especialmente diseñados para tratar estas muestras complicadas (Gardipee 2003). En este estudio se seleccionaron y modificación dos protocolos factibles y aplicables para las muestras (dos para los tejidos y dos para las heces). A continuación se detallan los protocolos escogidos junto con las modificaciones aplicadas en el estudio.

a. Muestra tejidos. La mayoría de las muestras de tejido de manatíes obtenidos en el presente estudio no fueron directamente colectadas por la autora. Por lo tanto, las condiciones de campo en el momento de la colecta, al igual que el transporte y almacenamiento fueron inciertas. Además, una muestra obtenida por la autora presentaba un grado de putrefacción ya avanzado. Debido a la incertidumbre del grado de descomposición de todas las muestras de tejido se aplicaron dos protocolos de extracción de ADN. El primer protocolo, fenol: cloroformo (Apéndice D) fue aplicado en caso de que las muestras se encontraran en condiciones aceptable, el segundo protocolo, extracción con sílice orgánico (Apéndice D), fue aplicado para tratar muestras putrefactas.

1) Protocolo fenol: cloroformo (modificado después de Ausebel *et al.* 1989). La técnica de fenol: cloroformo fue utilizada asumiendo que las muestras tenían un grado de descomposición bajo y aún poseían una integridad suficientemente alta para poder ser analizadas por medios convencionales. Esta técnica ha sido ampliamente manejada y es bastante sencilla. En este estudio consistió en agregar un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1) a la muestra acuosa de ADN, esto creó dos fases. La fase orgánica (ADN) e inorgánica (fenol: cloroformo) se mezclaron utilizando un vórtex y luego se separaron a través de una centrifugación. El fenol extrajo los compuestos proteicos y el cloroformo se mezcló con el fenol para asegurar la separación de las fases. El ADN que se encontraba en la fase acuosa se concentró realizando una precipitación con etanol al 90% y luego al 70%(Walker 1984).

2) Protocolo de sílice orgánico (modificado después de Höss y Pääbo 1993). Este método de extracción fue aplicado asumiendo que las muestras de tejido tenían un grado de descomposición bastante avanzado imposibilitando así la obtención de una amplificación de ADN; esto es debido a la baja concentración de ADN de alto peso molecular en muestras putrefactas. En el método de sílice orgánico primero se agregó una solución de extracción (5 M Guanidinio tiocianato [GuSCN], 0.1 M Tris-HCL pH 6.4, 0.02 M EDTA pH 8.0 y 1.3% Triton-X) a 1 cm³ de tejido seguido por un período de incubación (Apéndice D). Esto se hizo con el propósito de eliminar las proteínas. Luego

de la incubación se añadió más buffer de extracción y la mezcla se trató con una suspensión de sílice, el cual purificó y concentró el ADN extraído (Marrero 2009), el sílice se adhiere de forma selectiva a las moléculas de ADN (Höss & Pääbo 1993). El sílice junto con el ADN se depositó al fondo del tubo de centrifuga creando así un pellet. Este pellet se sometió a una serie de lavados, dos veces con 750 μ l de buffer de lavado (10 M GuSCN, 0.1 M Tris-HCL) y dos veces con etanol al 70%. Finalmente, el ADN luego se eluyó en TE.

b. Muestras fecales. Dos protocolos de extracción fueron utilizados para analizar las muestras fecales. Primero se implementó el protocolo de Zhang *et al.* (2006) y luego el de Marrero *et al.* (2009). El rendimiento de cada protocolo fue comparado tomando en cuenta la integridad, concentración y pureza de la extracción de ADN (este procedimiento está detallado en el apéndice). Otras diferencias entre ambos protocolos son: el tiempo de ejecución y el costo económico.

1) Protocolo de Zhang. El protocolo de Zhang *et al.* (2006) (Apéndice D) combina varios pasos de purificación que incluyen: un pretratamiento con etanol al 95% y una solución 1X TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8), un absorbente de inhibidores hecho de almidón, el método de CTAB (0.7 NaCl, 10% cetyl bromuro de trimethyl-amonio, CTAB), el método estándar de fenol:cloroformo, y por último el método de guanidinio tiocianato-sílice. A este protocolo se le hicieron las siguientes dos modificaciones:

a) Purificación con CTAB: Se transfirieron 450 μ l en lugar de 650 μ l del sobrenadante a un tubo de centrifuga después de realizar el tratamiento con almidón. Esto se hizo para no sobrecargar el tubo y poder realizar dos extracciones de una misma muestra. Las proporciones con respecto a los otros agregados al tubo de centrifuga fueron mantenidas, 112 μ l de NaCl y 188 μ l de CTAB.

b) Guanidinio tiocianato-sílice: Se obvió el tratamiento con guanidinio tiocianato-sílice debido a la falta de disponibilidad de hidrocloreuro de guanidinio y

una columna de centrifugación. En lugar de este paso, las extracciones se resuspendieron en 500 µl de isopropanol a -20° C durante una noche.

2) Protocolo de Marrero. El protocolo de extracción de Marreo *et al.* (2009) es una versión del método guanidinio tiociano-sílice. En esta versión (Apéndice D), la muestra primero se agregó a un solución de extracción (5M de guanidinio tiocianato (GuSCN), 50 mM Tris-HCL, 0.01 M EDTA y 0.65% de Tritón-X) con el propósito de eliminar las proteínas. Esta solución luego se trató con una suspensión de sílice (Apéndice D), que purificó y concentró el ADN extraído (Marrero 2009). Esto sucede porque el sílice se adhiere de forma selectiva a las moléculas de ADN (Höss & Pääbo 1993). El sílice junto con el ADN se depositó al fondo del tubo de centrifuga creando así un pellet. Este pellet se sometió a una serie de lavados, primero con una solución de lavado de 5M GUSCN y Tris-HCL seguido por etanol al 75%. Los pellets se secaron y luego se agregó TE, aquí el ADN se separó del pellet de sílice y se eluyó en TE.

2. Amplificación y análisis de ADN mitocondrial. Para el análisis de ADN mitocondrial se hicieron ensayos con dos marcadores, el primer ensayo consistió en los cebadores L15926 (5'-TCAAAGCTTACACCAGTCTTGTAACC-3') y H16498 (5' CCTGAAGTAGGAACCAGATG 3') (Kocher *et al.* 1989), que amplifica un segmento de aproximadamente 550 pb. El segundo ensayo correspondió a CR-5 (5' TCAC CATCAACACCCAAAGC-3') y CR-4 (5'-AGATGTCTTATTTAAGAGGAA-3') (Southern *et al.* 1988) y amplifica 441 pb. En el caso del primer marcador, L y H, la reacción de PCR estándar fue de 1X de Buffer (marca Novagen) (10X = 100 mM Tris-HCl pH 9.0 at 25°C, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), una concentración final de 0.15 mM de MgCl (Novagen), 0.2 mM de cada dNTP, y 1µM de cada cebador y 1.5 U de *Taq* polimerasa en cada reacción. Se agregó 1 µl de ADN con concentración de 100 ng/µl. La reacción de PCR inició en 94° C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de 42° C por 45 s, 72° C por 1 min y 92° C por 30 s, y una extensión final fue de 72° por 10 min (Vianna *et al.* 2006).

El segundo marcador CR-4 y CR-5, la reacción de PCR consistió de Buffer 1X (Tris-HCL) (marca Promega), 4 mM de MgCl₂, 150 µM de cada dNTPs, 0.3 µM de cada cebador, 1.5 U de *Taq* polimerasa (Promega) y una concentración de 50-100 ng/ul de

ADN. Las condiciones del PCR fueron, 94° C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94° C por 1 min, 47° C por 1 min y 72° C por 1 min, y por último una extensión final de 72° C por 1 hora (García-Rodríguez *et al.* 1998). Un termociclador marca Mastercycler Eppendorff fue utilizado para ambos marcadores. La temperatura de alineamiento de los cebadores CR-4 y CR-5 varió en cuanto a las muestras de heces, en este caso la temperatura óptima fue de 54° C en lugar de 47° C como fue para las muestras de tejido.

Los productos de PCR se mandaron a secuenciar a la sede de Macrogen Inc. localizado en Corea. Estos productos fueron secuenciados de forma bidireccional para asegurar el nivel de confianza de cada nucleótido. Un producto de PCR fue aceptado para ser analizado cuando la reacción de la muestra generó una amplificación clara y en triplicado. El triplicado se obtuvo haciendo una dilución de 1/40 µl del primer producto de PCR amplificado en agua ultrapura. Un microlitro de esta dilución se sometió a una reacción de PCR, como si fuese la extracción de ADN (Kellogg 2008). Al obtener por lo menos 50 µl de volumen de reacción de PCR amplificado se removieron los dNTPs y los cebadores utilizando el kit de purificación de marca Novagen (Carnet *et al.* 2007).

Al obtener las secuencias, éstas fueron sometidas a un análisis de haplotipos. Primero los consensus se obtuvieron por alineamiento de las hebras forward y reverse después de ser editados manualmente utilizando el programa de Sequencher. Las secuencias de cada individuo fueron editadas y alineadas utilizando el programa Mega 5, aquí se determinaron los sitios polimórficos asignados de la secuencia de cada muestra. El objetivo principal de este procedimiento fue la obtención de la diversidad haplotípica de la población de manatíes en Guatemala por lo tanto se analizaron junto con secuencias publicadas en GenBank, contribuidas por Vianna *et al.* (2006).

3. Amplificación y análisis de microsatélites. Los 45 marcadores de microsatélites diseñados específicamente para la especie *Trichechus manatus* fueron desarrollados por García-Rodríguez *et al.* (2000), Pause *et al.* (2007), Hunter *et al.* (2010b) y Trigali *et al.* (2007). De estos marcadores, 3 fueron donados por la Dr. Susan Carney, Hood College para ser utilizados en el presente análisis. Estos marcadores fueron Tma FWCO3 (Trigali *et al.* 2007), TmaH13 (Hunter *et al.* 2010b) y TmaK01 (Pause *et al.* 2007), éstos ya han sido aplicados en la subespecie *Trichechus manatus latirostris* por lo tanto se examinó la

aplicabilidad de estos cebadores a los manatíes antillanos, *Trichechus manatus manatus*. La reacción de PCR para todos los marcadores incluye: Buffer IX para *Taq* polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂, 1.25 mM de cada dNTP, 0.25 μM de cada cebador y 1.25 U de *Taq* polimerasa, en una reacción de 25 μl. Las condiciones de PCR estándar fueron de 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94° C por 30 s, una temperatura de alineamiento óptima por 30 s, 72° C por 30 s y una extensión final de 72° C por 7 min.

Los marcadores fueron diseñados para la subespecie, el manatí de la Florida (*Trichechus m. latirostris*) y no para el manatí antillano (*Trichechus m. manatus*) por lo que las mismas condiciones de PCR no son aplicables para *T. m. manatus*. Por esta razón, se inició los ensayos de PCR para cada marcador con una temperatura de alineamiento más baja 52° C para incrementar las posibilidades de generar una amplificación y visualización de bandas. Después de asegurar la amplificación se subió la temperatura de alineamiento para generar mayor especificidad al segmento deseado (S. Carney com. pers.); esto se hizo porque temperaturas más altas de alineamiento suelen disminuir la probabilidad de la aparición de productos inespecíficos. También se estandarizó la concentración óptima de ADN para una visualización clara de las bandas. Esto fue ejecutado al realizar una reacción de PCR en tres muestras escogidas aleatoriamente y estableciendo concentraciones de 10, 20, 30, 60 y 90 ng/μl de cada muestra. Esto se hizo en muestras de tejido y de heces. Para cada PCR se confirmó una amplificación a través del proceso de electroforesis, primero en geles de agarosa y luego sometiénola a un análisis de tamaño por medio de geles de poliacrilamida (PAGE).

D. Análisis de resultados

Los resultados de este estudio cumplen con tres propósitos principales: 1) generar información acerca de la diversidad genética del manatí en Guatemala, 2) evaluar los métodos de campo para obtener muestras genéticas de esta especie y 3) evaluar los métodos de laboratorio del estudio genético del manatí. El análisis de estos objetivos principales se llevó a cabo de la siguiente forma.

1. Diversidad genética del manatí en Guatemala. El análisis de la diversidad genética del manatí en Guatemala se basó en la diversidad haplotípica que presenta esta población. Esto se hizo obteniendo el haplotipo de cada muestra fecal y cada tejido

secuenciado. Posteriormente se analizó la proporción de haplotipos encontrados en el país. Dicha proporción fue comparada con la de otras poblaciones de manatíes, incluyendo la de Belice y México. Las comparaciones de los patrones biogeográficos de la región permitieron desarrollar un entendimiento teórico del posible origen de la población guatemalteca de manatíes. Además, las condiciones para la amplificación de muestras de heces y de tejido de microsátélites fueron estandarizadas para la población de la subespecie, *T. m. manatus* en Guatemala.

2. Evaluación de técnicas de muestreo no invasivo y de invasión mínima para el estudio de la diversidad genética de manatí. Se hizo una evaluación de tres métodos de muestreo: 1) el método de raspado de piel, 2) la colección de tejido de animales varados muertos y 3) la colección de muestras fecales. La determinación del éxito de cada técnica de muestreo se basó principalmente en la cantidad de muestras obtenidas y en el nivel de esfuerzo requerido para la aplicación de cada técnica. Además, se evaluó las diferencias en el éxito de cada método para cada zona de estudio. Basado en estos resultados, se efectuó un análisis cualitativo de los factores que pudieron haber influido en la aplicación de cada técnica de muestreo no invasiva o invasiva mínima. Estos factores incluyen: elementos ambientales, características de la zona de estudio, comportamiento de la especie y condiciones de campo para la colecta de las muestras. A partir de este análisis se establecieron factores que incrementan la efectividad en la aplicación de cada método de muestreo.

3. Evaluación de métodos de laboratorio utilizados para el análisis de la diversidad genética del manatí. Dos tipos de muestra fueron procesados genéticamente, el tejido de piel y las heces. La evaluación de los métodos de laboratorio se realizó con el objetivo de determinar la calidad de cada tipo de muestra y evaluar los protocolos utilizados para el procesamiento de las mismas. Los métodos de laboratorio analizados fueron: la extracción de ADN, amplificación de ADN mitocondrial y amplificación de microsátélite.

a. Evaluación de protocolos para extraer ADN de muestras de manatí.

Primero se evaluó la integridad de la muestra; esto se hizo corriendo 5 μ l de cada muestra extraída en un gel de agarosa al 1% durante 30 minutos y luego se observó el gel a través de un transiluminador. Para cuantificar la concentración y la pureza de cada muestra, se hizo una dilución de 1/99 μ l en agua estéril y se midió la concentración y pureza utilizando un espectrofotómetro, Biophotometer plus de marca Eppendorf. La concentración se midió en nanogramos por microlitro (ng/ μ l) y la pureza usando una relación de absorbancias de luz ultravioleta a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. Un índice de pureza de \sim 1.8 indica que el ADN se encuentra libre de contaminación (ThermoScientific Fecha desconocida). Se analizaron estos factores para cada protocolo de extracción; para las muestras de tejido se evaluó el protocolo estándar de fenol:cloroformo (Ausebel *et al.* 1989) y el protocolo de sílice orgánico (Höss y Pääbo 1993). Para las muestras de heces se empleó el protocolo de Zhang *et al.* (2006) y Marrero *et al.* (2009). Cada protocolo de extracción fue comparado y analizado tomando en cuenta el tiempo de ejecución y costo.

III. RESULTADOS

Los resultados de este estudio conllevan tres componentes. El componente principal consiste en información generada acerca de la diversidad genética existente en la población de manatíes en Guatemala. A la par de este estudio se ejecutó una evaluación de los métodos utilizados para la obtención de muestras y también para llevar a cabo un análisis de ADN mitocondrial y de microsatélites. A continuación se detallarán los resultados obtenidos de la diversidad genética del manatí en Guatemala y una evaluación de las técnicas de muestreo no invasivas o de invasión mínima al igual que una evaluación del análisis genético de estas muestras.

A. Diversidad genética del manatí en Guatemala

Un total de 37 muestras de piel y de heces de manatí fueron colectadas en Guatemala. De éstas, 28 muestras fueron encontradas en la zona costera Atlántica de Guatemala, específicamente en la Bahía La Graciosa, y 7 muestras fueron colectadas en el Lago de Izabal o Bocas del Polochic.

1. Análisis de ADN mitocondrial. De las 37 muestras colectadas y analizadas, amplificaron 22 muestras, de las cuales 4 provenían de muestras de tejido y 18 de heces. Todas estas muestras fueron colectadas en la zona costera Atlántica de Guatemala. De las 4 muestras de tejido, 3 muestras estaban contaminadas y sólo 1 fue secuenciada exitosamente, dando un 25% de éxito en el análisis de haplotipos de tejidos de animales varados. Por otro lado, 11 de las 18 muestras de heces eran aptas para el análisis de diversidad haplotípica. Esto representó un éxito de 61% en el análisis de diversidad genética utilizando muestras de heces.

De acuerdo a la diversidad mitocondrial, los haplotipos A1, A4, A3 y J1 fueron identificados en las muestras de manatí colectadas en Guatemala. Cuatro muestras pertenecieron al haplotipo A1, cuatro muestras al haplotipo J1, tres muestras a A3, una

muestra al haplotipo A4 y una muestra perteneciente a la especie *Bubalus bubalis* (Búfalo de agua) (Apéndice B). Los haplotipos encontrados en la presente investigación han sido reportados en distintas regiones de América y el Caribe (Vianna *et al.* 2006) pero en general se concentran en la parte norte. El haplotipo J1 pertenece al Cluster II y ha sido reportado desde México hasta Guyana. Los haplotipos A1, A3 y A4 todos pertenecen al Cluster I que agrupa haplotipos desde la Florida, México, Grandes Antillas, Centro América y Sur América (Vianna *et al.* 2006). El haplotipo A1 se ha reportado en la Florida, La Republica Dominicana y Puerto Rico; A3 se ha reportado solamente en Belice y el haplotipo A4 se ha encontrado en México y Belice.

2. Análisis de microsatélites. Se obtuvieron las condiciones estándar para la amplificación de 4 de las 7 muestras de tejido utilizando los marcadores Tma FWCO3 (Trigali *et al.* 2007), TmaH13 (Hunter *et al.* 2010b) y TmaK01 (Pause *et al.* 2007) (Cuadro 1). Estas condiciones estándar consisten en la temperatura de alineamiento y la concentración de ADN de las muestras. La temperatura de alineamiento es importante ya que a temperaturas más altas se favorece una reacción más específica, sin embargo si la temperatura es muy alta se puede inhibir la amplificación del segmento deseado. En el caso de la concentración, si la concentración es muy alta la reacción de PCR se puede inhibir, puede ser muy inespecífica o producir bandas muy intensas (gruesas) que no son aptas para el análisis de microsatélites. Estas condiciones ideales dependen del tamaño de fragmento y las repeticiones de motivos en qué consiste cada marcador.

Las condiciones estándar para la amplificación de cada marcador fueron diseñadas para amplificar muestras de tejido y de heces de manatí sin embargo, solamente se utilizaron muestras de tejido para establecer tales condiciones. Estas condiciones estándar no fueron aplicables para las muestras de heces. La razón principal fue porque poseían una naturaleza distinta. El hecho de que las muestras de heces estaban más fragmentadas hizo imposible la aplicación de las mismas condiciones para que los cebadores se puedan unir al fragmento deseado.

Cuadro 1: Condiciones estandarizadas y características de cada microsatélite empleado para estudiar la diversidad nuclear de la población de manatí en Guatemala. Estas condiciones fueron estandarizadas en muestras de tejido luego aplicadas a las muestras de heces.

Locus	Fragmento cebador	Tamaño de Fragmento	Temperatura de alineamiento (°C)	Concentración óptima (ng/μl)	Repeticiones de motivos
Tma-FWC03	F:TCACGCTTGGCCTGCCTCTGCCG R:CTGCAGGGACACCCGTTATGGCA	189-204	60	30	(CTG)6TT(CTG)4TT(CTG)7
Tma-K01	F:CTATCAAGCGGCATGTTCAA R:AGCTTGGGATCGTGTGTTGTT	184-202	60	80	(CT)10(CA)11
Tma-H13	F:GCATCTTGGGAAGATTTTCCTT R:CACTGACAGATACGTGGTGGA	237-253	Programa touchdown de 35 ciclos de 58-64°C	80	(TCTA)13

B. Evaluación de técnicas de muestreo no invasivo y de invasión mínima para el estudio de la diversidad genética de manatí

El nivel del éxito en la aplicación de cada uno de los métodos de muestreo varió en cuanto al número de muestras obtenidas y el nivel de esfuerzo requerido. Además, la efectividad de cada método de muestreo dependió de la zona de estudio. En la Bahía La Graciosa, el método de colección de heces generó más muestras, 27 de las 29 muestras encontradas en esta zona consistieron en heces. En las Bocas del Polochic, el método de muestreo más eficiente fue la colección de tejido de animales varados muertos, ya que se obtuvieron un total de 5 de las 7 muestras de esta forma en este sitio. El análisis individual de cada método de muestreo se presenta a continuación.

1. Método de raspado de piel. Durante el estudio no se obtuvieron muestras de manatí con el método de raspado de piel. Este método requirió más esfuerzo de desarrollo en comparación a los otros dos métodos de colecta y varios factores influyeron en esto. Las modificaciones del diseño del raspador fueron muy útiles, porque aumentaron la agilidad del uso del raspador desde la lancha sobre todo al acercarse el animal porque el

tubo era más largo. Sin embargo, en los ocho meses de campo, únicamente tres acercamientos a aproximadamente 3-5 metros de los manatíes desde el cayuco ocurrieron y fueron en la fase de entrenamiento.

Durante los tres acercamientos sí se hubiera podido hacer un raspado si el portador (yo) hubiera tenido mayor agilidad y práctica para hacer dichos acercamientos ya que los manatíes fueron bastante rápidos y en algunos casos el manatí no salió del agua. De acuerdo a esta experiencia adquirida en los primeros días de la fase de entrenamiento e información obtenida a través del conocimiento local, se diseñó una técnica de búsqueda y acercamiento al animal que se asemejaba a una emboscada. Se llevaba a cabo, acompañada solamente de un guía turístico muy reconocido en El Estor por su gran experiencia trabajando con manatíes. Esta técnica se desarrolló solamente en el sitio de estudio Bocas del Polochic.

La técnica de raspado de piel funciona mejor si se ejecuta bajo una serie de condiciones. La búsqueda de los manatíes debe hacerse cuando no hay viento fuerte para evitar el oleaje. Además, la búsqueda desde un cayuco es más fácil que desde una lancha ya que el cayuco se puede manejar a remo y esto da mayor agilidad de movimiento y disminuye el ruido. Al detectar al manatí se viaja detrás de él cuidadosamente y cuando éste sale a la superficie a respirar, el cayuco se acerca lo más rápido posible para lograr un raspado. Tomando en cuenta estas condiciones, las mejores horas para las salidas de campo fueron de 7:00 a.m. a 12:00 p.m. La época óptima es de marzo a agosto porque

coincide con la época de apareamiento de los manatíes, y durante esta época ellos forman grupos grandes (Quintana-Rizzo & J.E. Reynolds III 2010) y se vuelven más dóciles.

Durante la ejecución formal del proyecto no se volvió a tener encuentros cercanos con los manatíes. Esto podría deberse a que la dinámica de trabajo cambió e imposibilitó que la técnica de acercamiento se aplicara en su totalidad durante el proyecto. Uno de los factores que fueron contraproducentes fue el ruido. Las fuentes del ruido fueron: la avioneta utilizada para buscar a los manatíes, el uso de una lancha más grande con un motor más grande, y el propio equipo de campo utilizado durante el proyecto (ej. el sonar lateral, la escalera de observación etc.).

Otro factor que afectó para el uso de la técnica de raspado fue el hecho que el trabajo en el campo se llevó a cabo en conjunto con otra investigación sobre manatíes. Debido a esto el tiempo y el esfuerzo dedicado al raspado de piel de manatí y a la colección de muestras se acortó drásticamente. Sin embargo, tomando en cuenta estos factores, no se puede afirmar que se hubiera logrado la obtención de una cantidad de muestras suficientes para concluir que la aplicación de este método es factible. Lograr el acercamiento y seguimiento de manatíes es muy delicado, y por lo tanto, es difícil hacer conclusiones sobre la técnica utilizando únicamente esta experiencia de campo.

2. Colección de tejidos de animales varados encontrados muertos. En total se obtuvieron 7 muestras de tejido de manatíes varados: 5 muestras de Bocas del Polochic y 2 muestras de la zona costera (Puerto Barrios y Punta de Manabique). Cinco de las muestras eran de manatíes muertos encontrados entre los años 2007-2009, otra muestra era de una cría de manatí difunta en el 2008 y exhumada en el 2010, y otra muestra era de carne que fue confiscada en el año 2010. La mayoría de las muestras se encontraban en la oficina del Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP) en la ciudad de Guatemala. Su obtención requirió la solicitud de dichas muestras a la persona encargada del departamento de Protección de Vida Silvestre.

La falta de control en la preservación, el almacenamiento y el manejo de las muestras fue un factor limitante para su análisis. Por ejemplo, todas las muestras colectadas, a excepción de la muestra de la cría de manatí, fueron congeladas a -20° C durante aproximadamente 2 años; sin embargo, la preservación criogénica es un método

de almacenamiento de mediano plazo y no de largo plazo (Zoltan 2010). Además, la mayoría de muestras almacenadas en CONAP no estaban rotuladas. Se le preguntó al encargado acerca del origen de cada muestra, pero no fue certero.

3. Colección de heces. El mayor número de muestras se obtuvo a través de la colección de heces. Este método es relativamente fácil de implementar, pero es importante hacer notar que la detección y la recolección de heces de manatíes requieren de ciertos factores ambientales que optimizan la cantidad de muestras colectadas. El número de heces colectadas en la Bahía La Graciosa fue de 13.5 veces más que en Bocas del Polochic. Es posible que el bajo número de heces encontradas en Bocas del Polochic se deba a la alta densidad de vegetación, porque las heces pueden quedar atrapadas entre las plantas haciendo imposible que salgan a la superficie (Muschett *et al.* 2009). Además, las heces que se encontraron en Bocas del Polochic tenían un color y apariencia muy distinta a las encontradas en la Bahía La Graciosa. En Bocas del Polochic las heces eran más pequeñas, se disociaban rápidamente, y el color era más oscuro, esto posiblemente es atribuible al cambio de dieta con los manatíes de la zona costera.

En la Bahía La Graciosa se encontraron, en promedio entre 1-2 muestras fecales por día de campo, con un máximo de cinco muestras por día. Las heces se encontraron con más frecuencia entre 10:00 a.m. y 3:00 p.m., y particularmente en los “choques de agua”. Los choques de agua es el nombre coloquial dado a las concentraciones de artefactos flotando sobre la superficie del agua, normalmente compuestas de detritos oceánicos, algas marinas, semillas de manglares etc. Esta acumulación de distintos componentes en “los choques de agua” actuó como una fuente de contaminación para las muestras de heces, además muchas muestras de heces se encontraron juntas. Hubo aproximadamente 5 instantes en donde 2 muestras se encontraron a menos de 10 metros de separación. Por otro lado, las heces también se encontraron en las orillas de los humedales.

C. Evaluación de métodos de laboratorio utilizados para el análisis de la diversidad genética del manatí

La fase de laboratorio se dividió en tres etapas: la extracción de ADN, el análisis de ADN mitocondrial y el análisis de diversidad genética por medio del uso de microsatélites. La evaluación de los métodos de laboratorio se basó en los resultados generados en las tres etapas ya que esto determinó el potencial de uso de cada tipo de muestra y la maximización de la información generada acerca de la dinámica poblacional y genética del manatí. Estos resultados fueron generados al aplicar una serie de pruebas ejecutadas en cada etapa con la intención de determinar el procedimiento que genera mejores resultados. En otras palabras cada etapa fue sujeta a prueba y error; en el caso de la extracción de ADN, se evaluó el protocolo de extracción y los marcadores de PCR fueron evaluados en el análisis de ADN mitocondrial y en el análisis de microsatélites.

1. Extracción de ADN. Esta fase generó mucho esfuerzo de desarrollo debido que la calidad de las muestras en general fue baja y por lo tanto el protocolo de extracción tuvo que ser maximizado en ambos casos. Esta fase fue desarrollada utilizando muchos factores para ayudar en la toma de decisiones. En general los factores que fueron evaluados son: calidad de ADN y amplificación de ADN mitocondrial (L15926 y H16498, L y H), calidad de extracción (concentración y pureza), el tiempo de ejecución y precio para ejecutar cada protocolo de extracción. Para analizar las muestras de tejido se utilizó un protocolo estándar, fenol: cloroformo, y otro a base de sílice orgánico. Las muestras fecales fueron procesadas usando el protocolo Marrero (2009) y Zhang (2006).

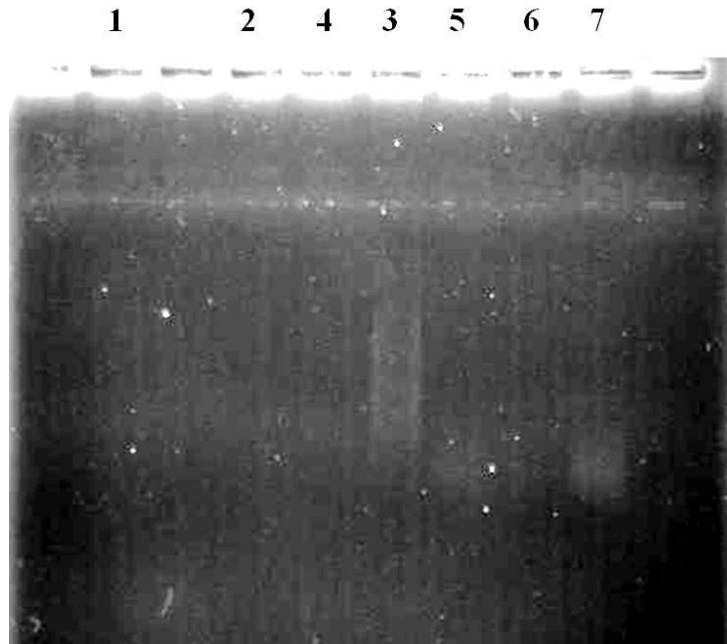
a. Muestras de tejido.

1) Amplificación de ADN mitocondrial y calidad de ADN. Se extrajo y se analizó 7 muestras de tejido de manatí en el laboratorio de biología molecular de la Universidad del Valle de Guatemala. Estas muestras fueron extraídas usando el protocolo de fenol: cloroformo (Ausebel *et al.* 1989) y el de sílice orgánico (Höss y Pääbo 1993). En cuanto al éxito de amplificación de los dos protocolos, una muestra amplificó para el marcador

L15926 y H16498. Esta muestra fue extraída utilizando el protocolo de sílice; y en cuanto al protocolo fenol: cloroformo no se obtuvo una amplificación usando este marcador.

La calidad de ADN en las muestras de tejido fue baja (Figura 6). Esto explicó la dificultad para obtener bandas amplificadas utilizando el marcador L y H. La degradación dificulta el análisis de PCR porque el genoma se fragmenta, bajando así las probabilidades para que los cebadores se unan y amplifiquen el segmento deseado (A. Ávalos com. pers). Al observar la degradación en las muestras, se enfocó esfuerzos en optimizar la concentración y pureza del protocolo de extracción; con el propósito de que la reacción no se inhibiera. La figura 7 describe las concentraciones y purezas obtenidas en cada protocolo.

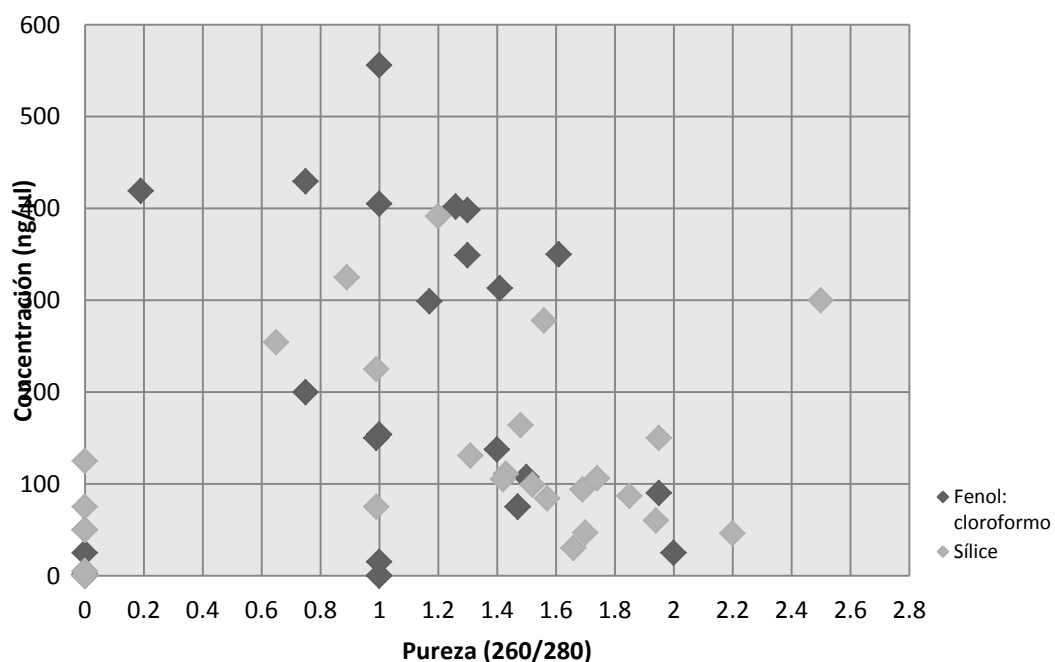
Figura 6: Integridad de muestras de tejido de manatí. En la figura se puede observar que estas muestras no tienen un alto contenido de ADN y además está degradado. El nivel de degradación se determina al ver que la mayor concentración de ADN se deposita al fondo de cada pozo.



2.) Calidad de extracción. En total se ejecutó 33 extracciones utilizando el protocolo de sílice y 29 extracciones con el protocolo de fenol: cloroformo. Se asumió que la pureza y la concentración son independientes de la condición de cada muestra y son solamente afectadas por el protocolo de extracción. Bajo estos términos, se puede decir que el protocolo de sílice es más efectivo en cuanto a la pureza de ADN. Este protocolo produce extracciones más cercanas a 1.8; la mayoría de las muestras se concentran entre el intervalo de 1.4 a 2, en cambio el protocolo de fenol: cloroformo produce extracciones con índices más bajos, entre 1 a 1.6 (Figura 7).

Con respecto a la concentración, el protocolo de sílice produce muestras con menos ADN, entre ~20-200 ng/μl. En cambio, el protocolo de fenol: cloroformo reportó concentraciones entre ~300-550 ng/μl, sin embargo esta tendencia no es tan clara ya que también produjo muestras con concentraciones mucho más bajas. No obstante, el protocolo de fenol: cloroformo tiene la capacidad de producir concentraciones más altas, que es más importante que la pureza porque permite ejecutar más análisis de PCR, siempre y cuando se logre una amplificación.

Figura 7: Gráfica de dispersión de extracciones de tejido de manatí utilizando el protocolo estándar de fenol: cloroformo y un protocolo a base de sílice.



3) Tiempo de ejecución y costo. Otros factores que influyen en la evaluación de un protocolo de extracción son: el costo y el tiempo de ejecución. El costo de extracción de cada muestra utilizando el protocolo de fenol: cloroformo es de Q 9.59 y el costo aproximado del protocolo de sílice es de Q31.61 (Apéndice E). Además, el reactivo Guanidinio tiocianato, que es fundamental para el protocolo de sílice, no es de fácil adquisición y su uso requiere de mucho cuidado. El reactivo de sílice tampoco es de fácil adquisición en un laboratorio básico de genética. Por lo tanto el protocolo de fenol: cloroformo es menos costoso y más accesible.

El tiempo requerido para ejecutar el protocolo de fenol: cloroformo es mucho más que para el protocolo de sílice, ~ 12 horas de diferencia. El tiempo de esfuerzo requerido para el protocolo de fenol: cloroformo es más que el doble del requerido para el protocolo de sílice. Sin embargo, la diferencia en tiempo es debido a los tiempos de espera entre reacciones. La diferencia es cerca de 10 horas más pero incluye el tiempo necesario para que la proteinasa K digiera las muestras de tejido y una fase posterior para precipitar el ADN con isopropanol.

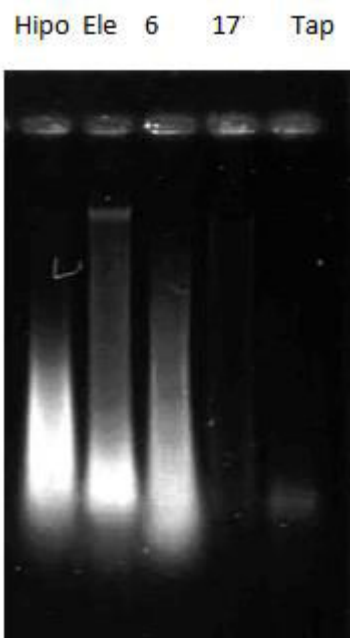
b. Muestras fecales.

1.) Amplificación de ADN mitocondrial y calidad de ADN. Se procesaron un total de 29 muestras fecales encontradas en la costa atlántica de Guatemala. Las extracciones genéticas utilizando los protocolos de Zhang (2006) y Marrero (2009) fueron insatisfactorias para todas las muestras usando PCR con el marcador mitocondrial L15926 y H16498 (L y H). Ninguno de los dos protocolos produjo índices de pureza cerca de 1.8; lo que implica que este factor debía ser mejorado para generar resultados positivos. Las muestras fecales presentan una gran cantidad de inhibidores, por esta razón el índice de pureza debe ser maximizado. La integridad de ADN en las extracciones también fue evaluada. Esta fue evaluada junto con muestras fecales frescas de otros animales silvestres (colectadas ese mismo día en el zoológico) (Figura 8).

La electroforesis de integridad indica que el ADN en las muestras fecales está degradado; esto se observa en la alta concentración genómica en la parte debajo de cada pozo. Sin embargo, aún se puede observar que hay una alta cantidad de ADN de alto peso molecular, especialmente en las muestras Ele y 17 BG. También se puede apreciar que la

integridad de las muestras de manatí (preservadas) es similar a la integridad de las muestras colectadas ese mismo día. Esto nos confirma que es posible utilizar estas muestras de manatí para realizar un análisis de PCR, sin embargo no amplificó debido a los bajos índices de pureza reportados.

Figura 8: Integridad de extracciones fecales de animales de zoológico y muestras de manatí. El pozo Hipo pertenece a una muestra de un hipopótamo del zoológico, Ele pertenece a una muestra de un elefante y Tap de un tapir; las muestras 6 BG y 17 BH son muestras de manatí colectadas durante el estudio.

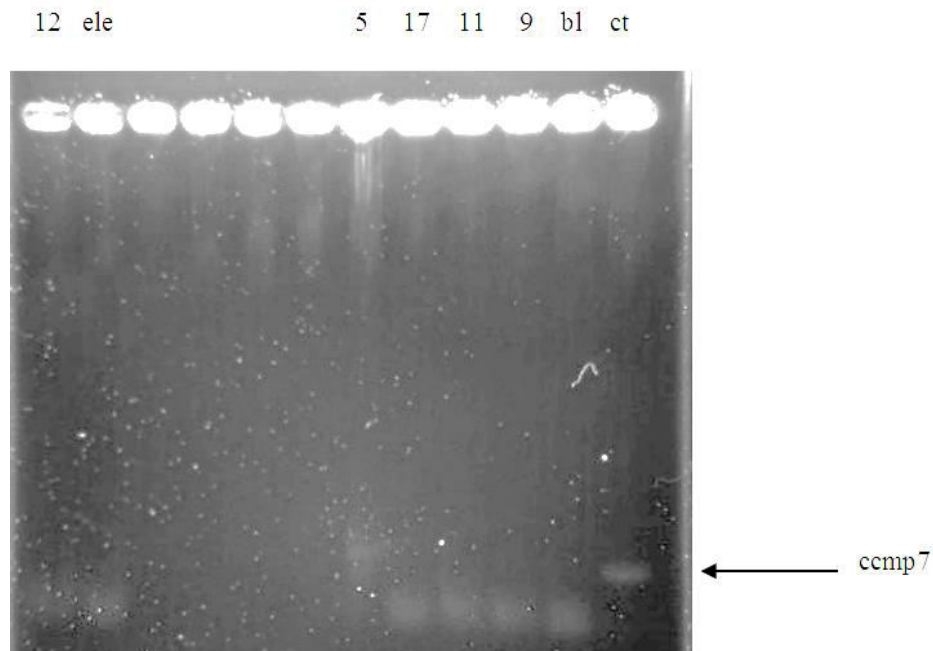


Para confirmar que estas extracciones tienen inhibidores de PCR, se llevó a cabo un análisis usando un marcador que detecta cloroplastos (ccmp7) (Figura 9). Se aplicó este marcador asumiendo que una gran cantidad del ADN extraído proviene de plantas, ya que los manatíes son herbívoros. Este marcador amplifica un segmento más pequeño que L y H (~100 bp) y por lo tanto se asumió que PCR positivo es más factible.

Se obtuvo una amplificación en la muestra 5 confirmando así que hay ADN de plantas en las extracciones. Sin embargo el hecho que sólo una muestra amplificó confirma que las extracciones están inhibidas. La muestra 5 se extrajo usando el protocolo

de Marrero (2009), efectivamente, este protocolo reporta mejores purezas. Para mejorar el grado de pureza en las extracciones, se desarrolló un protocolo en el laboratorio. Este protocolo se discutirá más adelante; a continuación se evaluarán ambos protocolos de extracción, Zhang (2006) y Marrero (2009).

Figura 9: Productos amplificados de 3 muestras en geles de agarosa al 2%, utilizando el protocolo de extracción de Zhang (2006) (ele, 11 y 17) y 3 muestras utilizando el protocolo de Marrero (2009) (12, 5, 9), blanco (bl) y control positivo (ct).



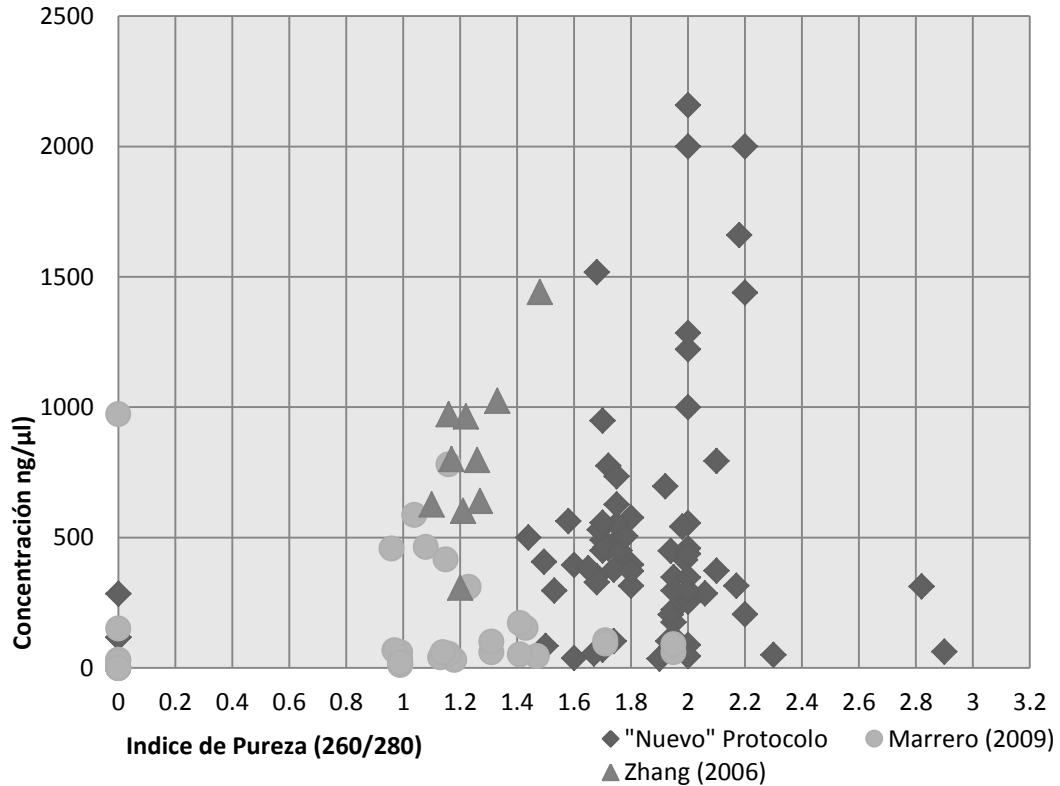
2.) Tiempo de ejecución y costo. Para evaluar las ventajas y desventajas de los protocolos de Zhang (2006) y Marrero (2009), se analizaron las diferencias en costo y tiempo. El procesamiento de una muestra fecal usando el protocolo de Zhang (2006) requirió una inversión de Q 12.36; por el otro lado, el precio por muestra usando el protocolo de Marrero (2009) fue de Q 6.89 (Apéndice E). El protocolo de Marrero (2009) es más barato y requiere menos tiempo de ejecución.

El protocolo Marrero (2009) requiere cerca de 4 veces menos tiempo que el protocolo de Zhang (2006), sin embargo ambos protocolos pueden ser procesados en un día. El protocolo de Zhang (2006) conlleva más tiempo de incubación (6 horas) que tiempo de trabajo (2.5 horas). Además, las probabilidades de contaminación usando el protocolo Marrero (2009) son menores porque las heces no se manipulan directamente ya que solamente se moja un papel filtro en el medio de preservación (etanol al 95%); este papel filtro es el que se maneja durante la extracción. A pesar de todas estas ventajas el rendimiento del protocolo Marrero (2009) con respecto al de Zhang (2006) es más bajo (Figura 10).

3.) Calidad de extracción y “nuevo” protocolo de extracción. Para incrementar la pureza de las extracciones se adaptó un “nuevo” protocolo que combinó pasos de los dos protocolos anteriormente mencionados. Esto se hizo asumiendo que al incrementar los pasos de extracción se elimina más inhibidores de PCR de las muestras colectadas. El nuevo protocolo se ejecutó de acuerdo al protocolo de Zhang (2006) desde el principio hasta la segunda purificación con fenol: cloroformo. Después de esta purificación, en lugar de resuspender el sobrenadante en isopropanol a -20° C, se aplicó el protocolo Marrero (2009). Esto se hizo transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo junto con 800 μ l de solución de extracción. Luego de esto se colocó 40 μ l de suspensión de sílice y se dejó en reposo durante una hora. Después se realizaron múltiples lavados y el ADN se resuspendió en 100 μ l de TE (Apéndice D).

Se puede apreciar el incremento en el índice de pureza logrado a través de la implementación del “nuevo” protocolo de extracción, que reporta datos entre 1.6 a 2.0. Ambos protocolos, Marrero (2009) y Zhang (2006) reportan índices de pureza entre 1 a 1.4, que no es suficiente para lograr resultados positivos en la reacción de PCR (Figura 10). La concentración reportada por el “nuevo” protocolo es más alta a la concentración que produce el protocolo de Marrero (2009) y parecida a la que produce el protocolo de Zhang (2006). Esto es muy importante porque indica que la cantidad de inhibidores presente en las muestras fecales baja de forma drástica y a la vez, la concentración no es perjudicada por las modificaciones hechas

Figura 10: Cambio en el rendimiento en términos de concentración y pureza en la extracción de ADN utilizando el protocolo Zhang (2006), Marrero (2009) y el “nuevo” protocolo.



En resumen, el protocolo de Marrero (2009) es más eficiente en términos de tiempo de ejecución, representa menos probabilidades de contaminación y es menos costoso que el protocolo de Zhang (2006). No obstante, el protocolo de Zhang (2006) reporta mayores concentraciones. Ninguno de los dos protocolos aseguran resultados positivos de PCR. El “nuevo” protocolo representa más gastos y más consumo de tiempo ya que contiene la mayoría de reactivos y pasos en los Zhang (2006) y Marrero (2009), pero reporta purezas cerca de 1.8 que asegura una amplificación de PCR.

2. Amplificación de ADN mitocondrial. La amplificación satisfactoria de 6 de las 7 muestras de tejido utilizando los marcadores CR-4 y CR-5 comprobó que estos son más específicos que los otros (L15926 y H16498) para las muestras del manatí (Figura 11).

Además, los marcadores CR-4 y CR-5 están diseñados para amplificar segmentos más cortos haciendo que la amplificación sea más viable cuando el ADN está degradado. Al aplicar una reacción de PCR en 3 muestras fecales de extractos de ADN derivados del “nuevo” protocolo, las 3 produjeron una banda intensa pero también generaron bandas inespecíficas posiblemente derivadas de la presencia de ADN de otros organismos. Este problema fue resuelto al subir la temperatura de alineamiento hasta 54° C (Figura 12).

Figura 11: Los productos amplificados con el marcador de ADN mitocondrial CR-4 y CR-5 (Southern *et al.* 1988). Las muestras de tejido colectados de manatíes incluyen: 5 animales varados entre 2007 y 2009 (muestras 2, 3, 5, 6 y 7), una muestra de carne confiscada en el 2010 (1), y una muestra de cría de manatí difunta en 2008 (4). El carril BI corresponde al blanco y el C- corresponde al control negativo, que es una muestra de tejido humano.

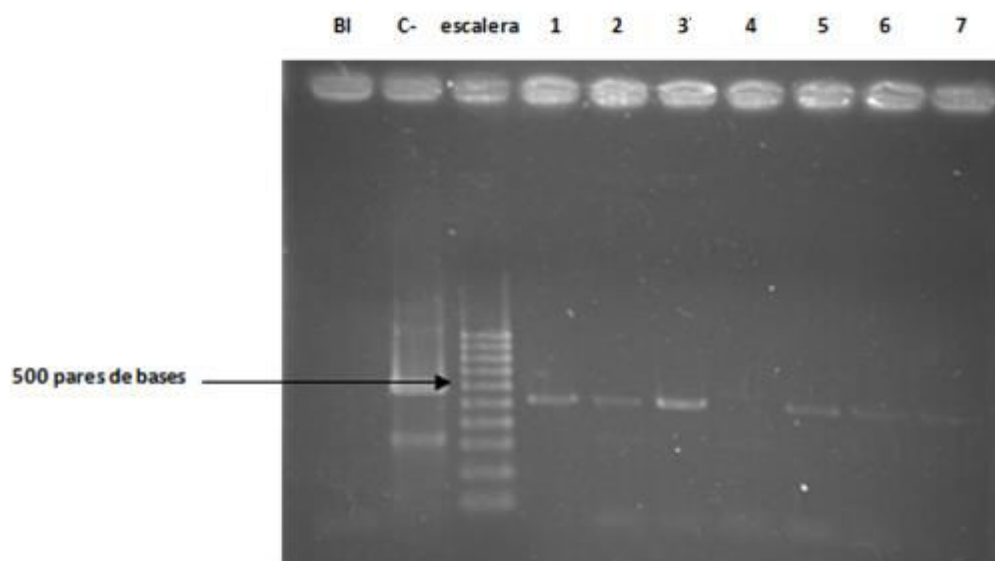
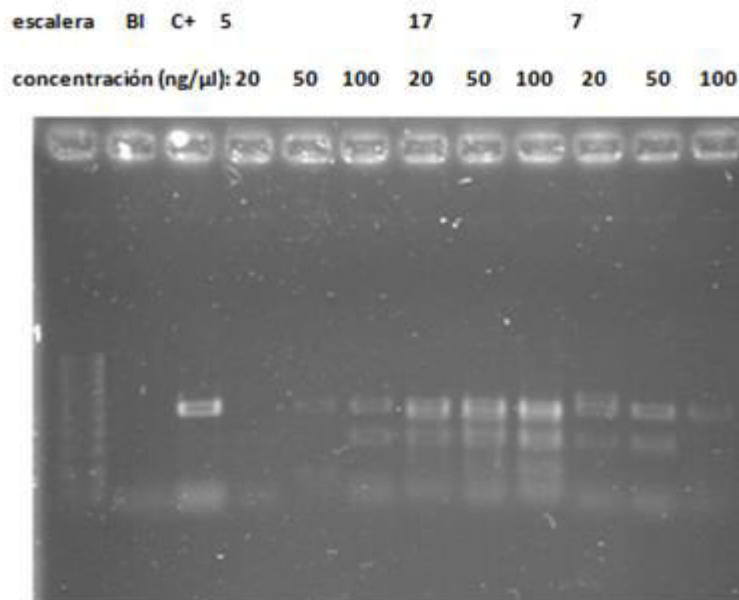


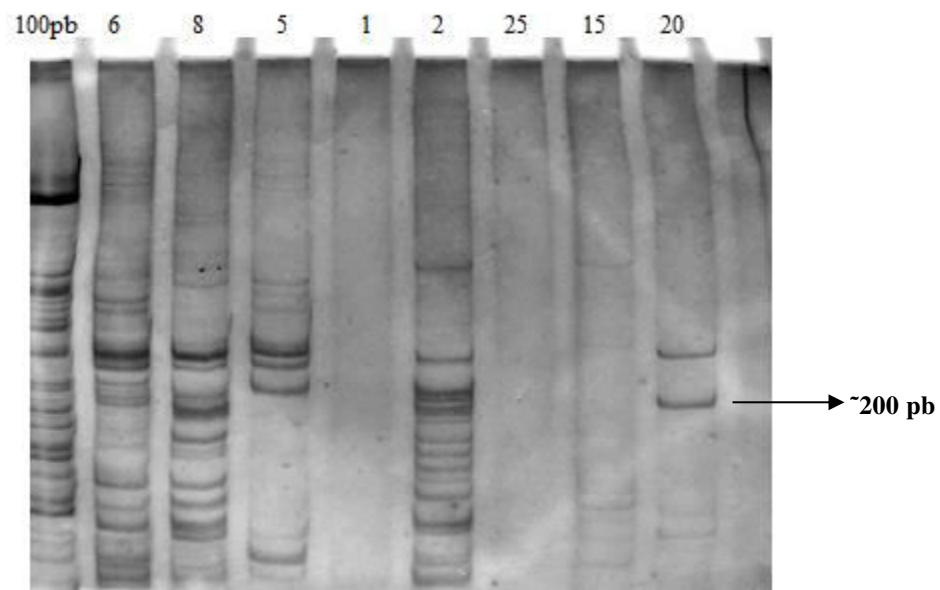
Figura 12: Los productos amplificados de muestras de heces con el uso del marcador CR-4 y CR-5 que muestran la falta de especificidad generada en las muestras. La falta de especificidad es generada en las tres muestras y no es dependiente de la concentración ya que cada una de las tres muestras presenta resultados distintos a concentraciones de 20 ng/ μ l, 50 ng/ μ l y 100 ng/ μ l. Esto podría indicar que este fenómeno es dependiente de la presencia de ADN de otros organismos en las extracciones. Esta falta de especificidad fue resuelto al subir la temperatura de alineamiento hasta 54° C (como antes mencionado). El carril de la escalera corresponde a 100 pb, el carril BI es el blanco, el C+ corresponde al control positivo que es tejido de manatí y los carriles de 5, 17 y 7 son amplificaciones de muestras de heces colectadas en la Bahía La Graciosa.



3. Análisis de microsatélites. El proceso de estandarización dirigido específicamente hacia las muestras de heces tuvo que ser iniciado debido a la inaplicabilidad de las condiciones estándar previamente establecidas con tejido. La diferencia más influyente entre la amplificación de las muestras de tejido y de heces fue que las muestras fecales estaban bastante degradadas, por esta razón el marcador TmaH13 y FWC03 no amplificó. En el caso del marcador Tma K01, la mayoría de las muestras sí amplificaron pero el grado de fragmentación era evidente. Esto hizo imposible la obtención de una amplificación

específica para el fragmento deseado y por lo tanto el análisis de las muestras utilizando geles de poliacrilamida no produjo resultados analizables con respecto a la diversidad genética del manatí.

Figura 13: Gel de poliacrilamida mostrando la amplificación de bandas inespecíficas al aplicar el microsatélite K01 en extracciones de muestras de heces. Esta figura demuestra la falta de especificidad y el alto nivel de fragmentación existente en las muestras de heces. La banda deseada tiene un peso de aproximadamente 200 pb.



IV. DISCUSIÓN

En los últimos años distintos estudios sobre la genética del manatí han dado a conocer la estructura poblacional de la especie (García-Rodríguez *et al.* 1998, Vianna *et al.* 2006, Kellogg 2008, Muschett *et al.* 2009, Hunter *et al.* 2010a, Nourisson *et al.* 2011). Varios de dichos estudios se han llevado a cabo en países cercanos a Guatemala (Panamá: Muschett *et al.* 2009, Belice: Hunter *et al.* 2010a y México: Nourisson *et al.* 2011) y han recomendado fuertemente la evaluación genética de todos los países de la región para formular mejores planes de conservación y desarrollar esfuerzos en conjunto. El presente estudio ayudó a llenar un importante vacío de información así como a estandarizar métodos para estudios genéticos aplicados a Centro América, acelerando así los planes de recuperación de la especie.

A. Filogeografía y diversidad del *Trichechus manatus manatus* en Guatemala

1. Análisis de ADN mitocondrial. El bajo número de muestras secuenciadas (12 individuos) limitó las conclusiones acerca de la estructura poblacional del manatí antillano en Guatemala. Sin embargo, es posible hacer algunas afirmaciones sobre la composición poblacional de la especie en el país. En Guatemala, los manatíes tienen haplotipos de por lo menos 2 poblaciones distintas, Cluster I y Cluster II (Vianna *et al.* 2006). Sin embargo, debido a que el tamaño de muestra es pequeño, estos resultados no representan toda la diversidad que puede estar presente en Guatemala.

La presencia de los haplotipos J1, A3 y A4 confirma que los manatíes en Guatemala tienen una genealogía común con el resto de la población mesoamericana. El haplotipo J1 se ha reportado desde las costas de México hasta Guyana, por lo que tiene un rango bastante amplio y característico de la región. Además, este es uno de los haplotipos de mayor ocurrencia en la población beliceña, ya que conforma el 40% de la población muestreada genéticamente en este lugar. Belice también tiene un alto porcentaje del haplotipo A3 y hasta ahora solamente se había encontrado en ese país. Por el otro lado el haplotipo A4 se ha reportado en México y Belice. La colonización de estos haplotipos en

aguas guatemaltecas se pudo haber dado por migración entre las costas mesoamericanas. Esto concuerda con el comportamiento del manatí, no migra largas distancias sino que por lugares poco hondos (Vianna *et al.* 2006).

La detección del haplotipo A1 en 4 de las 12 secuencias analizadas indica que la población guatemalteca es sitio de dispersión del linaje ancestral norte-americano, Cluster I. Este haplotipo es el único reportado para la población de la Florida y es de amplia distribución en las Antillas mayores como Puerto Rico y República Dominicana (Vianna *et al.* 2006 & Kellogg 2008), y también se ha reportado en México (Nourisson *et al.* 2011). A diferencia de los otros haplotipos, la colonización del haplotipo A1 pudo haber sido debido a la migración de larga distancia. Sin embargo, esto no concuerda con el comportamiento de migración del manatí; por lo tanto, este hecho puede ser atribuible a eventos estocásticos.

El análisis mitocondrial de la población beliceña del manatí no reportó la presencia del haplotipo A1 (Hunter *et al.* 2010a). Además, la población de Belice y la subespecie de la Florida parecen no estar relacionadas, lo cual apoya la clasificación tradicional de la especie, *Trichechus manatus* en *T. m. manatus* y *T. m. latirostris* (Hunter *et al.* 2010a). En México, específicamente en el Golfo de México, se ha detectado una mínima cantidad de migrantes de haplotipo A1, posiblemente de la Florida (Nourisson *et al.* 2011). De igual forma en la Florida se ha encontrado a dos manatíes que comparten un alto porcentaje de ascendencia (45 y 60%) con individuos del Golfo de México (Nourisson *et al.* 2011). Por lo tanto, podría existir una migración entre estos dos países. Otra explicación de este fenómeno es que los migrantes provinieron de Cuba y el movimiento ocurre en las grandes corrientes que existen entre México y Florida que pasan por Cuba. Otra alternativa es que huracanes y tormentas alteran las corrientes de la costa y sacan a los manatíes de sus hábitats, obligándolos a migrar (Nourisson *et al.* 2011).

La presencia del haplotipo A1 en Guatemala de igual forma puede ser debido a la migración por corrientes provenientes de la Florida, México y/o Cuba. Por otra parte, podría ser que este haplotipo evolucionó en una población de manatíes antes de colonizar la Florida, y por lo tanto, pudo haber colonizado Guatemala. De acuerdo a la historia biogeográfica reportada de manatíes en la Florida, esta población pasó por un efecto fundador; fue colonizada por unos pocos individuos de latitudes menores que migraron

durante el último período de glaciación (Vianna *et al.* 2006). Durante este período, el nivel del océano era aproximadamente 100 metros más bajo de lo que es ahora, y por lo tanto algunas áreas que presentemente se encuentran bajo de agua, actuaron como barreras naturales a la dispersión del manatí. Tomando esto en cuenta, cuándo los manatíes con haplotipo A1 se dispersaron hacia el norte, pudieron haberse atrapado en el Lago de Izabal creando una población aislada. Cuando el nivel de agua subió, estos manatíes pudieron migrar hacia la costa Atlántica de Guatemala. De esta forma se explicaría la presencia del haplotipo A1 en La Bahía la Graciosa. Esto, además, puede dar evidencia de por lo menos una migración ocasional entre el Lago de Izabal y la costa Atlántica de Guatemala; sin embargo para confirmar esto es necesario detectar la presencia del haplotipo A1 en el Lago de Izabal.

La presencia del Cluster I y Cluster II le da un carácter bimodal a la población de Guatemala, ya que comprende una mezcla de dos linajes distintos: 1) el linaje de la Florida, México, Grandes Antillas, Centro América y la Costa Caribeña de Sur América, y 2) el linaje que corresponde a México, Centro América, y la costa Caribeña de Sur América (Vianna *et al.* 2006). De acuerdo a los análisis filogeográfico del manatí de las Indias Occidentales, el parentesco entre las poblaciones de la Florida, México y Belice es muy limitado (Hunter *et al.* 2010a). De esta forma se señala la importancia de que los esfuerzos de manejo y conservación del manatí sean a nivel de país. Este estudio apoya la noción de que los planes de conservación de los manatíes serían óptimos si se diseñan específicamente para la población guatemalteca.

B. Desempeño del estudio de diversidad genética del manatí en Guatemala

La implementación de estudios de genética requiere de expertos, apoyo financiero e institucional apropiada para poder desarrollarlos efectivamente (Muschett *et al.* 2009). Además, estos estudios requieren de un tamaño de muestra bastante grande (ej. Hunter *et al.* 2010a). El método de colección normalmente es de forma *ad libitum* o durante programas de captura que están bien desarrollados. Lamentablemente, Guatemala no cuenta con un programa de este tipo o existe algún avance guiado hacía el desarrollo del mismo

para la conservación del manatí. Por el momento la disponibilidad de recursos es muy escasa. También, es importante enfatizar que cualquier programa de captura científica debería incluir un componente educativo para informar a la población de los objetivos del programa. Esto se debe a que la captura ilegal de manatíes con fines de caza sigue siendo un problema en el país (Herrera *et al.* 2004).

El presente estudio utilizó métodos de muestreo no invasivos o mínimamente invasivos para coleccionar muestras genéticas. Estos métodos evitan efectos negativos a la población de manatíes y evita los problemas de logística de los programas de captura (Clevenger & Sawaya 2010). Los métodos no invasivos son recomendados en situaciones en donde la captura del animal es inconcebible, como en el caso de poblaciones pequeñas en peligro de extinción, y en casos donde el comportamiento del animal es muy elusivo (Taberlet *et al.* 1999). Estas dos características representan a la población del manatí en Guatemala lo que hace viable emplear un método de este tipo para realizar estudios de genética. Más adelante se discutirá la factibilidad de cada método no invasivo empleado durante el presente estudio para la evaluación genética del manatí.

1. Métodos de colecta

a. Factibilidad del método de raspado de piel. Este método demostró ser técnicamente y económicamente factible porque se logró obtener todos los materiales y los recursos necesarios para poder implementar el aparato de raspado y aplicarlo en Guatemala. El diseño y el protocolo para la toma de muestra hacen que no requiera de mucha inversión económica. Sin embargo, la ejecución del método presentó varias limitaciones debido al comportamiento muy elusivo de los manatíes en Guatemala. A pesar de que se hicieron las adaptaciones teóricas necesarias no se pudieron implementar al 100% en el campo por lo que el uso del método de raspado de piel en Guatemala quedó inconcluso.

Una recomendación a la técnica de acercamiento es mejorar la coordinación entre el portador del raspador y el conductor del cayuco. El seguimiento de los manatíes se lleva a cabo por el conductor; él/ella debe tener una idea sobre la orientación del animal y de qué lado del cayuco es más probable que salga a la superficie. Esta información debe ser comunicada al portador del raspador, él/ella tiene que estar de pie en la punta del cayuco listo para usar el raspador cuando el manatí salga de la superficie. Debido a que los

manatíes en Guatemala han demostrado ser sensibles al sonido, la comunicación debe ser llevada a cabo de forma discreta.

Debido a que la técnica de acercamiento únicamente se ejecutó en Bocas del Polochic es posible que la técnica no se adapte para la zona costera, la Bahía La Graciosa. Las dos zonas son muy distintas una a otra, por ejemplo, la Bahía La Graciosa tiende a ser más profundo que Bocas del Polochic por lo que puede ser más difícil seguir a los manatíes sin perderlos de vista. Otra diferencia es el oleaje, en la Bahía La Graciosa, por ser costero, se producen más olas, lo que dificulta la minimización del sonido, haciendo que el cayuco sea más detectable por el manatí y como consecuencia se sumerja. Sin embargo, esto concuerda con lo reportado por varios estudios de vertebrados, especialmente mamíferos, en donde las técnicas de campo varían mucho con respecto al sitio de estudio (Clevenger & Sawaya 2010).

b. Factibilidad de la colecta de tejidos de animales varados. Los eventos de varamientos proveen una oportunidad para la colección de muestras. Las muestras de tejidos de animales varados son relativamente fáciles de coleccionar en el campo y de utilizar en el laboratorio. Sin embargo, el sistema de colecta de muestras tiene que ser estandarizado. En Guatemala existe un protocolo de respuesta a casos de varamiento de manatí; pero los tejidos se han almacenado de diversas formas y esto no permitió el procesamiento de las pocas muestras existentes. Por el momento, este método de obtención de muestras solamente puede ser utilizado de forma complementaria hasta que los métodos sean totalmente estandarizados.

El potencial de análisis genético ofrecido por este método es sesgado. Muestras colectadas de animales muertos no son necesariamente un reflejo exacto de la diversidad genética actual de la población, sino un reflejo de alelos y diversidad perdida. Sin embargo, se utilizan con frecuencia y aportan a las predicciones de las frecuencias alélicas existentes en la población. Por otro lado, este método de colecta es económicamente factible, lo que también explica su empleo en muchas investigaciones científicas.

c. Factibilidad del método de colección de heces. Este método probó ser el más factible para ser aplicado en aguas guatemaltecas debido a que se reunió un mayor número de muestras colectando heces. En el campo, los recursos y gastos necesarios son mínimos

ya que sólo requiere etanol y material estéril para almacenar la muestra. También es muy operable. La hora óptima para encontrar heces es al medio día, en condiciones de poco oleaje, y directamente después de avistar a un animal. Además, las heces frecuentemente se acumulan en áreas donde hay otros materiales flotando.

Este método ofrece la posibilidad de realizar otros estudios como análisis de dieta, análisis de patógenos, y de toxicología. También la colección de heces representó un ícenorme de información que puede ayudar a tener un mejor entendimiento de la población, su ecología, y sus amenazas. El único limitante fue el bajo porcentaje de éxito de colecta en la zona de Bocas del Polochic. Sin embargo, el haber encontrado muestras implica que se pueden seguir investigando las condiciones que optimizan los hallazgos para aumentar el número de colectas.

Una ventaja de la colección de heces del manatí es que a la hora de ser colectadas y fijadas, éstas casi siempre están frescas, 1-2 días en la zona costera y horas en la zona de lago. Lo más probable es que después de este intervalo, las heces empiezan a hundirse o son ingeridas por algún organismo. Esto es una ventaja porque la edad de la muestra influye tremendamente en la factibilidad de procesamiento en el laboratorio (Zhang *et al.* 2006). El ADN de las heces se degradan rápidamente al estar expuestas al sol (A. Avalos com. pers.).

Existen varias razones que contribuyen al bajo porcentaje de colecta en Bocas del Polochic (Lago de Izabal). La apariencia de las heces entre la zona del lago y la zona de la costa es muy distinto, por lo tanto el hecho que se colectó primero heces en la Bahía La Graciosa sesgó la búsqueda en Bocas del Polochic porque se buscaba material similar al de la costa. Algunas razones de la falta de hallazgos en Bocas del Polochic podría ser la presencia de más biodiversidad en aguas lacustres, posiblemente en este sitio puede que sirvan como fuente de alimento para peces e invertebrados (Muschett *et al.* 2009). También, en Bocas del Polochic las aguas son menos profundas que en la Bahía la Graciosa, además existe más vegetación, y por lo tanto las muestras pueden quedar atrapadas entre las plantas y esto hace que no suban a la superficie (Muschett *et al.* 2009).

Una especie herbácea en donde se podrían quedar atrapadas las heces de manatí es la *Hydrilla verticillata*. Esta especie es invasora y de rápida expansión (Consejo Nacional de Áreas Protegidas & Fundación Defensores de la Naturaleza 2002). En el 2002 se identificó que el 25% del área total del Lago de Izabal es vulnerable a la colonización de

esta especie y se expande con más facilidad en aguas poco profundas, que es una característica del Lago de Izabal (Consejo Nacional de Áreas Protegidas & Fundación Defensores de la Naturaleza 2002). Además, esta especie se caracteriza por su alto dosel (Consejo Nacional de Áreas Protegidas & Fundación Defensores de la Naturaleza 2002) y en Bocas del Polochic grandes alfombras de *Hydrilla verticillata* se pueden observar desde la superficie. Esto, aparte de limitar la penetración de la luz a especies nativas, podría impedir el surgimiento de muestras de heces del manatí a la superficie.

2. Métodos de Laboratorio

a. Extracción de ADN. En general, ha resultado difícil evaluar la calidad de ADN extraído utilizando métodos convencionales (ej. concentración y pureza) (Zhang *et al.* 2006), esto puede ser porque: 1) la cantidad de ADN del animal deseado es muy baja, 2) aunque la concentración esté alta, el ADN puede estar muy degradado y no se puede amplificar y (3) una gran cantidad de ADN puede provenir de microbios. En vista de lo cual, el parámetro más importante para evaluar un método de extracción es la capacidad de generar una banda de amplificación clara y definida. Este parámetro fue utilizado y fue el más importante en este estudio. El marcador empleado para analizar la capacidad del protocolo para generar bandas de amplificación fue, L15926 y H16498, un marcador de la región control D-Loop de ADN mitocondrial. Sin embargo, parámetros como la integridad, concentración y pureza genera información acerca de la muestra y de la eficiencia del protocolo de extracción. Debido que a los protocolos de extracción estuvieron sujetos a cambios, estos factores fueron evaluados durante el estudio.

Todas las limitaciones derivadas de los métodos no invasivos para el análisis genético, resultan de una baja cantidad de ADN, baja calidad o integridad, o baja calidad de la extracción, induciendo así la presencia de inhibidores de PCR (Taberlet *et al.* 1999). En el caso de las muestras de tejido, el mayor problema fue una baja calidad de ADN debido a que las muestras fueron incorrectamente almacenadas antes de su adquisición para el estudio. Para contrarrestar las limitaciones generadas por un ADN muy fragmentado se tuvo que maximizar la concentración y la pureza para generar una condición óptima para la reacción de PCR. Por el otro lado, el mayor problema con las muestras fecales derivó de

una alta presencia de inhibidores de PCR. Por esta razón se desarrolló un protocolo para incrementar los índices de pureza.

1) Evaluación de métodos de extracción genética a partir de muestras de tejidos. El factor determinante al escoger un protocolo de extracción es la capacidad que tiene para generar bandas claras de ADN amplificado. En este caso, el marcador destinado a determinar tal capacidad fue el de ADN mitocondrial, L15926 y H16498 (L y H). Solamente el protocolo de sílice produjo una banda de amplificación en una muestra. Sin embargo, es importante notar que esta muestra era de un grado avanzado de putrefacción (de un cadáver enterrado por ~ 2 años) por lo que no se asegura que la amplificación sea efectivamente ADN de manatí o de algún otro organismo (ej. ADN humano). También, al aplicar otro marcador de ADN mitocondrial (CR-4 y CR-5), varios meses después de las pruebas, a extracciones de fenol: cloroformo, se produjeron bandas en 5 de las 7 muestras. Esto demuestra que el marcador que se utilizó L y H para comparar, analizar y escoger, un protocolo de extracción no era apto, tomando en cuenta la naturaleza de las muestras que demostraron estar muy degradadas.

Debido a la inaplicabilidad del marcador L y H para comparar los resultados de los protocolos de extracción, se tomaron en cuenta otros factores importantes, que son: la calidad de extracción, precio y tiempo de ejecución. Tomando estos factores en cuenta, se determinó que el protocolo de fenol: cloroformo es el más apto para analizar ADN de tejido de manatí en un laboratorio básico de genética. El protocolo de fenol: cloroformo reporta mayores concentraciones que el protocolo de sílice. Esto es importante porque aunque sea más laborioso (mayor tiempo de ejecución), permite hacer más procedimientos de PCR con una sola extracción. También, el costo es menos con el protocolo de fenol: cloroformo, Q22.00 menos por muestra. Los reactivos que se utilizaron para ejecutar el protocolo de sílice, son más difíciles de obtener que los reactivos necesarios para el protocolo de fenol: cloroformo, que es un procedimiento más aplicable y más común. La única ventaja que tiene el protocolo de sílice es que produce extracciones más puras; sin embargo las extracciones con fenol: cloroformo generaron bandas claras con el uso del marcador CR- 4 y CR-5 lo que hace que las purezas producidas por este protocolo sea suficiente para lograr una amplificación.

2) Evaluación de métodos de extracción genética a partir de muestras fecales. En el caso de las muestras fecales, el marcador tampoco fue el apto para evaluar el éxito de amplificación de los dos protocolos, Zhang (2006) y Marrero (2009) ya que no se obtuvieron amplificaciones satisfactorias para las dos. Sin embargo, el mayor problema para el establecimiento del protocolo de extracción fue la presencia de una alta cantidad de inhibidores en la muestra. Por esta razón, la mejor modificación en el procedimiento de extracción fue la aplicación del método de guanidinio tiocianato-sílice a extractos previamente tratados. El pretratamiento elimina una gran cantidad de inhibidores, especialmente al emplear almidón (Zhang *et al.* 2006), y cuando el lisado pasa por la fase de guanidinio tiocianato, este reactivo aglutina las proteínas restantes y el ADN ya en una solución con un alto grado de pureza se une selectivamente a la fase de sílice (Marrero *et al.* 2009). De esta forma la presencia de inhibidores en los extractos se hace casi nula.

Una limitante en la aplicación de este protocolo es el costo y el tiempo de ejecución. El costo es de aproximadamente Q 25.00 por muestra, lo que es más costoso que el protocolo de Zhang (2006) y el protocolo de Marrero (2009). Además, el “Nuevo” protocolo utiliza más guanidinio tiocianato que el protocolo de Marrero (2009), que es un reactivo costoso y es cancerígeno. Otra limitante es el tiempo de ejecución, toma ~17 horas haciendo imposible su procesamiento en un día. Es un protocolo complicado, sin embargo, los resultados son buenos; durante las pruebas 3 de 3 muestras fecales amplificaron con el marcador CR-4 y CR-5.

b. Amplificación de ADN mitocondrial. La sustitución de marcadores de ADN mitocondrial, L15926 y H16498 por CR-4 y CR-5, ayudó de varias formas al avance en el análisis. Los marcadores CR-4 y CR-5 incrementan la posibilidad de amplificar el segmento deseado porque el segmento es de ~ 100 pb menos que L15926 y H16498, por lo tanto, se aumenta las probabilidades de que los cebadores encuentren este segmento. Es más importante mencionar que CR-4 y CR-5 produjo resultados positivos por el hecho de que son más específicos al genoma del manatí. De esta forma la amplificación y posterior análisis de ADN mitocondrial se hizo factible en las muestras de tejido al igual en las muestras de heces.

Una limitante en el empleo de muestras de heces para el análisis genético es la posibilidad de muestrear al mismo animal; sin embargo, al complementar un análisis

mitocondrial con un estudio de microsátélites se produce suficiente información a nivel de individuo y hace posible la detección de muestreos repetidos (Muschett *et al.* 2009). La contaminación es un factor muy influyente en este estudio. En otro estudio de la genética del manatí usando heces como muestra (Muschett *et al.* 2009), casi el 50% estaban contaminados por el humano. En el presente estudio también pudo haber ocurrido este problema ya que se encontraron heces de humano durante algunos muestreos.

El alto grado de contaminación encontrado en las muestras de tejido pudo haberse debido a varios factores y es posible que una mezcla de ellos haya sido la causa. Las fuentes de contaminación para el análisis mitocondrial se dividen en: el manejo dado en el laboratorio, colecta de muestras y almacenamiento de las muestras. Cabe mencionar que al recoger las muestras de tejido en CONAP todas se encontraban juntas y a la par de otro tipo de muestras, incluso de organismos enteros, como un cocodrilo congelado, las muestras tampoco estaban en viales apropiados ya que algunos parecían haberse derramado. Esto pudo haber sido un causante de la contaminación y bajo éxito de desempeño en las muestras de tejido.

c. Análisis de microsátélites. El análisis de microsátélites en muestras de tejido y de heces es factible en un laboratorio básico de genética. El factor determinante de este análisis fue la integridad de las muestras, y en este caso, la falta de integridad imposibilitó la obtención de resultados aceptables para analizar. El alto nivel de fragmentación en las muestras fecales produjo un alto grado de reacción de productos inespecíficos en las reacciones de PCR. Este resultado es un reflejo del tiempo de almacenamiento de las muestras ya que estas estuvieron almacenadas por 10-20 meses a temperatura ambiente. También debe contemplarse el error de genotipo (resultados falsos) que se producen con mayor frecuencia en muestras viejas o mal conservadas (Gardipee 2003, Panasci 2009). Por lo tanto la edad de la muestra fecal afecta significativamente los resultados del análisis de microsátélites debido a que la calidad de ADN baja drásticamente. Por esta razón se recomienda que los análisis se hagan con muestras de heces colectadas recientemente, no más de 2 meses desde su colección. Para optimizar el rendimiento y confiabilidad de los resultados es recomendable que el trabajo de campo se intercale o se lleve simultáneamente con el análisis en el laboratorio.

C. Implicaciones para la conservación

El presente estudio es el primer paso hacia la aplicación de herramientas genéticas para investigar parámetros poblacionales del manatí en Guatemala. El carácter elusivo de la población de manatíes guatemaltecos es probablemente debido a la alta amenaza antropogénica, lo cual disminuye la posibilidad de obtener información a través de observaciones directas. Por esta razón, la aplicación de análisis genéticos ofrece la oportunidad de obtener información valiosa para la conservación de la especie, como el conocimiento de la diversidad genética, estructura y dinámica poblacional. Con esta información se puede hacer inferencias confiables acerca de la estabilidad, los patrones de movimiento, patrones de evolución, y la detección de amenazas (Schwartz *et al.* 2006). Esto es realizable sin tener que invertir en técnicas de campo y sin estorbar el ámbito hogareño de la población (Schwartz *et al.* 2006).

Este estudio hizo posible la detección de 4 haplotipos en la población del manatí de la costa Atlántica de Guatemala. Estos haplotipos evidencian la presencia simultánea y posible mezcla de dos unidades filogeográficamente distintas. Los haplotipos J1, A3 y A4 son representativo de la región de Mesoamérica y el A1 se dispersa desde Norte América hacia las Antillas Caribeñas. En este caso, los planes de manejo debe atender la distribución de cada linaje ya que son dos unidades potenciales que dan paso a la optimización de la diversidad genética.

Para poder entender la distribución, proporción y el grado de mezcla de cada linaje se tendrían que hacer los estudios correspondientes, un análisis de mezcla de linajes y en el mejor de los casos complementarlo con parámetros probabilísticos tomando en cuenta frecuencias alélicas y genotípicas (Schwartz *et al.* 2006). Un ejemplo de esta aplicación es el estudio de la Tortuga boba (*Caretta caretta*) (Reece *et al.* 2006), estas poblaciones llevan a cabo migraciones de larga distancia para el forrajeo; y el sitio de forrajeo depende de factores ambientales, como la temperatura. Un análisis de ADN mitocondrial de la población de juveniles permitió analizar la tasa de reclutamiento de cada población que llega al Lago de Indian River, Florida. Los resultados revelaron que la mayoría de los juveniles regresan a sus sitios natales; esta fidelidad a sus respectivos hábitats está directamente relacionada con el tamaño del grupo de reclutamiento y la distancia. De esta

forma, estos análisis ayudan a entender la dinámica poblacional de la especie, los efectos de la contaminación, las enfermedades y los desastres naturales (Reece *et al.* 2006).

El inicio en el estudio de la diversidad genética del manatí en Guatemala abre la puerta a muchas oportunidades, entre ellas la posibilidad de establecer un programa de monitoreo genético de la población. Las condiciones del país, en cuanto a las posibilidades económicas, problemas sociales y falta de personal entrenado representa un sitio en donde se aprovecharía todas las ventajas que ofrece esta herramienta. La implementación de un análisis de diversidad genética periódica reduciría drásticamente los costos a comparación de la implementación de programas de remarcaje o radiotelemetría (Schwartz *et al.* 2006). Aunque estos programas también representan otras ventajas e información *in situ* de los animales, en Guatemala aún no existe personal entrenado para el manejo y trato adecuado a los manatíes.

Muchas de las técnicas moleculares y modelos estadísticos utilizados para llevar a cabo un monitoreo genético son relativamente nuevos, sin embargo son altamente prometedores. En el caso del manatí, siendo una especie rara, la aplicación de esta técnica podría dar una estimación acerca de los índices de abundancia en el país. La aplicación de técnicas genéticas para el análisis de abundancia ha probado ser relativamente barato (Schwartz *et al.* 2006), por lo que se podría combinar con el monitoreo de avistamientos aéreos, que ya están establecidos en el país.

Otro objetivo potencial en la aplicación de técnica moleculares es el de establecer rangos geográficos para después detectar cualquier cambio. De esta forma se detectaría los efectos al flujo genético causado por factores antropogénicos. Estos factores, como la caza ilegal y la contaminación ambiental amenazan cada día más la sobrevivencia y crecimiento natural de la población de esta especie emblemática. La conservación de la genética del manatí optimiza la sobrevivencia de esta especie que merece seguir existiendo en este planeta y ejercer su rol ambiental para estabilizar y mejorar el ecosistema y también para reivindicar el amor a la vida.

V. CONCLUSIONES

1. El presente estudio aporta a la “Estrategia nacional para la conservación del manatí y su hábitat” al generar información acerca de la diversidad genética del manatí en Guatemala, lo que, al mismo tiempo, ayuda a resolver preguntas generadas en la estrategia sobre rutas de migración del manatí en la región de Izabal.
2. El método de raspado de piel para la obtención de muestras de tejido del manatí (*Trichechus manatus*) es económicamente factible en Guatemala; sin embargo, la aplicación de métodos en el campo requiere el acercamiento exitoso de manatíes.
3. El método de colección de heces para el análisis genético probó ser efectivo para el estudio de ADN mitocondrial del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) en Guatemala, utilizando los marcadores CR-4 y CR-5.
4. El análisis genético efectivo utilizando tejidos de manatíes varados requiere protocolos estandarización para la toma, preservación y almacenamiento de muestras. Esto debe ser desarrollado en Guatemala para poder generar más investigación sobre la especie.
5. El protocolo de fenol: cloroformo para la extracción de ADN es efectivo para el análisis de tejido de cadáveres de manatí.
6. La principal limitante para la aplicación de un protocolo de extracción de ADN de heces de manatí es que la presencia de impurezas que inhiben la reacción de PCR debe ser minimizada.
7. Los haplotipos J1, A1, A3 y A4 forman parte de la estructura poblacional del manatí antillano (*Trichechus manatus*) en Guatemala. Esto indica que en el país, hasta el momento, existe una población bimodal de manatíes, ya que alberga una mezcla de dos linajes: (I) el que corresponde a la Florida, México, Grandes Antillas, Centro

América y la costa Caribeña de Sur América y (II) corresponde a México, Centro América y la costa de Sur América.

8. El análisis de diversidad nuclear utilizando marcadores de microsatélites en muestras fecales requiere que éstas sean relativamente frescas. La degradación del material genético con el tiempo no permite el análisis factible de este tipo de muestras.

VI. RECOMENDACIONES

Este estudio identificó cuatro haplotipos de ADN mitocondrial para la población del manatí en Guatemala, estos son: A1, A2, A4 y J1. Estos haplotipos corresponden a una mezcla de dos linajes distintos, (I) corre desde la Florida, México, Grandes Antillas, Centro América y la costa Caribeña de Sur América y (II) corresponde a México, Centro América y la costa de Sur América. Esta característica bimodal de la población de manatíes junto con la presencia del haplotipo A1, que es de rara ocurrencia en la región mesoamericana, hace a esta población interesante para ser estudiada y profundizada. Aun no se sabe el grado y frecuencia de intercambio genético con otras poblaciones o dentro de la misma. Por esta razón, se recomienda que los futuros estudios y planes de conservación se realicen específicamente para el país de Guatemala y así lograr una conservación más efectiva y una mejor comprensión de la dinámica poblacional.

Esta investigación ha generado información muy valiosa para comprender a los manatíes en Guatemala sin embargo, es necesario aumentar el tamaño muestral del análisis de ADN mitocondrial y realizar un análisis de diversidad de microsatélites. Este estudio espera servir como un guía en el diseño de trabajo de campo y de laboratorio para este tipo análisis en Guatemala y otros países con escasos recursos. El estudio del manatí, al igual que el de la mayoría de mamíferos mayores es muy delicado y los factores logísticos y técnicos pueden generar resultados muy distintos en cuanto al gasto y tiempo de estudio. A continuación se detallará las recomendaciones que deben ser consideradas en el trabajo de campo seguido por las consideraciones en el análisis de laboratorio.

En cuanto a la técnica de muestreo, en este estudio se emplearon tres; un raspado de piel, colección de heces y colección de tejidos de animales varados. Entre estas tres técnicas, la más efectiva fue la colección de heces. Se lograron coleccionar más muestras con esta técnica que con cualquier otra y también produjo el mayor éxito de análisis, 55%. Una ventaja de esta técnica es que abre la posibilidad de generar otros estudios, como un análisis de dieta, análisis de patógenos y de toxicología. Entre los limitantes de esta técnica esta el bajo porcentaje de éxito de colecta en la zona del lago, Bocas del Polochic, a comparación de la Bahía la Graciosa, zona costera. No obstante, el haber encontrado muestras implica que se pueden seguir investigando las condiciones que optimizan los hallazgos.

En cuanto a la técnica de raspado; las condiciones en el campo se pueden mejorar, como usar un cayuco, en donde solo vaya el colector de muestras y el conductor. Los tiempos de salida deben consistir cuando el oleaje del lago o mar este bajo, y así pueda ser más fácil acercarse al animal. Es importante mencionar que el comportamiento del manatí es bastante elusivo en aguas guatemaltecas y hace que esta técnica no sea tan adaptable a esta región como en la Florida.

El varamiento de manatíes es un incidente que seguirá ocurriendo mientras el tráfico de lanchas siga creciendo; también, mientras las zonas de paso y de reproducción no se protejan y no se implementen programas de educación y sensibilización. Por lo tanto el plan de varamiento que ya ha sido implementado debe ser utilizado como prioridad para aprovechar la información que pueden generar estos incidentes. Las muestras colectadas durante los varamientos deben ser almacenadas apropiadamente para ser utilizadas en futuros estudios. En este estudio el éxito de análisis fue solamente de un 25% pero comprueba que estas muestras pueden ser perfectamente útiles si la colecta, almacenamiento y procesamiento es el apropiado.

En cuanto al trabajo de laboratorio, para realizar un análisis de ADN mitocondrial con muestras degradadas, como heces, es más efectivo utilizar marcadores que tengan tamaños cortos ya que optimizan la posibilidad de obtener una amplificación de PCR. De acuerdo a este estudio se recomienda utilizar el marcador CR-4 y CR-5 para analizar la población de manatíes, este marcador reportó resultados positivos, tanto en muestras fecales como en muestras de tejido. En cuanto a los métodos utilizados para extraer ADN, el protocolo de fenol: cloroformo es mejor que el protocolo de sílice para analizar muestras de tejido. Primero, este protocolo es menos costoso, cerca de Q 22.00 menos por muestra. También produce extracciones con mayores concentraciones que el protocolo de sílice, lo cual implica que se pueden hacer mas reacciones de PCR con una sola extracción. En cuanto a las muestras de heces, el protocolo propuesto en este estudio, "nuevo" protocolo es recomendable (página 48), ya que los resultados que produce son muy satisfactorios y por lo tanto maximiza el potencial de análisis que pueden generar las muestras fecales. Este estudio generó un análisis de ADN mitocondrial de los manatíes en Guatemala, sin embargo para tener una idea sobre la estabilidad de la población es necesario llevar a cabo un análisis de microsatélites. Realizar tal análisis en muestras de heces es delicado y es una

línea de investigación relativamente nueva. No obstante, existen investigaciones comprehensivas para poder optimizar amplificaciones y mejorar los resultados. Un factor limitante en esta investigación fue la edad de la muestra; la edad de la muestra fecal afecta significativamente los resultados de microsátélites debido a que la calidad de ADN baja drásticamente. Por esta razón se recomienda que los análisis se hagan con muestras de heces colectadas recientemente, la mejor opción es intercalar el análisis de laboratorio con la colecta de muestras. Otra investigación que se podría realizar genéticamente es un análisis de mezcla de linajes, esto ayudaría a comprender como se dispersa y se relaciona cada linaje de manatíes en Guatemala. En el mejor de los casos sería optimo implementar un programa de monitoreo genético del manatí. Los análisis genéticos no solamente reflejan la diversidad sino que puede dar una estimación acerca de los índices de abundancia en el país, y establecer rangos geográficos para poder detectar cualquier cambio futuro que pueda sufrir esta población.

VII. LITERATURA CITADA

- Adams, J. E.; B. T. Kelly & L. P. Waits. 2003. **Using Fecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*)**. *Molecular Ecology* 12(8):2175-2186.
- Allaby, M. 2008. **Dictionary of Earth Sciences**. 3rd ed. Oxford University Press. 654 pp
- Ausubel, F.M.; R. Brent; R.E. Kingston; D.D. Moore; J.G. Seidman & K. Struhl. 1989. **Current protocols in molecular biology**. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Bellemain, E.; J. Swenson; D. Tallmon; S. Brunberg & P. Taberlet. 2005. **Estimating population size from hunter-collected feces: four methods for brown bears**. *Conservation Biology* 19(1):150-161.
- Carney, S. L.; E. E. Bolen; S. L. Barton; K. M. Scolardi; C. C. Englund; M. D. Tringali & J. E. Reynolds III. 2007. **A minimally invasive method of field sampling for genetic analyses of the Florida Manatee (*Trichechus manatus latirostris*)**. *Marine Mammal Science* 23(4):967-975.
- Clevenger, A. P. & M. A. Sawaya. 2010. **Piloting a non-invasive genetic sampling method for evaluating population-level benefits of wildlife crossing structures**. *Ecology and Society* 15(1):7-27.
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas & Fundación Defensores de la Naturaleza. 2002. **Estudio hidrográfico del Lago de Izabal y el Golfete, un enfoque hacia el manejo de *Hydrilla verticillata***. CONAP, Guatemala. 49 pp.
- Constable, J. L.; M. V. Ashley; J. Goodall & A. E. Pusey. 2001. **Noninvasive paternity assignment in Gombale chimpanzees**. *Molecular Ecology*. 10(5):1279-1300

DeSalle, R. & G. Amato. 2004. **The expansion of conservation genetics**. *Nature* 5(9):704-712.

Deutsch, C. J.; J. P. Reid; R. K. Bonde; D. E. Easton; H. I. Kochman & T.J. O'Shea. 2003. **Seasonal movements, migratory behavior, and site fidelity of West Indian manatees along the Atlantic Coast of the United States**. *Wildlife Monographs* 67(151):1-77.

Domning, D. P. 1982. **Evolution of manatees: a speculative history**. *Journal of Paleontology* 56(3):599-619.

El Congreso de la República de Guatemala. 1996. **Ley Declaratoria de Área Protegida de Bocas del Polochic**. Decreto Numero 38-96. En:
[http:// www.ccad.wd/documentos/legislacion/GT/DL-38-96-.pdf](http://www.ccad.wd/documentos/legislacion/GT/DL-38-96-.pdf)

Fundación Defensores de la Naturaleza. 1996. **Ficha informativa sobre humedales Ramsar Bocas del Polochic. Guatemala**. En:
[http:// www.wetlands.org/RSIS/ COP9Directory/ris/6GT003es-part1.pdf](http://www.wetlands.org/RSIS/COP9Directory/ris/6GT003es-part1.pdf)

-----, 2002. **II Plan maestro 2003-2007 Refugio de Vida Silvestre Bocas del Polochic**. Guatemala. 106 pp.

Fundación Mario Dary Rivera FUNDARY; Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP) & The Nature Conservancy TNC. 2006. **Plan de Conservación de Área 2007-2011 Refugio de Vida Silvestre Punta de Manabique**. Guatemala: FUNDARY-PROARCA-TNC.155pp+Anexos.

- Galán-Villagrán, X. G. 2006. **Pastos marinos: composición comunitaria, biomasa de pastos marinos y morfometría de *Thalassia testudinum*, en dos sitios de Bahía La Graciosa, Izabal, Guatemala.** Trabajo de Graduación de Licenciatura Universidad del Valle de Guatemala. 53 pp.
- García-Rodríguez, A. I.; B. W. Bowen; D. P. Domning; A. A. Mignucci-Giannoni; M. Marmontel; R. A. Montoya-Ospina; B. Morales-Vela; M. Rudin; R. K. Bonde & P. M. Mcguire. 1998. **Phylogeny of West Indian manatee (*Trichechus manatus*): how many populations and how many taxa?** *Molecular Ecology* 9(7):1137-1149.
- ; D. Moraga-Amador; W. Farmerie.; P. Mcguire & T. L. King. 2000. **Isolation and characterization of DNA markers in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and their application in selected Sirenian species.** *Molecular Ecology* 9(12):2155-2234
- Gardipee, F. 2007. **Development of fecal DNA sampling methods to assess genetic population structure of greater Yellowstone Bison.** Trabajo de Graduación de Maestría en Ciencia y Biología Silvestre University of Montana. 54 pp.
- Garner, A.; J. L. Rachlow & J. F. Hicks. 2005. **Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations.** *Conservation Biology* 9(4): 1215-1221.
- González-Socoloske, D. 2007. **Status and distribution of Manatees in Honduras and the use of Side-Scan Sonar.** Trabajo de Graduación de Maestría, Escuela de Ciencia y Tecnología Loma Linda University. 91 pp.
- Google. 2012. **Google earth para Windows.** Versión 6. US Department of State Geographer. En: <http://www.google.com/earth/index.html>

- Hamilton, M. B. 2009. **Population Genetics**. Wiley-Blackwell, Oxford. 407 pp.
- Herrera, F.; K. Sandoval & E. Quintana-Rizzo. 2004. **Estrategia Nacional para la Conservación del manatí (*Trichechus manatus manatus*) y su hábitat en Guatemala**. Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Documento técnico No. 13. Guatemala. 67 pp.
- Höss, M. & S. Pääbo. 1993. **DNA extraction from Pleistocene bones by sílice-based purification method**. *Nucleic Acids Research* 21(16): 3913-3914.
- Hillis, D. M.; B. K. Mable; A. Larson; S. K. Davis & E. A. Zimmer. 1996. **Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning**. 336-339 pp. En: Hillis D. M.; Mortiz C. & B. K. Mable. (2nd ed). *Molecular Systematics*. Sinauer, Massachusetts.
- Hunter, M. E; N. E. Auil-Gomez; K. P. Tucker; R. K. Bonde; J. Powell & P. M. McGuire. 2010a. **Low genetic variation and evidence of limited dispersal in the regionally important Belize manatee**. *Animal Conservation* 13(6):592-602.
- ; D. Broderick; J. R. Ovenden; K. P. Tucker; R. K. Bonde; P. M. McGuire; J. M. Lanyon. 2010b. **Characterization of highly informative cross-species microsatellite panels for the Australian dugong (*Dugong dugong*) and Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) including five novel primers**. *Molecular Ecology Resources* 10(2):368-377.
- Janson, T. 1977. **The Ecology and conservation of the Guatemalan manatee**. En: Quintana-Rizzo, E. 1993. **Estimación de la distribución y el tamaño poblacional del manatí *Trichechus manatus* (Trichechidae-Sirenia) en Guatemala**. Trabajo de Graduación de Licenciatura, Departamento de Biología, Universidad de San Carlos, Guatemala. 82 pp.

- Kasamatsu, H.; D.L. Robberson & J. Vinograd. 1971. **A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 68(9):2252-2257.
- Kellogg, M. E. 2008. **Sirenian Conservation genetic and Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) Cytogenetics**. A dissertation presented to the graduate school of the University of Florida. 160 pp.
- Kilpatrick, C.W. 2002. **Noncryogenic preservation of mammalian tissues for DNA extraction: An assessment of storage methods**. Biochemical Genetics 40(1-2):53–62.
- Kocher T. D.; W. K. Thomas; A. Meyer; S. V. Edwards; S. Paabo; F. X. Villablanca & A. C. Wilson. 1989. **Dynamics of Mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved Primers**. Proceedings of the National Academy of Science 86(16):6196-6200.
- Li, Y.; A. Korol; T. Fahim; A. Bailes & E. Nevo. 2002. **Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review**. Molecular Ecology 11(7):2453-2465.
- Marsh, H & L.W. Lefebvre. 1994. **Sirenian status and conservation efforts**. Aquatic Mammals 20(1):155-170.
- McClenaghan, L. R. & T. J. O'Shea. 1988. **Genetic variability in Florida manatee (*Trichechus manatus*)**. Journal of Mammalogy 69(3):481-488.
- Muschett, G.; C. Bonacic & J. A. Vianna. 2009. **A noninvasive sampling method for genetic analyses of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*)**. Marine Mammals Science 25(4):955-963

- Nourisson, C.; B. Morales-Vela; J. Padilla-Saldívar; K. P. Tucker; A. Clark; L. D. Olivera-Gómez; R. Bonde & P. McGuire. 2011. **Evidence of two genetic clusters of manatees with low genetic diversity in Mexico and implications for their conservation.** *Genetica* 139(7):833-842.
- Nowacek, S. M.; R. S. Wells; T. R. Speakman; R. O. Flam & D. P. Nowacek. 2004. **Florida manatees, *Trichechus manatus latirostris*, respond to approaching vessels.** *Biological Conservation* 119(4):517-523.
- O'Brien, S. J. 1994. **A role for molecular genetics in biological conservation.** *Proceedings of the National Academy of Science* 91(13):5748-5755.
- O'Shea, T. J. & C. A. Salisbury. 1991. **Belize-a stronghold for manatees in the Caribbean.** *Oryx* 25(3):156-164.
- Panasci, M. 2009. **An evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success.** Trabajo de Graduación de Maestría Texas Tech University. 59 pp.
- Pause, C.K.; C. Nourisson; A. Clark; M. E. Kellogg; R. K. Bonde & P. M. McGuire. 2007. **Polymorphic microsatellite DNA markers for the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*).** *Molecular Ecology* 7(6):1073-1076.
- PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente). 1995. **Plan de Manejo Regional para el Manatí antillano. Programa Ambiental del Caribe del Caribe.** Reporte Técnico No. 35. 99 pp.
- Quintana-Rizzo, E. 1993. **Estimación de la distribución y el tamaño poblacional del manatí *Trichechus manatus* (Trichechidae-Sirenia) en Guatemala.** Trabajo de Graduación de Licenciatura Universidad San Carlos Guatemala. 82 pp.

- , 2005a. **Estudio sinóptico de la distribución y abundancia relativa del manatí (*Trichechus manatus*) en el Golfo de Honduras en el período de mayo- junio 2005.** Reporte Técnico para el Comitato Internazionale per lo Sviluppo del Ppoli (CISP). Universidad del Sur de Florida. 33 pp.
- , 2005b. **Distribución y número de manatíes (*Trichechus manatus manatus*) utilizando la Costa Atlántica de las aguas guatemaltecas.** Estudio sinóptico. Reporte Técnico. Universidad del Sur de Florida. 18 pp.
- & J. E. Reynolds III. 2010. **Regional Management Plan for the West Indian manatee (*Trichechus manatus*).** Caribbean Environment Programme (CEP) and United Nations Environment Programme (UNEP). 178 pp.
- Reece, J.; Ehrhart L. M.; C. L. Parkinson. 2006. **Mixed stock analysis of juvenile loggerheads (*Caretta caretta*) in Indian River Lagoon, Florida: implications for conservation planning.** Conservation Genetics. 7(3):345-352.
- Reynolds III, J. E. & D. Wetzel. 2008. **Reintroduction of Manatees *Trichechus manatus* into Guadeloupe, Lesser Antilles: Issues, Questions and Possible Answers.** Mote Marine Laboratory, Florida. 12 pp.
- Rommel, S. & J. E. Reynolds III. 2000. **Diaphragm structure and function in the Florida Manatee (*Trichechus manatus latirostris*).** The Anatomical Record 259(1):41-51.
- Schonewald-Cox, C. M.; S. M. Chambers; B. MacBryde & W. L. Thomas. 1983. **Genetics and conservation.** Benjamin-Cummings Publishing, California. 722 pp.

- Southern, S. O.; P. J. Southern & A. E. Dizon. 1988. **Molecular characterization of cloned dolphin mitochondrial genome.** *Journal of Molecular Evolution* 28(1-2):43.
- Schwartz, M. K.; Luikart G. & R. S. Waples. 2006. **Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management.** *Trends in Ecology and Evolution* 22(1):25-33.
- Taberlet, P; L. P. Waits & G. Luikart. 1999. **Noninvasive genetic sampling: look before you leap.** *Trends in Ecology and Evolution* 14(8):323-327.
- ThermoScientific. Fecha desconocida. **Assessment of nucleic acid purity. T042-Technical Bulletin.** USA. En: <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>. [Actualizado en el 2013)
- Thornback J. & M. Jenkins. 1982. **The IUCN Red Data Book. Part 1. Threatened Mammalian Taxa of the Americas and the Australasian Zoogeographic Region (Excluding Cetacea).** IUCN. Suecia.
- Trigali, M. D.; S. Seyoum, S. L. Carney; M. C. Davis, M. A. Rodriguez-Lopez; J. E. Reynolds III & E. Haubold. 2007. **Eighteen new polymorphic microsatellite markers for the endangered Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*.** *Molecular Ecology* 8(2):328-331.
- Vianna, A. J.; R. K. Bonde; S. Caballero; J. P. GiralDOS; R. P. Lima; A. Clark; M. Marmontel; B. Morales-Vela; M. J. Souza; L. Parr; M. A. Rodríguez-Lopez; A. A. Mignucci-Giannoni; J. A. Powell & F. R. Santos. 2006. **Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implication for manatee conservation.** *Molecular Ecology* 15(2):433-447.

- Walker, J. 1984. **Methods in Molecular Biology**. Vol. 2. Nucleic Acids. The Humana Press Inc, New Jersey. 375 pp.
- Wang, X; T.A. Rinehart; P.A. Wadl; J. M. Spiers; D. Hadziabdic; M. T. Windham & R. N. Trigiano. 2009. **A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles**. African Journal of Biotechnology 8(11):2432-2436.
- Yañez-Arancibia, A.; D. Zarate Lomeli; M. Gómez Cruz; R. Gordines Orante & V. Santiago Fandiño. 1999. **The ecosystem framework for planning and management the Atlantic coast of Guatemala**. Ocean and Coastal Management 42(2-4):283-317.
- Zhang, B. W.; M. Li; L. C. Ma & F. W. Wei. 2006. **A Widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples**. Biochemical Genetics 44(11):503-512.
- Zoltan, N. 2010. **A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses**. Organisms Diversity and Evolution 10(1):91-105.

VIII. APÉNDICES

Apéndice A. Registro de campo

Cuadro 2: Hoja de campo de datos de interés tomados para cada avistamiento de manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) durante la fase de campo entre julio 2010- febrero 2011.

Tabla de registro		
Fecha:	Hora inicial	
# de avistamiento	Hora final	
Registro:		
Observadores:		
Sitio:		
Coordenadas: N 15.		
W 8		
Fotos:		
Colección de muestras (tipo):		
Proximidad más cercana:		
# total de animales	Crías	
	Adultos	
	Juveniles	
Condiciones climáticas	Asoleado	
(bien o mal)	Brisa	
	Reflejo	
Recorrido del fondo:		
Otras observaciones:		

Cuadro 3: Hoja de campo de los datos tomados cada día de campo en la zona costera (la Bahía La Graciosa) y la zona del lago (Bocas del Polochic). Estos datos fueron tomados con el propósito de tener un registro de las condiciones de campo para ir solucionando los problemas de coordinación, entre otros

Diario del día	
fecha:	hora de inicio:
observadores:	
lancha:	
avioneta:	
Descripción de lancha y motor:	
Descripción de avioneta y motor:	
Éxitos:	
Faltas:	
Soluciones:	

Cuadro 4: Hoja de campo de los datos tomados a la hora encontrar restos fecales en la superficie del agua.

Colección de heces			
fecha:			
No muestra		No submuestras	
Investigador		Colector	
Zona			
Ubicación		Coordenadas	
Tamaño		Peso en fresco	
Color		Tipo de conservación	

Apéndice B. Secuencias de ADN mitocondrial

Figura 14: Alineamiento de las secuencias obtenidas durante el estudio. Se utilizó el programa de Clustal 2.1.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

1H      -----AGATGTCTTATTTAAGAGGAAAGAATGGGCGATTTT
21H     -----
20H     -----TGTCTTATTTAAGAGGAAAGAGTGGGCGAATTT
5H      -----ttatttaagaggaaagagtgggccaattt
J1      -----
8H      -----TTTTTATAAGAGGAAAGAGTGGGCGAATTT
A4      -----
10H     -----AAGAGGAAAGAGTGGGCGAATTT
11H     -----AAGAGGAAAGAGTGGGCGAATTT
A3      -----
7T      tagagtttcggatcgttttaaagtagatgtcttatttaagaggaaagagtgggccaattt
2H      -----aaagagtgggccaattt
16H     -----ttaagaggaaagagtgggccaattt
7H      -----agatgtcttatttaagaggaaagagtgggccaattt
A1      -----

```

```

1H      AGGTGAGATGGCCCTGAAGAAAGAACCAGATGTCTGTTAAAGTTCATTAAGTAGCTACCC
21H     -----AAGACCAGATGCCAGGTATAGATTCAGTT-TAGACACCC
20H     AGGTGAGATGGTCCTGAAGAAAGAACCAGATGCCAGGTATAGATTCAGTT-TAGACACCC
5H      aggtgagatggtcctgaagaaagaaccagatgccaggtatagattcagtt-tagacaccc
J1      -----ACACCC
8H      AGGTGAGATGGTCCTGAAGAAAGAACCAGATGCCAGGTATAGATTCAGTT-TAGACACCC
A4      -----ACACCC
10H     AGGTGAGATGGTCCTGAAGAAAGAACCAGATGCCAGGTATAGATTCAGTT-TAGACACCC
11H     AGGTGAGATGGTCCTGAAGAAAGAACCAGATGCCAGGTATAGATTCAGTT-TAGACACCC
A3      -----ACACCC
7T      aggtgagatggtcctgaagaaagatccagatgccaggtatagattcagtt-tagacaccc
2H      aggtgagatggtcctgaagaaagaaccagatgccaggtatagattcagtt-tagacaccc
16H     aggtgagatggtcctgaagaaagaaccagatgccaggtatagattcagtt-tagacaccc
7H      aggtgagatggtcctgaagaaagaaccagatgccaggtatagattcagtt-tagacaccc
A1      -----ACACCC
                                     ****

```

```

1H      CCACATGACATGGGCCCCGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCTGAAGGGTTGCTGATTTCA
21H     CCACAAGTTATGGGCCCCGAGCGAGAAGAGGGACAAAATGAGGGCGGGTTGCTGGTTTCT
20H     CCACAAGTTATGGGCCCCGAGCGAGAAGAGGGACAAAATGAGGGCGGGTTGCTGGTTTCT
5H      ccacaagttatgggccccgagcgcgagaagagggacaaaatgagggcgggttgctggtttct
J1      CCACAAGTTATGGGCCCCGAGCGAGAAGAGGGACAAAATGAGGGCGGGTTGCTGGTTTCT
8H      CCACAAGTTATGGGCCCCGAGCGAGAAGAGGGACAAAATGAGGGCGGGTTGCTGGTTTCT
A4      CCACAAGTTATGGGCCCCGAGCGAGAAGAGGGACAAAATGAGGGCGGGTTGCTGGTTTCT
10H     CCACAAGTTATGGGCCCCGAGCGAGAAGAGGGACAAAGACGAGGGCGGGTTGCTGGTT

```

11H CCACAAGTTATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGACAAGACGAGGGCGGGTTGCTGGTTTCT
A3 CCACAAGTTATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGACAAGACGAGGGCGGGTTGCTGGTTTCT
7T cctcaagttatgggcccggagcgagaagagggacaagatgagggcggggttgctggtttct
2H ccacaagttatgggcccggagcgagaagagggacaagatgagggcggggttgctggtttct
16H ccacaagttatgggcccggagcgagaagagggacaagatgagggcggggttgctggtttct
7H ccacaagttatgggcccggagcgagaagagggacaagatgagggcggggttgctggtttct
A1 CCACAAGTTATGGGCCCGGAGCGAGAAGAGGGACAAGATGAGGGCGGGTTGCTGGTTTCT
** ** * ***** * ***** **

1H CGGGCGATGGTGATCAAGCTCGTGATCTAATGGAAGGGATACGCATGTTGATGAGAATGG
21H CGGGCGCTTGGTAGTTAGGGACTGCC--TAATGGAGGTGATAAGCATGTTGGCGAGAATGA
20H CGGGCGCTTGGTAGTTAGGGACTGCC--TAATGGAGGTGATAAGCATGTTGGCGAGAATGA
5H cggcgcttggttagttagggactgcc--taatggaggtgataagcatgttggcgagaatga
J1 CGGGCGCTTGGTAGTTAGGGACTGCC--TAATGGAGGTGATAAGCATGTTGGCGAGAATGA
8H CGGGCGCTTGGTGATCAAGGACTGCC--TAATGGAGGTGATAAGCATGTTGACGAGGATGA
A4 CGGGCGCTTGGTGATCAAGGACTGCC--TAATGGAGGTGATAAGCATGTTGACG-----
10H CGGGCGCTTGGTGATCAAGGACTGCC--TAATGGAGGTGATAAGCATGTTGACGAGGATGA
11H CGGGCGCTTGGTGATCAAGGACTGCC--TAATGGAGGTGATAAGCATGTTGACGAGGATGA
A3 CGGGCGCTTGGTGATCAAGGACTGCC--TAATGGAGGTGATAAGCATGTTGACG-----
7T cggcgcttggtgatcaaggactgcc--taatggaggtgataagcatgttgacgaggatga
2H cggcgcttggtgatcaaggactgcc--taatggaggtgataagcatgttgacgaggatga
16H cggcgcttggtgatcaaggactgcc--taatggaggtgataagcatgttgacgaggatga
7H cggcgcttggtgatcaaggactgcc--taatggaggtgataagcatgttgacgaggatga
A1 CGGGCGCTTGGTGATCAAGGACTGCC--TAATGGAGGTGATAAGCATGTTGACGAGGATGA
** ** **** * * * * ***** * **** ***** *

1H ATTTGACTTAAATGTGCTATGTACGATCAATAATTATA-TGTACTATGTACTATCATGCA
21H TTTCAAGTGA--TGTGCTATGTACGATTAAGGAGTGAATGTATTATGCAATATTAAGA-
20H TTTCAAGTGA--TGTGCTATGTACGATTAAGGAGTGAATGTATTATGCAATATTAAGA-
5H tttcaagtga--tgtgctatgtacgattaaggagtgtaatgtattatgcaatattaaga-
J1 TTTCAAGTGA--TGTGCTATGTACGATTAAGGAGTGAATGTATTATGCAATATTAAGA-
8H TTTCAAGTAA--TGTGCTATGTACGATTAAGGAGCATGATGTGCTATGCAATATCAAGG-
A4 -----
10H TTTCAAGTAA--TGTGCTATGTACGATTAAGGAGCATGATGTGCTATGCAATATCAAGG-
11H TTTCAAGTAA--TGTGCTATGTACGATTAAGGAGCATGATGTGCTATGCAATATCAAGG-
A3 -----
7T tttcaagtaa--tgtgctatgtacgattaaggagcatgatgtgctatgcaatatcaagg-
2H tttcaagtaa--tgtgctatgtacgattaaggagcatgatgtgctatgcaatatcaagg-
16H tttcaagtaa--tgtgctatgtacgattaaggagcatgatgtgctatgcaatatcaagg-
7H tttcaagtaa--tgtgctatgtacgattaaggagcatgatgtgctatgcaatatcaagg-
A1 TTTCAAGTAA--TGTGCTATGTACGATTAAGGAGCATGATGTGCTATGCAATATCAAGG-

1H TGTTTATGTACTTGCTTATACGCATGGGGCATATAATGTAATGTACTATATACATATTAT
21H GGTGAATGGACTGAAGAATATCCATGTGGTTGGGAATTTGCAGTGGAAGGTATATACTGT
20H GGTGAATGGACTGAAGAATATCCATGTGGTTGGGAATTTGCAGTGGAAGGTATATACTGT
5H ggtgaatggactgaagaatatccatgtgggttgggaatctgcagtggaaggtatatactgt
J1 GGTGAATGGACTGAAGAATATCCATGTGGTTGGGAATTTGCAGTGGAAGGTATATACTGT
8H AATGAATGGACTGAAGAATATCCATGTGGTTGGGAATCTGCAGTGGAAGGTATATACTGT
A4 -----
10H AATGAATGGACTGAAGAATATCCATGTGGTTGGGAATCTGCAGTGGAAGGTATATACTGT
11H AATGAATGGACTGAAGAATATCCATGTGGTTGGGAATCTGCAGTGGAAGGTATATACTGT
A3 -----
7T aatgaatggactgaagaatatccatgtgggttgggaatctgcagtggaaggtatatactgt
2H aatgaatggactgaagaatatccatgtgggttgggaatctgcagtggaaggtatatactgt
16H aatgaatggactgaagaatatccatgtgggttgggaatctgcagtggaaggtatatactgt

7H aatgaatggactgaagaatatccatgtgggttgggaatctgcagtggaaggtatatactgt
 A1 AATGAATGGACTGAAGAATATCCATGTGGTTGGGAATCTGCAGTGGAAGGTATATACTGT

1H GTCCTTGTTACATTAATGTTATGTACATTCCCCATTCCGAGTGGTAAGACCATATGTTGT
 21H CTAGAAG---CATTATTTATACTGTACTTGCTTGTAAGCATGGGGTATATAATGTAATGT
 20H CTAGAAG---CATTATTTATACTGTACTTGCTTGTAAGCATGGGGTATATAATGTAATGT
 5H ctagaag---cattatTTATACTGTACTTGCTTGTAAGCATGGGGTATATAATGTAATGT
 J1 CTAGAAG---CATTATTTATACTGTACTTGCTTGTAAGCATGGGGTATATAATGTAATGT
 8H CTAGGAG---CATTACTCATACTGTACTTGCTTATAAGCATGGGGTATGTAGTGTAATGT
 A4 -----
 10H CTAGGAG---CATTACTCATACTGTACTTGCTTATAAGCATGGGGTATGTAGTGTAATGT
 11H CTAGGAG---CATTACTCATACTGTACTTGCTTATAAGCATGGGGTATGTAGTGTAATGT
 A3 -----
 7T ctaggag---cattactcatactgtacttgcttataagcatgggggatgtagtgtaatgt
 2H ctaggag---cattactcatactgtacttgcttataagcatgggggatgtagtgtaatgt
 16H ctaggag---cattactcatactgtacttgcttataagcatgggggatgtagtgtaatgt
 7H ctaggag---cattactcatactgtacttgcttataagcatgggggatgtagtgtaatgt
 A1 CTAGGAG---CATTACTCATACTGTACTTGCTTATAAGCATGGGGTATGTAGTGTAATGT

1H ATGCCGTACATGCGAGGTTAGGTGTGTTGATGGTTGCAGTTATTTCTAATGTTAGGTTAG
 21H A---CGATTATACATAGGATGGTGTATGTAAGATAAAACA-----
 20H A---CGATTATACATAGGATGGTGTATGTAAGATAAAACA-----
 5H a---cgattatacataggatggtgtatgtaagataaaaaca-----
 J1 A---CGATTATACATAGGATGGTGTATGTAAGA-----
 8H A---CGATTATACATAGGATGGTGTATGTAAGATTAAACA-----
 A4 -----
 10H A---CGATTATACATAGGATGGTGTATGTAAGATTAAACA-----
 11H A---CGATTATACATAGGATGGTGTATGTAAGATTAAACA-----
 A3 -----
 7T a---cgattatacataggatggtgtatgtaagattaaaca-----
 2H a---cgattatacataggatggtgtatgtaagattaaaca-----
 16H a---cgattatacataggatggtgtatgtaagattaaaca-----
 7H a---cgattatacataggatggtgtatgtaagattaaaca-----
 A1 A---CGATTATACATAGGATGGTGTATGTAAGATTAAACA-----

1H AGTGTAAGTCAGTGTTAAGTTGTTGCAAGTTTTAGTGAATTTAATACTGAGAAGGCTCT
 21H -----TAGATAGTACTATATGGGGAGG
 20H -----TAGATAGTACTATATGGGGAGG
 5H -----tagatagtactatatggggagg
 J1 -----
 8H -----TAGATAGTACTATATGGGGAAG
 A4 -----
 10H -----TAGATAGTACTATATGGGGAAG
 11H -----TAGATAGTACTATATGGGGAAG
 A3 -----
 7T -----tagatagtactatatggggaag
 2H -----tagatagtactatatggggaag
 16H -----tagatagtactatatggggaag
 7H -----tagatagtactatatggggaag
 A1 -----TAGAT-----

1H TTGCATTAGTGGAGGTATATTAATAATATTCAGGGAGTAGTTTTAAATAGAAGTTTTCAGCTT

```

21H      AGCACATAATGCACGAATTACATAGCCGTACAGGGAGTAGTTTAAGTAGAATTTTCAGCTT
20H      AGCACATAATGCACGAATTACATAGCCGTACAGGGAGTAGTTTAAGTAGAATTTTCAGCTT
5H       agcacataatgcacgaattacatagccgtacagggagtagttaaagtagaatttcagctt
J1       -----
8H       AACACATAATGCACGAATTACATAGCCGTACAGGGAGTAGTTTAAGTAGAATTTTCAGCTT
A4       -----
10H      AACACATAATGCACGAATTACATAGCCGTACAGGGAGTAGTTTAAGTAGAATTTTCAGCTT
11H      AACACATAATGCACGAATTACATAGCCGTACAGGGAGTAGTTTAAGTAGAATTTTCAGCTT
A3       -----
7T       aacacataatgcacgaattacatagccgtacagggagtagttaaagtagaatttc-----
2H       aacacataatgcacgaattacatagccgtacagggagtagttaaagtagaatttcagctt
16H      aacacataatgcacgaattacatagccgtacagggagtagttaaagtagaatttcagctt
7H       aacacataatgcacgaattacatagccgtacagggagtagttaaagtagaatttcagctt
A1       -----

1H       TGGGTGTTGATGGTGAA-----
21H      TGGGTGTTGATGGTG-----
20H      TGGGTGTTGATGGTGAA-----
5H       tggg-----
J1       -----
8H       TGG-----
A4       -----
10H      TGGGTGTTGATGGTGAATAAAAATGCGTGCCAAAAAAAATACAGAGAATAGTTTAATCAG
11H      TGG-----
A3       -----
7T       -----
2H       tgg-----
16H      tgggt-----
7H       tgg-----
A1       -----

```

Apéndice C. Recetas de soluciones

1. DESS (Dimetil Sulfoxido, DMSO-Ácido etilendiaminotetraacético, EDTA-Cloruro de Sodio, NaCl)

0.25M EDTA disódico pH 8.0

20% DMSO

NaCl saturado

a. 0.5M EDTA disódico (EDTA-Hidroxido de sodio, NaOH)

372.24 g EDTA disódico FW 374.24

5M NaOH hasta llegar a EDTA 8.

Agua deionizada aforar hasta 2 L de volumen

b. 2 litros de DESS

0.5 EDTA disódico 1L
400 mL DMSO
600 mL agua desionizada
300 g de NaCl

**c. Solución STE (NaCl–Hidocloruro (HCL) de
Tris(hydroxymetil)aminometano, Tris- EDTA)**

100 mM Tris-HCL, pH 8.0
10 mM EDTA, pH 8.0
10 mM NaCl

2. Solución 1X TE pH8 (Tris-EDTA)

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

3. Solución TNE (Tis- Dodecilsulfato sódico, SDS-Cloruro de calcio, CaCl₂)

10 mM Tris-HCL
0.5% SDS
1mM CaCl₂

4. Solución TEN (Tris-EDTA-NaCl)

10mM Tris-HCl pH 7.9 a 20° C
10 mM EDTA
10 M NaCl

5. Solución de CTAB

10% CTAB

0.7 M NaCl

6. Solución de Unión (Guanidinio tiocianato, GuSCN- Tris-EDTA)

5M GuSCN

50 mM Tris-HCl

0.01M EDTA

7. Solución de Lavado (GuSCN-Triton-X-Tris-HCl)

5M GuSCN

0.65% Tritón-X

0.05 M Tris-HCl

Apéndice D. Protocolos de laboratorio**1. Protocolo estándar de fenol-cloroformo (Ausubel *et al.* 1989 con modificaciones de Susan Carney (Carnet *et al.* 2007)).**

- a. Añadir un volumen de solución saturado de fenol: cloroformo a la solución de ADN (1-4 gramos de muestra + 1 ml de solución)
- b. Ya que las extracciones de ADN tienen un peso molecular bastante alto, la solución se debe mezclar lentamente por inversiones hasta que adquiere una consistencia lechosa (normalmente ~2 – 3 minutos).
- c. Microcentrifugar por 5 minutos a una velocidad de 10,000 a 13,000 rpm.
- d. Remover cuidadosamente la capa acuosa a un tubo nuevo, se debe evitar contacto con la interfase. Los pasos de 1 a 4 se repiten hasta que la interfase sea invisible.
- e. Para remover residuos de fenol, un volumen de cloroformo se añade a la capa acuosa seguido por otras microcentrifugaciones por 5 min a la misma velocidad
- f. La capa acuosa es removida, y la mezcla resultante, ADN, es precipitado con Etanol (ver abajo)

2. Protocolo para precipitación con etanol (Ausubel *et al.* 1989 con modificaciones de Susan Carney (Carnet *et al.* 2007)).

- a. Añadir 1/10 de volumen de una solución estéril de 3M NaOAC pH 5.2 seguido por 2.5 volúmenes de etanol frío al 95%. Mezclar cuidadosamente y colocar en un tubo a -20° C y dejar una noche.
- b. Los tubos serán microcentrifugados a 10,000-12,000 rpm a 4°C por 30 min
- c. Cuidadosamente verter el sobrenadante manteniendo el peller dentro, lo más probable es que el pelle se encuentre en las paredes del tubo. Los tubos deben ser colocados boca abajo sobre una servilleta.
- d. Después de colocar el tubo en una gradilla, el pellet debe ser lavado con 50 µl de etanol frío al 70%; este se debe verter cuidadosamente por el lado opuesto de donde se encuentra el pellet.
- e. Repetir paso 3
- f. El etanol es extraído con el uso de una nueva punta de pipeta para cada
- g. Los pellets deben ser secados al dejarlos boca abajo sobre una mesa durante una noche o someterlos al vacío
- h. Cada pellet se debe resuspender en 50-200 µl de TE dependiendo del tamaño del pellet.
- i. Cuando los pellets se hallen disueltos 2µl de ADN será corrido en 0.8% de gel de agarosa con TBE para poder analizar la integridad de ADN.

3. Protocolo de extracción de muestras fecales (Zhang *et al.* 2006 con modificaciones).

- a. Pesar 1.5 gramos de heces en tubo de centrifuga de 15 ml.
- b. Agregar en 5 ml de etanol al 95% en el mismo tubo y centrifugar a 4,000 rpm por 2 minutos para crear pellet.
- c. Descartar el sobrenadante y repetir paso 2 y 3 con 5 ml de TE.
- d. Agregar 3 ml de TNE y 50 µl de proteinasa k (20 mg/µl).
- e. Incubar a 55° C por 1-2 horas.
- f. Centrifugar a 4000 rpm por 1 minuto.
- g. Transferir a un tubo nuevo de 15 ml y agregar 3 gramos polvo de almidón estéril.

- h. Colocar en el vortex y resuspender almidón e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
- i. Centrifugar el tubo a 8000 rpm para formar un pellet.
- j. Pipetear 600 μ l del sobrenadante en un nuevo tubo de 2 ml, junto con 150 μ l de NaCl (3.5 M) y 250 μ l de solución CTAB, seguido por una incubación a 70° C por 10 min.
- k. Extraer dos veces con un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (Apéndice D).
- l. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo junto a un volumen igual de una solución de extracción (4M hidrocloreuro de guanidinio, 1 M de acetato de potasio, pH 5).
- m. Mezclar la solución y transferirla a una columna de centrifugación (EZNA Cycle-pure kit, Omega; loading Ultrafree-MC 300000 como membrana de filtro, Milipore).
- n. Esto se coloca en un tubo de centrífuga de 2 ml a 60,000 rpm por 30 s.
- o. Lavar la membrana de filtro dos veces con 750 μ l etanol al 75%.
- p. Eluir el ADN con 200 μ l de TE y 50 μ g/ml ARNasa

4. Protocolo de sílice para tejido putrefacto (mod. De Höss y Pääbo 1993)

- a. 2 ml de buffer de extracción (10 M Guanidinio tiocianato [GuSCN], 0.1 M Tris-HCL pH 6.4, 0.02 M EDTA pH 8.0 y 1.3% Triton-X) se le agregó a 1 cm³ de tejido antes de una incubación y agitación a 60° C por 3 a 4 horas o durante la noche.
- b. La solución se centrifugó a 6,000 rpm por 5 min.
- c. Se removió 600 μ l del sobrenadante y se añadió 400 μ l del buffer de extracción junto con 40 μ l de suspensión de sílice.
- d. La solución se colocó en reposo por 10-30 min a temperatura ambiente y luego se colocó por 3 min a velocidad máxima para remover el sobrenadante (este sobrenadante se almacenó en 10 M NaOH hasta su destrucción).

- e. El pellet de sílice se lavó dos veces con 750 μ l de buffer de lavado (10 M GuSCN, 0.1 M Tris-HCl), 2 veces con etanol al 70% y una vez con 750 μ l de acetona.
- f. El pellet de seco a 56° C y el ADN se eluyó 2 veces en 65 μ l de TE, se esperó 10 min entre cada elución.

5. Protocolo de extracción en heces (Marrero *et al.* 2009).

- a. Mojar cada muestra en papel filtro (2x2 cm) humedecido en Buffer de Unión y esperar 30 minutos.
- b. Transferir cada papel en un tubo de centrifuga de 0.5 ml que contiene 100-150 μ l Buffer de Unión
- c. Estos tubos han sido previamente perforados con una aguja estéril y colocados en un tubo de 1.5 ml y centrifugados a 13,000 rpm por 10 minutos para recuperar la capa acuosa del papel.
- d. Colocar 15 μ l de suspensión de sílice en los extractos de ADN.
- e. Mantener la mezcla a temperatura ambiente y hacer vortex por 15 minutos.
- f. Después de una centrifugación por 2 minutos a 13,000 rpm, descartar el sobrenadante y lavar los pellets de sílice con 200 μ l de buffer de limpieza (200 mM Tris-HCl pH8; 1 mM EDTA; 200 mM NaCl y 50% etanol).
- g. Luego con 1 ml de éter: cloroformo.

6. Adaptación del protocolo Zhang (2006) y Marrero (2009).

- a. Pesar 1.5g de heces en tubo de centrifuga de 15 ml.
- b. Colocar en vortex con 5 ml de etanol al 95% para lavar la muestra.
- c. Centrifugar a 4,000 rpm por 2 minutos para crear pellet, luego descartar el sobrenadante.
- d. Repetir pasos 2 y 3 con 5 ml de TE.
- e. Agregar 100 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) y 3 ml de TNE e incubar a 55° C por 2 horas.
- f. Centrifugar el lisado a 4,000 rpm por 1 min para crear pellet.
- g. Transferir el sobrenadante a un tubo centrifuga con 3 gramos de almidón de papa.

- h. Colocar en vortex cada muestra hasta resuspender el almidón por completo e incubar a temperatura ambiente por un minuto.
- i. Centrifugar los tubos a 8,000 rpm durante 3 minutos para crear un pellet de almidón.
- j. Colocar 450 μ l del sobrenadante a un tubo de 1.5 ml junto con 112 μ l de NaCl y 188 μ de CTAB.
- k. Incubar a 70° C por 10 minutos.
- l. Extraer dos veces con un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (Protocolo estándar de fenol-cloroformo).
- m. Transferir 600 μ l del sobrenadante a un nuevo tubo y colocar buffer de unión
- n. Mezclar lentamente la solución y luego aplicar 40 μ l de suspensión de sílice.
- o. Poner la solución en reposo por una hora.
- p. Luego centrifugar por 3 minutos a velocidad máxima para remover sobrenadante.
- q. Lavar los pellets de sílice 2 veces con buffer de lavado y 2 veces con etanol al 75%
- r. Eluir con 100 μ l TE y dejar a temperatura ambiente durante toda la noche.
- s. Al día siguiente colocar 2,000 rpm durante 3 minutos y luego colocar 60° C por 15 minuto.

7. Preparación de suspensión de sílice

- a. Pesar 1.2 gramos de sílice o tierra de diatomeas y agregar 100 ml de agua destilada
- b. Dejar reposar por 35 horas a temperatura ambiente
- c. Remover 86 ml del sobrenadante y aforrar a 100 ml
- d. Dejar reposar por 5 horas a temperatura ambiente
- e. Remover 88 ml del sobrenadante y agregar 600 μ l de HCl.

Apéndice E: Costos de cada protocolo de extracción

Cuadro 2: Costo generado para el procesamiento de cada muestra de tejido usando el protocolo de extracción fenol: cloroformo.

Reactivo o equipo	Cantidad de venta	medida	Precio	Cantidad por muestra	medida	Valor por muestra
Eppendorf (1.5 ml)	500	U	\$47.70	1	U	\$0.10
Trizma base	250	g	\$123.50	0.0005	g	\$0.00
	250	g	\$123.50	0.0005	g	\$0.00
EDTA	100	g	\$26.24	0.01	g	\$0.04
	100	g	\$26.24	0.008	g	\$0.00
SDS	100	g	\$26.24	0.0002	g	\$0.00
Proteinasa K	100	mg	\$114.00	0.2	mg/ml	\$0.23
1.5 ml eppendorf	500	U	\$47.70	1.0000	U	\$0.10
Fenol	500	ml	\$158.13	0.25	ml	\$0.08
Cloroformo:alcohol isoamilico	100	ml	\$73.40	0.375	ml	\$0.28
Eppendorf (1.5 ml)	500	U	\$47.70	1	U	\$0.10
Acetato de sodio	100	ml	\$34.21	0.02	ml	\$0.01
Etanol	2500	ml	\$64.02	0.5	ml	\$0.01
Solución TE	100	ml	47.48	0.0650	ml	\$0.03
Precio por muestra						\$1.23
en quetzales						Q9.59

Cuadro 5: Costo generado para el procesamiento de cada muestra fecal usando el protocolo de extracción de Marrero (2009).

Reactivo o Equipo	Cantidad de venta	Medida	Precio	Cantidad por muestra	Medida	Valor por muestra
Guanidinio tiocianato	250	g	\$166.75	0.2398	g	\$0.16
Tris-HCL	500	g	\$56.93	0.0003	g	\$0.00
	500	g	\$56.93	0.0006	g	\$0.00
EDTA	250	g	\$77.00	0.0038	g	\$0.00
	250	g	\$77.00	0.0001	g	\$0.00
Tritón-X	250	ml	\$75.56	0.0013	g	\$0.00
0.5 ml tubo eppendorf	500	U	\$60.10	1.0000	U	\$0.12
1.5 ml tubo eppendorf	500	U	\$47.70	1.0000	U	\$0.10
Sílice	250	g	\$49.22	0.0002	g	\$0.00
NaCl	500	g	\$38.75	0.0023	g	\$0.00
Etanol	2500	ml	\$64.02	0.1000	ml	\$0.00
Éter	1000	ml	\$32.25	0.5000	ml	\$0.02
Cloroformo	100	ml	\$73.40	0.5000	ml	\$0.37
solución TE	100	ml	\$47.48	0.0500	ml	\$0.02
1.5 ml tubo eppendorf	500	U	\$47.70	1.0000	U	\$0.10
Precio total por muestra (en dólares)						\$0.88
en quetzales						Q6.89