

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio Preliminar de Diversidad Genética de *Manta birostris* que
visitaron la Isla de la Plata durante los años 2010, 2011 y 2012**

VERÓNICA PATRICIA YUMICEBA CORRAL

María de Lourdes Torres, PhD., Directora de Tesis

Tesis de Grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniera en

Procesos Biotecnológicos

Quito, diciembre de 2014

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Estudio Preliminar de Diversidad Genética de *Manta birostris* que visitaron la Isla de la Plata durante los años 2010, 2011 y 2012

Verónica Patricia Yumiceba Corral

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Directora de Tesis

y Miembro de Comité de Tesis

Venancio Arahana, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Judith Denkinger Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas

y Ambientales

Quito, diciembre de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art.144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: Verónica Patricia Yumiceba Corral

C. I.: 1720962214

Fecha: Quito, diciembre de 2014

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis papás y hermanas por todo su apoyo incondicional en cada meta propuesta. Ellos son a los que más amo y sin duda son mi más grande bendición e inspiración.

Agradecimientos

Agradezco a Dios, por derramar sobre mí bendiciones, por su amor infinito y por permitirme completar una etapa más en la vida. Agradezco a mi mamita por su dedicación y amor profundo; a mi papi por ejemplo de perseverancia, a mis hermanas por ser las mejores amigas que la vida me ha regalado.

Además, quiero agradecer a María de Lourdes Torres por permitirme realizar mi tesis en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal. A Venancio, Rodrigo y Judith por su gran colaboración en la parte experimental, escritura y en la lectura de la tesis.

La colaboración de Michel Guerrero, Andrea Marshall y Tom Kashiwagi ha sido muy valiosa en la recolección y entrega de muestras al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, en la ejecución y redacción de esta tesis; sin ellos no hubiese sido posible culminar este proyecto. Les agradezco su gran disposición para ayudarme en especial a Tom Kashiwagi quien me facilitó el texto de su tesis de maestría.

Finalmente agradezco a Cris, Meche, Tefy y Bernardo por su apoyo durante el tiempo que realicé los experimentos y en el análisis de datos. A los que trabajan en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y a los verdaderos amigos que compartieron conmigo cada momento de alegría o preocupación y supieron darme una mano o un abrazo sincero, Stefy Espinosa y Marce.

Resumen

Manta birostris es una especie altamente migratoria y la más grande del género *Manta*. En el 2009, el género *Manta* fue reevaluado y se lo dividió en dos especies *Manta alfredi* y *Manta birostris*. La distribución de *Manta birostris* es muy amplia dispersándose en áreas tropicales a semi-templadas alrededor de todos los océanos. Actualmente, la pesca no reglamentada para conseguir branquioespinas, junto con su baja tasa de reproducción está reduciendo las subpoblaciones a nivel mundial. Esta especie es vulnerable a la sobrepesca, debido a su madurez tardía, lenta gestación y períodos de vida largos. Una agrupación grande de *M. birostris* visita la Isla de la Plata durante los meses de julio a septiembre. La presente investigación tuvo como objetivo caracterizar la diversidad genética de individuos de dicho grupo mediante el uso de microsatélites. Se analizó 57 muestras de *M. birostris* recolectadas en tres años diferentes (2010, 2011 y 2012), con ocho pares de primers heterólogos. Se identificó 46 alelos en los ocho loci y un promedio de 4,375 alelos por cada uno. Se encontró que en tres loci (MA14, MA43 Y MA30) existe un alelo exclusivo y que tres loci (MA21, MA15, MA30) no estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los indicadores de diversidad genética analizados (heterocigosidad esperada, índice de Shannon, índice de fijación) muestran una alta variabilidad genética. La estimación de la estructura poblacional de *M. birostris* mediante inferencia Bayesiana indica que posiblemente las muestras pertenecen a una sola población. Para tener una idea más clara de los índices de diversidad genética y de la estructura poblacional de *M. birostris* es necesario ampliar el número de individuos analizados y el tiempo de estudio.

La información encontrada en este estudio preliminar sobre la diversidad genética y estructura poblacional de *M. birostris* puede ser utilizada para ayudar a la conservación y prácticas de manejo de esta especie.

Abstract

Manta birostris is a highly migratory species, as well as the largest member of the genus *Manta*. In 2009, the genus *Manta* was reevaluated and divided into two species: *Manta alfredi* and *Manta birostris*. *Manta birostris* is broadly distributed, ranging from tropical to semi-temperate oceans. Currently, unregulated fishing for gill rakers and low reproduction rates are reducing subpopulations worldwide. This species is particularly vulnerable to overfishing due to their late maturity, slow gestation periods and long life spans. A large group of *M. birostris* individuals visits the Isla de la Plata during the months of July to September. The present study characterizes the genetic diversity of Isla de la Plata *M. birostris* individuals using microsatellites. A total of 57 samples collected during three years (2010, 2011 and 2012) were analyzed using eight pairs of heterologous primers. A total of 46 alleles were identified in the eight loci analyzed, with an average of 4,375 alleles per locus. Exclusive alleles were found in three loci (MA14, MA43 and MA30), and three loci (MA21, MA15, MA30) were not in Hardy-Weinberg equilibrium. The genetic diversity indicators analyzed (expected heterozygosity, Shannon index, fixation index) show a high level of genetic variability. The estimation of the population structure of *M. birostris* using Bayesian inference suggests that the samples studied possibly belong to one population. A greater insight about genetic diversity indexes and the population structure of *M. birostris* can be achieved through the analysis of more samples, over a broader period of time. .

The information of genetic diversity and population structure obtained in this preliminary investigation can be used to establish specific conservation and management programs of this species.

TABLA DE CONTENIDO:

1.	INTRODUCCIÓN:	14
1.1.	Taxonomía de <i>M. birostris</i> :	14
1.2.	Morfología y patrón de pigmentación:	14
1.3.	Alimentación:	16
1.4.	Reproducción y características biológicas:	17
1.5.	Comportamiento social:	18
1.6.	Distribución a nivel mundial y tamaños poblacionales:	19
1.7.	Pesca y comercio a nivel mundial:	22
1.8.	Estancia de <i>Manta birostris</i> en Ecuador	23
1.9.	Vulnerabilidad de la Especie:	24
1.10.	Diversidad Genética:	25
1.11.	Marcadores Moleculares:.....	26
1.10.1	Microsatélites o SSR:.....	27
1.11	Estudios de diversidad genética y estructura poblacional mediante SSRs:	28
2.	OBJETIVOS:	29
2.1.	Objetivo General:.....	29
2.2.	Objetivos Específicos:.....	29
3.	ÁREA DE ESTUDIO:.....	29
4.	JUSTIFICACIÓN:	30
5.	MATERIALES:	31
5.1.	Extracción de ADN a partir de muestras de tejido de <i>M. birostris</i> :	31
5.2.	Cuantificación de ADN:.....	32
5.4.	Amplificación de regiones microsatélite SSR mediante PCR:	32
5.5.	Electroforesis en geles de acrilamida:.....	33
5.6.	Tinción con Plata:	34

6.	MÉTODOS:.....	34
6.1.	Obtención de muestras de tejido de <i>M. birostris</i> :.....	34
6.2.	Extracción y cuantificación de ADN de <i>M. birostris</i> :.....	35
6.3.	Selección de primers y amplificación de regiones microsatélites:.....	36
6.4.	Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata:.....	37
6.5.	Toma de datos y elaboración de matrices alélicas:.....	38
6.6.	Análisis de diversidad genética y estimación de la estructura poblacional de mantarrayas (<i>M. birostris</i>) de la Isla de la Plata:.....	39
7.	RESULTADOS:.....	41
7.1.	Extracción y cuantificación de ADN de tejido de <i>M. birostris</i> :.....	41
7.2.	Amplificación de regiones microsatélites:.....	41
7.3.	Diversidad genética de las muestras de <i>M. birostris</i> en años consecutivos:....	41
7.3.1	Análisis basado en frecuencias:.....	42
7.3.2	Análisis basado en distancias genéticas:.....	43
7.4.	Estructura poblacional de mantarrayas (<i>M. birostris</i>) de la Isla de la Plata:....	44
8.	DISCUSIÓN:.....	44
8.1.	Extracción de ADN y amplificación de regiones microsatélites:.....	44
8.2.	Diversidad genética:.....	46
8.3.	Estructura poblacional de <i>M. birostris</i> :.....	50
9.	CONCLUSIONES:.....	52
10.	RECOMENDACIONES:.....	52
11.	REFERENCIAS:.....	54
12.	TABLAS:.....	62
13.	FIGURAS:.....	65
14.	ANEXOS:.....	71

12. TABLAS

Tabla 1. Distribución mundial de mantarrayas	62
Tabla 2. Resumen de la información de los 8 loci microsatélites: temperatura de annealing estandarizada, motivo repetido y rango de alelos encontrados en 57 muestras de <i>M. birostris</i> de la Isla de la Plata, Ecuador	63
Tabla 3. Análisis comparativo de los parámetros promedio de diversidad genética de la especie <i>M. birostris</i> y <i>M. alfredi</i> Kashiwagi et al. (2012) de acuerdo al locus considerando todos los años de recolección (para el cálculo de estos valores se usó el software GenAlEx 6.501).	64
Tabla 4. Resumen general de parámetros de diversidad genética de la especie <i>M. birostris</i> de los 3 años de recolección y de <i>M. alfredi</i> (Kashiwagi, 2014) usando el software GenAlEx 6.501 (Peakall y Smouse, 2012).	64

13. FIGURAS

- Figura 1.** Características específicas de *M. birostris* (Stevens, s.f.) 65
- Figura 2.** Distribución de dos especies conocidas de mantarrayas, *Manta alfredi* (tomate) y *Manta birostris* (azul), Relación simpátrica o alopátrica de ambas especies (verde) (Couturier et al, 2012)..... 66
- Figura 3.** Electroforesis en gel agarosa al 1,5% de muestras de ADN extraído a partir de tejido de *M. birostris* del Ecuador. 66
- Figura 4.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de los productos de amplificación con el par de primers MA49- JX269152 de 29 muestras de ADN de la especie *M. birostris* provenientes de la Isla de la Plata (USFQ #)..... 67
- Figura 5.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 4% de los productos de amplificación con el par de primers MA09- JX269144 de 25 muestras de ADN de la especie *M. birostris* provenientes de la Isla de la Plata (USFQ #)..... 67
- Figura 6.** Dendrograma basado en el método de Neighbor Joining con las 56 muestras (se excluyó a la muestras USFQ 8 ya que tenía más del 50% de missing data) de la especie *M. birostris* durante 3 años de recolección..... 68
- Figura 7.** Análisis factorial de coordenadas principales (PCoA) usando una matriz de distancia con 56 muestras (se excluyó a la muestras USFQ 8 ya que tenía más del 50% de missing data) de *M. birostris* durante 3 años de recolección. 69
- Figura 8.** Determinación del número de grupos ancestrales asignados por el valor óptimo de K (K=2). Se incluyó las 57 muestras de ADN y se las dividió según el año en el que fueron recolectadas las muestras de la especie *M. birostris*..... 70

14. ANEXOS

Anexo 1. Muestras de tejido muscular-cutáneo de la especie *M. birostris* recolectadas en la Isla de la Plata durante 3 años consecutivos y concentración de ADN después de la extracción.....71

-

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Taxonomía de *M. birostris*:

Datos moleculares, morfológicos y fósiles muestran que la familia *Mobulidae* se deriva de la subclase de elasmobranquios o peces cartilagosos. La familia *Mobulidae* contiene dos géneros *Mobula* (9 especies) y *Manta* (2 especies). Esta familia conforma un grupo diverso de planctívoros presentes en océanos tropicales, subtropicales y templados (Couturier et al, 2012).

El registro más antiguo de *Manta* es a finales del Plioceno (4.8 millones de años A.C) (Couturier et al, 2012). El género *Manta* fue re-descrito recientemente en el año 2009, basándose en características morfológicas y merísticas (Marshall et al., 2009). Actualmente existen al menos dos distintas especies, la mantarraya de arrecife o *Manta alfredi* y la mantarraya gigante o *Manta birostris* y una tercera especie putativa *Manta* sp. cf *birostris* presuntamente endémica del oeste del Océano Atlántico y el mar del Caribe (Couturier et al, 2012).

La especie con la que se trabajó en el presente estudio es *M. birostris*, la cual pertenece a la superclase Peces, clase *Chondrichthyes*, subclase *Elasmobranchii*, superorden *Batoidea*, orden *Myliobatiformes*, familia *Mobulidae*, género *Manta* y especie *Manta birostris*. Su nombre común es Manta raya gigante o Manta diablo (Stevens, s.f.)

1.2. Morfología y patrón de pigmentación:

M. birostris es la especie más grande dentro del género *Manta*, llega a medir hasta 7 o 9 metros, entre las puntas de ambas aletas pectorales (ancho de disco o DW). Tiene un cuerpo plano, formado por cartílago, dentro del que se encuentran las branquias y branquioespinas (Marshall, 2009). Alcanza un peso de 1,400 kg aproximadamente (Last y Stevens, 1994 citado en Dewar et al, 2008).

Presenta aletas pectorales triangulares así como también dos lóbulos cefálicos proyectados desde la cabeza (Marshall, 2009).

Sus ojos están localizados a los costados de la cabeza y detrás de los lóbulos cefálicos permitiéndoles una visión de planos superiores e inferiores. La boca, ubicada al frente del cuerpo, presenta dientes y dentículos con morfología variables entre ambos sexos (Marshall, 2009).

Su piel es áspera debido a presencia de escamas tanto en el dorso como en el vientre (Marshall, 2009). La columna vertebral termina con una masa calcificada presente en el dorso de la cola, posterior a la aleta caudal. Los órganos sexuales están ubicados en la parte posterior de la mantarraya con extensiones de la aleta anal en forma de “clasper” en los machos y en las hembras, cloaca (Stevens, s.f.).

De acuerdo a Marshall (2009), *M. birostris* muestra un patrón de pigmentación típico. La parte dorsal es negra en su mayoría, pero presenta una coloración blanca como parches en la región branquial. Estos parches blancos tienen una forma triangular con extensiones laterales en forma de gancho. La parte anterior de estos parches se conectan con los espiráculos, cerca de la boca. En la parte anterior de la aleta caudal *M. birostris* presenta un parche en forma de V de color blanco pálido. Destellos de color blanco son también visibles en las puntas de las aletas pectorales en la zona dorsal. La boca tiene un color que puede ser de gris a negro, que se extiende desde la base de las aletas cefálicas hasta la parte las primeras hendiduras branquiales (Marshall, 2009; Stevens, s.f) (Figura 1).

La zona ventral es de color crema o blanca con manchas de color gris oscuro en la región abdominal, en la parte anterior al órgano reproductor y cerca de las hendiduras branquiales. Lo más común es que las manchas se encuentren después de la quinta hendidura branquial, pero no entre ellas. Un distintivo para reconocer a *M. birostris* es que en la zona ventral de

las aletas pectorales existe una franja gris marginal en forma de V, que las delinea (Marshall, 2009) (Figura 1).

Existe también ejemplares melanísticos, los cuales son negros tanto en la zona dorsal como en la ventral. Usualmente presentan una mancha blanca de tamaño y forma distinta en la zona media ventral. Sin embargo, se puede observar manchas redondas en el centro o en la zona abdominal pero ausentes entre las hendiduras branquiales (Marshall, 2009).

Cada individuo posee un patrón de pigmentación único en la superficie ventral, que no varía con el tiempo. Aprovechando este rasgo, los investigadores distinguen a cada animal en programas que usan fotografías como el “photo ID” (Marshall et al. 2011).

1.3. Alimentación:

Al igual que las grandes ballenas y tiburones, las mantarrayas son animales filtradores. Su fuente de alimentación es el plancton, pequeños crustáceos, larvas de pescados copépodos, quetognatos, huevos de pescados (Dewar et al, 2008; Graham et al. 2012). Consumen un promedio de 20 a 30 kg de plancton por día (Stevens, s.f.).

Estos individuos canalizan el agua y la presa a la boca utilizando sus lóbulos cefálicos. El agua es llevada directamente a las branquias donde las branquiespinas atrapan el plancton (Dewar et al, 2008; Stevens, s.f.). Finalmente el agua sale por la cavidad orofaríngea a través de las hendiduras branquiales (Couturier et al, 2012).

A más de alimentarse solas también pueden hacerlo en grupo. Cuando están solas, en aguas ricas en plancton, se colocan en posición vertical y ruedan hacia atrás (barrel rolling). Algunos especímenes usan sus aletas cefálicas para ayudarse con la recuperación de plancton que se hundió en la arena. Mientras que cuando están en grupos forman una cadena, y al momento en que nadan muy juntas a altas velocidades forman algo parecido a un ciclón (Stevens, s.f.).

1.4. Reproducción y características biológicas:

Esta especie es ovovivípara aplacentada, porque la cría nace tras eclosionar de un huevo dentro de la madre (Couturier et al, 2012). Sus embriones se desarrollan en el útero, donde inicialmente se alimentan de la yema y luego de proteínas o leche uterina rica en lípidos, secretada por las vellosidades uterinas (Marshall, 2009).

Dentro de la categoría de elasmobranquios esta especie es una de las que más lento se reproduce (Couturier et al, 2012). Se estima que el período de gestación de *M. birostris* es de 12-13 meses, pero el ciclo reproductivo puede tardar un año o dos. Comúnmente, las hembras dan a luz una sola cría y una misma hembra puede producir otra cría después de 2 a 5 años (Herbert, 2012). Para *M. alfredi* se reportó un máximo de 9 embarazos por cada hembra, a una tasa de $0,41 \text{ año}^{-1}$. El intervalo promedio de natalidad entre las hembras de *M. alfredi* con historial de embarazo fue 3,61 a 3,93 años (Kashiwagi, 2014).

Herbert (2012) propone que las hembras de *M. birostris* están sexualmente maduras alrededor de los 8 a 10 años. Pero Marshall (2013) reporta una edad reproductiva para hembras que está entre los 6-8 años y en machos entre los 5-6 años. Otros estiman que el ancho del disco puede ser un indicativo de madurez; en el caso de machos deben alcanzar 3800 mm y en el de las hembras, 4130 mm (White et al. 2006 citado en Couturier et al, 2012). Kashiwagi (2014) por su lado, estableció que la madurez de *M. alfredi* en hembras basadas en la primera reproducción, ocurre entre los 9-16 años y en los machos la madurez, basada en el desarrollo del clasper, a los 4–9 años.

La reproducción de *Manta* implica un proceso de apareamiento complejo, que consiste en un rito. Rara vez se logra apreciar la conducta de apareamiento en la naturaleza (Yano et al., 1999; Couturier et al, 2012). Sin embargo, en Japón en las Islas Ogasawara durante un buceo, se pudo visualizar el ritual de cortejo. Éste presenta 5 comportamientos distintos:

primero la persecución seguido de una mordida al momento de la cópula, comportamiento post cópula y finalmente la separación (Marshall, 2009; Herbert, 2012; Yano et al., 1999).

La copulación sucede cuando ambos individuos juntan su abdomen. La aleta izquierda pectoral es apretada por la boca del macho y el clasper del macho se inserta en la cloaca de la hembra (Marshall, 2009; Herbert, 2012).

Los recién nacidos no tiene cuidado parental, pesan aproximadamente 20 libras y se alimentan de plancton en aguas superficiales el primer año. Después se mueven a áreas más profundas. Se sabe que los individuos más jóvenes son más sociables y activos, es así que ellos a menudo saltan fuera del agua (Marshall, 2009; Herbert, 2012).

En cuanto a los años de vida, se ha reportado mediante identificación fotográfica a un mismo individuo de *M. birostris* después de 20 años. En el caso de *M. alfredi* en Japón Kashiwagi (2014) reporta que el período de vida es de 40 años; para esto se relacionó una curva de crecimiento con el tamaño del ancho de disco usando el método de Fabens y el modelo de crecimiento de von Bertalanffy. Estos datos corroboran que el género *Manta* es longevo.

1.5. Comportamiento social:

M. birostris comparte su hábitat con otros organismos filtradores como ballenas azules y tiburones ballena. A pesar de ser solitarios, mantienen interacciones de comensalismo con rémoras, y relaciones simbióticas con peces de limpieza (pertenecientes a la familia *Labridae* o peces mariposa entre otros), los encargados de retirar parásitos superficiales y limpiar heridas (Herbert, 2012). Sin embargo, durante la época de reproducción, macho y hembra pasan juntos varios días. Se los observa juntos cuando migran a aguas más calientes, cuando se alimentan o se dirigen a zonas de limpieza corporal (Marshall, 2009).

Hasta el momento no se han distinguido jerarquías o sociedades organizadas (Herbert, 2012).

Según Herbert, (2012) cuando las mantarrayas entran en contacto brusco o sorpresivo con humanos, éstas se alejan manteniendo cierta distancia. En cambio, Marshall en un video de la página oficial sobre el “Proyecto Mantas Ecuador” (2012), afirma que las mantarrayas son inofensivas. No parece que la presencia humana les moleste, ni siquiera cuando les colocan el tag satelital o se toma la muestra de tejido.

Una de las explicaciones es que tiene una depredación natural baja, debido a su gran tamaño. Solo tiburones u orcas se alimentan oportunamente de ellas, pues se han encontrado heridas en su cuerpo. Esta facilidad que tiene *M. birostris* para relacionarse se atribuye a su gran cerebro, mucho más grande que el de cualquier raya o tiburón (Couturier et al, 2012).

1.6. Distribución a nivel mundial y tamaños poblacionales:

M. birostris recorre casi todo los océanos y no ha sido observada por períodos de tiempo prolongados en lugares de agregación. Lo que sugiere que es una especie menos residente, más tolerante a aguas frías con áreas de distribución y migraciones más largas que *M. alfredi* (Marshall et al., 2011; Couturier et al., 2012). Estudios preliminares mediante rastreo satelital, determinan que *M. birostris* realiza migraciones de más de 1000 km (Mundy-Taylor, 2013). Por otro lado, no se han reportado diferencias aparentes en los patrones de movimiento por sexo o por tamaño del cuerpo (Graham et al, 2012).

Las áreas de limpieza de *M. birostris* están cerca de montañas submarinas en aguas oceánicas profundas en donde pasan más tiempo. Razón por la que la ejecución de proyectos para comprender su biología y ecología son complicados (Marshall et al. 2009).

Una de las explicaciones por las que *M. birostris* visita con menos frecuencia o por

períodos de tiempo más cortos sus sitios de limpieza es porque presenta menos marcas de mordeduras de tiburones, tienen menos infecciones de la piel en el área de sus branquias y también porque tienen cargas parasitarias inferiores que *M. alfredi*. Se especula que esto se debe a las diferencias en su piel y estructura dérmica (Marshall, 2009).

Kashiwagi et al. (2011) reporta que Mozambique es el único sitio donde *M. birostris* y *M. alfredi* permanecen en relación simpátrica en lugares de limpieza y alimentación, a lo largo de la costa. En localidades como el Mar Rojo, Sudan, Maldivas, oeste de Australia, Indonesia y Japón mantienen una relación parapátrica. Por otro lado, en Tailandia, Isla de Navidad de Australia, Nueva Zelanda, México, Costa Rica, Colombia y Ecuador, solo se han realizado avistamientos de *M. birostris* (Tabla 1 y Figura 2) (Couturier et al, 2012).

En cuanto a la dirección de los movimientos a largo plazo o agregaciones no son conocidos en su totalidad. Lo que se sabe es que *M. birostris* se agrupan en lugares específicos por temporadas (Rohner et al. 2013). Se infiere que la razón que guía sus movimientos es la productividad o disponibilidad de alimento, estaciones de limpieza corporal y conductas de reproducción (Couturier et al, 2012).

En un estudio de Rohner et al. (2013), a pesar de probarse varias variables ambientales como la temperatura del agua, lugares de buceo y estaciones lunares para predecir la distribución de *M. birostris*. Solo la temperatura fue un aspecto significativo en un modelo estadístico. La razón es que al ser *M. birostris*, una especie menos residente, menos factores ambientales le afectan. *M. birostris* prefiere un rango de temperatura desde 25,1 a 30,06° C; con un 95% de concurrencia en aguas de alrededor de 26,16°C (Graham et al. 2012). Otro rango reportado de temperatura adecuada es de 20 a 28°C con un promedio de 24,68°C (Marshall, 2009).

Se ha logrado determinar ciertas apariciones estacionales de *M. birostris* en áreas templadas y subtropicales como el norte de Nueva Zelanda (Duffy y Abbott, 2003), al sureste de Brasil en el Parque Marino Laje de Santos (Luiz et al. 2009), en Colombia (Mejia-Falla et al, s.f.), en la Península de Yucatán en México (Graham et al, 2012), Islas Azores en Portugal, las islas Similan en Tailandia, Golfo de California y la costa este de Estado Unidos (Couturier et al, 2012), Sri Lanka, Indonesia (Kashiwagi et al. 2011), la Isla de la Plata en Ecuador (Proyecto Mantas Ecuador, 2012) (Tabla 1 y Figura 2). El Ecuador se ha reportado como sitio de agregación de *M. birostris* usado por hembras embarazadas, de las que se tienen registros fotográficos. En relación a los datos satelitales, migraciones internacionales se registran a lo largo de la costa en Perú y al oeste hacia Galápagos (Proyecto Mantas Ecuador, 2012).

Existen sitios a los que *M. birostris* puede volver después de cierto tiempo (fidelidad de sitio) como lo son Indonesia, Hawaii, Mozambique (Graham et al, 2012) y Ecuador (Marshall et al. 2014). De hecho, Marshall (2009) reporta que en Mozambique, un grupo de 101 individuos, 9 fueron observados en 2 de los 5 años que tomó ese estudio y solo uno fue visto en 3 años, siendo más fieles a los sitios las hembras. En el Ecuador en el año 2013 se encontró que 9 mantarrayas observadas ya fueron registradas en el año 2012 (Marshall et al. 2014).

El intercambio de individuos entre subpoblaciones de *Mantas* no está claro, pero la identificación fotográfica que se tiene revela poco intercambio regional (Marshall et al. 2011). Lo que se desconoce totalmente es si logran cruzar a otros océanos (Couturier et al, 2012). Sin embargo, en el estudio durante 23 años (1987-2009) de Kashiwagi, (2014) se reportaron de 5 a 28 (promedio de 12) individuos nuevos por año en todas las etapas de

crecimiento en una población japonesa de *M. alfredi*. Lo que apoyaría de cierta forma la idea de inmigración y emigración de individuos entre regiones.

Mediante estudios a largo plazo en lugares de agregación se afirma que *M. birostris* tiene subpoblaciones regionales de 100 hasta máximo 1000 individuos (Couturier et al, 2012; Marshall, 2009; Manta Ray of Hope, 2014). Por medio de foto-identificación durante 10-20 años en América se ha determinado subpoblaciones pequeñas de menos de 300 ejemplares: al sur de Brasil (Luiz et al. 2009), en México (Islas Revillagigedo e Isla Holbox; Rubin, 2002 citado en Marshall et al. 2011); en la Isla de la Plata, Ecuador (M. Harding unpubl. data 2010). Sin embargo, en el informe de reporte de investigación anual 2013, se registran 1040 individuos diferentes de *M. birostris* desde el año 2010 hasta el 2013 en Isla de La Plata y Bajo de Cope (Marshall et al. 2014).

1.7. Pesca y comercio a nivel mundial:

Durante el período de 2002-2011, la FAO ha reportado que existen varios países alrededor del mundo en donde mantarrayas y rayas son capturadas por la pesca; como Ghana, Mozambique, India, China, Malasia, Costa Rica, México, Tailandia, Perú, entre otros. A pesar de que las capturas totales son desconocidas, existen 3 lugares en donde se tiene cierta información del volumen de pesca. En Indonesia y en Liberia se sabe que las capturas del género *Mantas* son de 17878 toneladas y 1470 toneladas respectivamente. En Ecuador, el valor de capturas de *M. birostris* asciende a 15 toneladas (Mundy-Taylor y Crook, 2013).

Indonesia, Sri Lanka e India tienen la pesca más fuerte, sumando casi el 90% de mortalidad de *M. birostris* (con desembarques de más de 3000 animales anualmente) (Mundy-Taylor y Crook, 2013). Heinrichs et al. (2011) sugiere la existencia de más lugares de pesca de *M. birostris* no conocidos en África, en las costas del Atlántico y

Pacífico. En donde los pescadores no reportan el número de animales que llegan a tierra o confunden los géneros *Mobula* y *Manta* (Mundy-Taylor y Crook, 2013).

La pesca de *M. birostris* y *M. alfredi* no solo es incidental, sino que sirve para el creciente comercio de branquiespinas a nivel internacional (Mundy-Taylor y Crook, 2013). Especialmente en Asia Oriental, en donde son usadas en la medicina tradicional china como un tratamiento anti-inflamatorio, para eliminación de estasis para activar la circulación sanguínea, filtración y eliminación de toxinas (Stevens, s.f.). La gran demanda de branquiespinas impulsa un aumento de la pesca no regulada, en lugares como el sudeste de Asia, India y el este de África (CITES, 2013).

Algunos pescadores, por el bajo valor de la carne de *M. birostris* y *M. alfredi*, desechan los cadáveres al mar después de extraer las branquiespinas (CITES, 2013). En cambio, en otros lugares el cartílago y la piel de las mantarrayas también se comercializa para consumo humano (Heinrichs et al, 2011 citado en Mundy-Taylor y Crook, 2013). CITES (2013) estimó que del género *Mantas* en Asia, se comercializa en promedio anual, 61 000 kg de branquiespinas, y de esto el 30% proviene de *M. birostris*.

Desafortunadamente, este género es un blanco fácil porque sus agregaciones coinciden con zonas pesqueras marinas altamente productivas (CITES, 2013; Graham et al, 2012).

1.8. Estancia de *Manta birostris* en Ecuador

La presencia de *M. birostris* en Ecuador se explica por la existencia de la corriente costera de Humboldt, durante los meses de mayo a noviembre. Los meses de julio a septiembre se caracterizan por ser los más favorables en riqueza marina y productiva, meses que coincide con la presencia de *M. birostris* en el Ecuador (Instituto Oceanográfico de la Armada, 2005). Esta corriente se caracteriza por la presencia de fenómenos de surgencia, que son corrientes de aguas poco profundas que fluyen verticalmente hacia la superficie. (Hurtado,

s.f.). Estas aguas poco profundas son frías (18 °C), tienen alto contenido de oxígeno disuelto y son ricas en nitratos y fosfatos. Esto facilita la proliferación de fito y zooplancton que sirve de alimento a varios animales que visitan las costas ecuatorianas. Es por eso que el Ecuador es un sitio tanto de alimentación, por la alta cantidad de plancton como de limpieza donde varios peces de arrecife removerán parásitos del cuerpo del animal (Proyecto Mantas Ecuador, 2012).

A parte de los recursos alimenticios y de limpieza, la temperatura es otro factor determinante para la presencia de *M. birostris* en Ecuador. Se sabe que la temperatura promedio de mar reportada en el mes de Agosto de 2001 alrededor de la Isla de la Plata fue de 22,8°C (Burgos y Gamboa, 2002). Temperatura que coincide con el rango preferido para *M. birostris* (20 a 28°C) reportado por Marshall (2009).

1.9. Vulnerabilidad de la Especie:

En el 2011, *M. birostris* fue reconocida como una especie migratoria en peligro de extinción a nivel internacional y fue incluida en la Lista Roja de la UICN (Couturier et al, 2012; Mundy-Taylor y Crook, 2013; Marshall et al. 2006). En el mismo año, fue la primera raya en ser incluida en el Apéndice I y II de la CMS (Convención sobre las Especies Migratorias).

Para el 2013, se aceptó la propuesta del Ecuador de incluir a *Manta spp.* en el Apéndice II de la CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). En este apéndice se plantea un mejoramiento en temas de pesca y la toma de datos comerciales, establecimiento de límites de exportación y aplicación de las protecciones nacionales (CITES, 2013; Proyecto Mantas Ecuador, 2012).

La retención y/o comercialización de esta especie está prohibida según reglamentos adoptados por las Maldivas (prohibición de exportación), Filipinas (prohibición de

exportación), México (Nom-029-Pesc-2006, pesca responsable de tiburones y rayas), Ecuador (Acuerdo 093), Australia (Ley de Pesca), Nueva Zelanda (Ley de Vida Silvestre de 1953), Hawaii (Ley 399 Acto 092-09) (CITES, 2013; Marshall et al. 2011). Sin embargo, desembarques ilegales han sido reportados en algunos países, como Filipinas y México (CITES, 2013). Sumado a esto, existen lugares como Japón, la Polinesia Francesa e Indonesia donde se ha perdido el rastro de varios animales monitoreados mediante seguimientos acústicos (Marshall et al 2006 citado en Dewar et al, 2008).

1.10. Diversidad Genética:

Diversidad genética, se define como cualquier medida que cuantifica la magnitud de la variabilidad genética dentro de una población. Se refiere a la variación a nivel de nucleótidos, genes, cromosomas, características bioquímicas o fisiológicas de cada individuo. Proporciona un mecanismo para que las poblaciones puedan adaptarse a su entorno cambiante. Es una fuente fundamental de la biodiversidad, supervivencia y adaptación (Hughes et al. 2008). La variación de la diversidad genética se debe a mutaciones genéticas en uno de los alelos, recombinación, selección natural, deriva génica y el flujo génico, que actúan en las frecuencias alélicas (Ramanatha y Hodgkin, 2002).

La diversidad genética de las poblaciones que se revela mediante marcadores moleculares se mide a través de diversos índices siendo los más usados: número de alelos por locus, polimorfismo, y heterocigosidad. Al estar la diversidad total de una especie compuesta por componentes inmigración y emigración, es necesario saber cómo se distribuye y estructura la variabilidad genética global en y entre poblaciones (González, 2008).

La variación genética es un tema importante en varios programas de conservación, ya que una baja variabilidad genética se asocia con depresión endogámica, acumulación de mutaciones deletéreas y un potencial de adaptación reducida (Frankham et al 2002; McCusker y Bentzen, 2009). El hallazgo de que las especies amenazadas tienen una menor

diversidad comparada con la de especies no amenazadas, ha aumentado la preocupación acerca de las implicaciones de una variación genética baja (Mccusker y Bentzen, 2009).

En términos generales, las especies marinas tienen una mayor diversidad genética que especies de agua dulce o terrestre (Gray, 1997). Pero niveles más bajos de diferenciación genética, probablemente porque existen menos barreras de migración y mayor el flujo de genes (Çiftci1 y Okumuú, 2002). De hecho, se sugiere que las poblaciones marinas probablemente intercambian entre 10 y 100 veces más migrantes por generación que las especies de agua dulce. Los peces marinos cosmopolitas con distribuciones continuas (circumtropicales) muestran mucho menos estructuración genética que las especies con distribuciones discontinuas (Gray, 1997).

1.11. Marcadores Moleculares:

Un marcador molecular se define como un segmento particular de ADN que muestra diferencias a nivel de genoma. Los marcadores moleculares pueden o no estar en correlación con la expresión fenotípica de un rasgo (Agarwal et al. 2008). El segmento de ADN puede provenir de un sitio conocido o no del ADN, sitio que podría corresponder o no a una secuencia que exprese un gen (Jain y Minocha, 2000).

Algunas de las condiciones deseables que deben tener los marcadores moleculares son: estables, económicos en su desarrollo y aplicación, deben ser altamente repetibles entre diferentes tejidos. No deben verse afectados por factores como el ambiente, pleiotropismo, epistasis o el desarrollo del individuo. Deben ser polimórficos, es decir que revele altos niveles de variabilidad alélica y su expresión debe ser co-dominante (Agarwal et al. 2008).

Existen dos tipos de marcadores moleculares según las técnicas usadas (Agarwal et al. 2008). Aquellos basados en la hibridación del ADN y los basados en la amplificación de secuencias de ADN mediante PCR. Los basados en la PCR, a su vez se los divide según el

tipo de primers que se usen, sean estos arbitrarios o específicos. Entre los que usan primers específicos están los microsatélites o SSR (Simple sequence repeat) (Rocha, 2003)

1.10.1 Microsatélites o SSR:

Dentro del genoma de los organismos superiores existen tres tipos de secuencias repetidas en tándem con una unidad que se repite de pequeño o mediano tamaño (ADN satélite, minisatélites, microsatélites) (Semagn et al. 2006). Los microsatélites son las secuencias de ADN cortas de entre 2-6 bp (motivos) repetidas en tándem de 10 a 100 veces (Semagn et al. 2006). Están bordeadas por secuencias altamente conservadas a nivel de especie. Por esta razón es que se pueden diseñar primers específicos para estas regiones (Rocha, 2003). La variación se manifiesta como diferencias en longitud entre alelos del mismo locus, a causa del número diferente de repeticiones del motivo. Se estima que la tasa de mutación varía entre 10^{-2} y 10^{-5} por generación. Esto se explica por el entrecruzamiento desigual durante la recombinación o por el deslizamiento que realiza la polimerasa durante la replicación del ADN, siendo ésta última la más aceptada (Eguiluz, 2014).

Este marcador es una buena opción para estudios moleculares ya que es altamente preciso y polimórfico hasta entre líneas muy relacionadas, requiere poca cantidad de ADN, es fácilmente automatizable y reproducible. Los SSR al ser marcadores codominantes, son excelentes para el estudio de genética poblacional. Las limitaciones de este método son el costo y esfuerzo en el diseño de los primers ya que se requiere información previa del genoma (Semagn et al. 2006).

Los microsatélites se han sido utilizado como marcadores moleculares en diversos estudios de análisis forenses, selección asistida, identificación de especies, determinación de patrones migratorios, reconstrucciones filogenéticas, construcción de mapas genéticos, análisis poblacional y variabilidad genética (Eguiluz, 2014).

1.11 Estudios de diversidad genética y estructura poblacional mediante SSRs:

Desde 1990, los marcadores genéticos se hicieron más populares para la identificación de la variación genética y la estructura de las poblaciones. Se ha reportado el uso de marcadores microsatélites en varias especies marinas y de agua dulce para análisis genéticos poblacionales. Por ejemplo, para la determinación de estructura poblacional y diferencias genéticas entre poblaciones de varias localidades en peces como *Dissostichus eleginoides*, así como en especies de tiburones como *Rhincodon typus* (Schmidt et al. 2012), *Negaprion brevirostris* (Feldheim et al. 2001), *Sphyrna lewini* (Castillo et al. 2012). De igual forma se ha diseñado microsatélites para determinar polimorfismo genético en varios loci en especies del género *Thunnus* (Abdul-Muneer, 2014). Datos obtenidos de índices de diversidad genética y estructura poblacional de un pez pelágico *Rastrelliger kanagurta* usando SSR, se han obtenido con el propósito de establecer una línea base de información genética de la especie para apoyar su gestión pesquera y determinar unidades de conservación (Munpholsri et al. 2013).

Antes del diseño de SSR para *M. alfredi*, el único estudio molecular dirigido al género *Manta* lo realizó Clark (2001). La investigación consistió en determinar estructura poblacional del género *Manta* usando ADN mitocondrial con 18 muestras repartidas en el océano Atlántico y Pacífico este y oeste.

A pesar de que el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites ha sido de gran ayuda en estudios de diversidad genética de especies animales; en Ecuador no existe un estudio de caracterización molecular de mantarrayas. Por esta razón, la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar la diversidad genética de 57 muestras de *Manta birostris* que visitaron la Isla de la Plata con el uso de 8 primers heterólogos.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo General:

- Caracterizar la diversidad genética de una colección inicial de mantarrayas, *Manta birostris*, que visitaron la Isla de la Plata, Ecuador, durante los años 2010-2012 mediante el uso de microsatélites.

2.2. Objetivos Específicos:

- Estandarizar un protocolo de extracción de ADN a partir de cantidades pequeñas de tejido de mantarrayas.
- Estandarizar las condiciones de PCR para primers SSR reportados por Kashiwagi et al. (2012) para estudios de mantarrayas.
- Determinar la diversidad genética de una muestra de *Manta birostris* colectadas en la Isla de la Plata basado en frecuencias y en distancias genéticas.
- Analizar la estructura poblacional de la muestra recolectada de *Manta birostris* de la Isla de la Plata, Ecuador.

3. ÁREA DE ESTUDIO:

El parque Nacional Machalilla se ubica en la zona centro occidental de la Región Costera del Ecuador, al suroeste de la provincia de Manabí. Su territorio abarca a la Isla de La Plata. El Parque tiene una extensión de 55 092 hectáreas, repartidas en la zona continental, las Islas de la Plata y Salango y dos millas a lo largo del filo costero y alrededor de las islas (Vinuesa, 2007; Arcos y Ayala, 2001).

Refiriéndose a la Isla de la Plata, en donde se tomaron las muestras de *M. birostris*, ésta cuenta con un espacio insular de 14,2 km² de superficie. Se ve influenciada por la corriente de Humboldt de mayo a diciembre y por la corriente cálida del Niño de diciembre a mayo (Vinuesa, 2007; Arcos y Ayala, 2001).

Las muestras fueron recolectadas por los investigadores del “Proyecto Mantas Ecuador”. Michel Guerrero y Andrea Marshall, cumpliendo con lo estipulado en el permiso N° 008 RM-DPM-MA entregaron las muestras al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, en donde se realizaron los análisis moleculares.

4. JUSTIFICACIÓN:

Las mantarrayas tienen un rol ecológico en el ciclo global del carbono. Así, el fitoplancton utiliza energía solar para convertir el dióxido de carbono atmosférico en energía. Este fitoplancton es el alimento para el zooplancton que, a su vez, es consumido por mantarrayas. Los residuos excretados por mantarrayas se depositan en el fondo del océano, lo que puede ayudar a regular el cambio climático global mediante el secuestro de carbono atmosférico en las profundidades del océano (MantaWatch Internship Program, 2012).

Las mantarrayas son una gran atracción turística durante los buceos realizados en la Isla de la Plata, sitio de agregación de un gran número de individuos (Proyecto Mantas Ecuador, 2012). Es por esto que, la Isla de la Plata es uno de los mejores lugares para estudiar a *M. birostris* en su hábitat natural (Tabla 1) (Proyecto Mantas Ecuador, 2012).

Sin duda, las mantarrayas son un recurso natural valioso, que ofrece un considerable potencial económico para el país (Mundy-Taylor y Crook, 2013). De hecho, Marshall (2013) afirma que los beneficios económicos del turismo a largo plazo superan rendimientos a corto plazo de la pesca (Marshall 2013).

Lamentablemente dentro de los datos de actividad pesquera reportados por la FAO, el Ecuador registra capturas de 15 toneladas de *M. birostris* entre los años 2002-2011 (Mundy-Taylor y Crook, 2013).

Frente al gran potencial turístico pero alta caza de *M. birostris*, es preciso describir la diversidad genética de la especie y de ser posible la estructura poblacional, hasta ahora desconocida en el Ecuador. La información genética es importante, ya que mientras mayor

diversidad genética posea una especie, mayor será su capacidad de adaptación a distintas condiciones, de lo contrario, una especie podría ser más vulnerable a la extinción (Clark, 2002).

La información de este estudio nos permitirá tener datos preliminares de la diversidad genética de la muestra colectada de *M. birostris* que visitan al Ecuador. A partir de estos datos se podrán determinar posibles programas de conservación. Más aun después de que *M. birostris* fue colocada en la Lista Roja de la UICN debido a perturbaciones antropogénicas en sus hábitats (Couturier et al, 2012; Mundy-Taylor y Crook, 2013; Marshall et al. 2006).

5. MATERIALES:

5.1. Extracción de ADN a partir de muestras de tejido de *M. birostris*:

- Pedazos de tejido cutáneo y muscular de mantarrayas
- Buffer de lisis (10mM NaCl - 10 mM Tris - 25 mM EDTA - pH 8)
- Proteinasa K (Invitrogen)
- Acetato de Amonio 7,5 M
- Etanol frío 100%
- TE 1X (10mM Tris base - 1mM EDTA - pH 8)
- Tubos Eppendorf 1,5 ml
- Balanza analítica (Sartorius LA 230 S)
- Cámara de flujo laminar (Labconco)
- Incubadora con agitación (Barnstead)
- Centrifuga refrigerada (Eppendorf 5415 D)

5.2. Cuantificación de ADN:

- NanoDrop 1000 (ThermoScientific)
- Buffer TE (10mM Tris base - 1mM EDTA - pH 8)
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)

5.3. Electroforesis en geles de agarosa:

- SeaKem LE Agarosa
- TBE 1X (89,15 mM Tris base – 88,95 mM Ácido Bórico - 2,54 mM EDTA)
- SYBR Safe (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder 100 bp (Invitrogen)
- EC360M Electrophoretic Gel System (BIORAD)
- MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit (C.B.S Scientific)
- Fuente de Poder EPS -300 II (C.B.S Scientific)
- Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD)

5.4. Amplificación de regiones microsatélite SSR mediante PCR:

- Pares de primers SSR (Tabla 2)
- Taq DNA polimerasa 5U/μL (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl₂ 50mM (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- dNTP's 10 mM (Invitrogen)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)

- T Personal Thermocycler (Biometra)
- ADN extraído de tejido de *M. birostris*

5.5. Electroforesis en geles de acrilamida:

- UltraPure™ Acrylamide (Invitrogen)
- UltraPure™ N,N'-Methylenebisacrylamide (Invitrogen)
- TBE 1X (89,15 mM Tris base – 88,95 mM Ácido Bórico - 2,54 mM EDTA)
- UltraPure™ UREA (Invitrogen)
- Detergente Alconox
- Cleaning sheets-Kimwipes (Kimberly-Clark)
- Etanol 70%
- Rain.X™
- Sigmacote® (SIGMA)
- Solución para tratamiento de vidrios (etanol 96% y ácido acético glacial 0.5%).
- Bind-Silane (3-Trimethoxysily-propyl-methacrylate 98%) (SIGMA-ALDRICH).
- Persulfato de amonio (J.T. Baker)
- UltraPure™ TEMED (N-tetramethylethilenediamine) (Invitrogen)
- Buffer de carga para pre-corrida (25% Glicerol, 0,1% Azul de Bromofenol)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder 10bp (Invitrogen)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- T100 Thermal Cycler (BIORAD)
- Sequi-Gen Cell GT System (BIORAD)

- Fuente de poder PowerPac HV (BIORAD)

5.6. Tinción con Nitrato de Plata:

- Solución fijadora y de parada (200ml de alcohol absoluto (J.T. Baker), 10ml de ácido acético glacial (MERCK) y 1790ml de agua destilada).
- Solución de tinción (4g de nitrato de plata (FISHER), 3ml de formaldehído 37% (MERCK) y 2000ml de agua destilada).
- Solución reveladora (30g de hidróxido de sodio (MERCK), 4 ml de formaldehído 37% (MERCK) y 2000ml de agua destilada).
- Cámara fotográfica (Canon XPOSZ)
- Transiluminador de luz blanca

6. MÉTODOS:

6.1. Obtención de muestras de tejido de *M. birostris*:

La toma de todas las muestras pertenecientes al Parque Nacional Machalilla en la provincia de Manabí se realizaron cumpliendo con los requerimientos del permiso de investigación N° 008 RM-DPM-MA otorgados por el Ministerio del Ambiente para el “Estudio sobre los movimientos migratorios y el uso de hábitat de la población de Mantarraya (*Manta birostris*) en las aguas costeras de la Isla de la Plata y sus alrededores, Manabí, Ecuador del “Proyecto Mantas Ecuador” del instituto NAZCA de investigaciones Marinas.

Los encargados de la toma de muestras fueron los investigadores del “Proyecto Mantas Ecuador”. Michel Guerrero y Andrea Marshall, entregaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ, 57 muestras de tejido muscular de *M. birostris* almacenadas en DMSO dentro de tubos sellados y debidamente rotulados.

Se recolectaron 57 muestras de tejido de *M. birostris* de la Isla de la Plata, en 3 años consecutivos. En el 2010, se recolectaron 4 muestras (USFQ 1-USFQ 4); en el 2011, 10 (USFQ 5-USFQ 14) y en el 2012, 43 (USFQ 15- USFQ 57) (Anexo 1).

6.2. Extracción y cuantificación de ADN de *M. birostris*:

El ADN genómico se extrajo a partir de tejido de *M. birostris* mediante el protocolo de Broderick et al. (1984 citado en Kashiwagi et al. 2012) pre estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

Para el protocolo primero se cortó y pesó aproximadamente 0,01 g de tejido muscular en un tubo eppendorf 1,5 ml. En el mismo tubo se añadió 495 µl de buffer de lisis más 5 µl de proteinasa K. Se mezcló por inversión del tubo varias veces y se incubó 16-19 horas a 56°C con agitación hasta que la mayoría del tejido fuera lisado. Una vez que se completó la lisis, se agregó 250 µl de acetato de amonio frío y se mezcló por inversión repetidas ocasiones. Luego se centrifugó 20 minutos a 13200 rpm a una temperatura de 4°C.

Se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf rotulados, sin tocar el precipitado de la base del tubo. Si esto sucedía se volvía a centrifugar 10 minutos más. Se añadió 750 µl de etanol 100% frío y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 4°C por 20 minutos a 13200 rpm. Se observó el pellet en la base del tubo eppendorf. Se removió el sobrenadante y se añadió 500 µl de etanol frío al 100%. Se lavó el pellet suavemente hasta que se despegó de la base del tubo y se centrifugó durante 20 minutos a 13200 rpm a 4°C. Con la ayuda de una micropipeta se removió la mayor cantidad de etanol de cada tubo y se los colocó en la cámara de flujo laminar hasta que todo el etanol se evaporó. Finalmente, se resuspendió el ADN en 30-50 µl de TE 1Xy se almacenó a -20°C hasta ser usado.

La concentración de ADN se determinó usando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) (Anexo 1). Para evaluar la pureza del ADN se usó los índices de absorbancia 260/280, 260/230. Valores de 1,8 para el índice 260/280 y 2,0 o 2,2 para el índice de 260/230 indica pureza del ADN (NanoDrop Technologies, 2007). La calidad de ADN se determinó mediante geles de agarosa al 1,5% (80V, 45 min) con el uso de SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) y fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD) (Figura 3).

Las muestras de las que se obtuvo grandes concentraciones de ADN, fueron diluidas a una concentración final de 40 y 10 ng/μl para su posterior uso en las reacciones de PCR y se almacenaron junto con los stocks (concentración original) a -20°C.

6.3. Selección de primers y amplificación de regiones microsatélites:

Kashiwagi et al. (2012) diseñaron 10 pares de primers para regiones microsatélites en la especie *M. alfredi* y estandarizaron un protocolo de PCR con una temperatura de annealing de 55°C. Estos pares de primers fueron probados en especies relacionadas como *M. birostris*, *Mobula japonica*, *Mobula thurstoni*, *Mobula tarapacana* para determinar cuáles de éstos se podían transferir a varias especies. De estos 10 pares de primers diseñados por Kashiwagi (et al. 2012) reportan que 9 amplificaron en *M. birostris*.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 μl, compuestos por Buffer de PCR (1X) (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 1 mg/ml BSA, 0,4 mM de dNTPs (Invitrogen), 5μM de cada primer, 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen) y entre 40 a 10 ng de ADN genómico según el primer (Tabla 2). El programa de ciclado consistió en una denaturación inicial a 94°C por 5 min., seguido de 37 ciclos a 94°C por 30 segundos, 45 segundos a la temperatura previamente estandarizada (Tabla 2), una

extensión a 72°C por 90 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos (Kashiwagi et al., 2012).

6.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata:

Los productos de las reacciones de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% o al 4% (Tabla 2) con el uso del sistema Sequi-Gen™ (Biorad) y un protocolo estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

Primero se lavó cuidadosamente el vidrio 4 veces con el detergente Alconox. Se enjuagó con agua caliente y se dejó secar. Después se limpió el vidrio con etanol al 70%, se lo trató de forma homogénea con 3 ml de una solución Bind-Silane (SIGMA-ALDRICH) y se dejó secar. En seguida, el vidrio de la cámara se limpió con etanol al 70% y se trató de forma homogénea con 3 ml de Rain.X™ y después con 800 µl de Sigmacote® (SIGMA).

Para armar la cámara, se limpiaron todas sus partes (brazos, separadores, base de polimerización y peine) con etanol al 70% y se siguieron las especificaciones del fabricante. Cuando la cámara estuvo armada se inyectó 100 ml de acrilamida al 6% (5M Urea y acrilamida/bisacrilamida 19:1), mezclada con 545 µl de persulfato de amonio 10% y 109 µl de TEMED. Para geles de 4%, se tomó 66,6% de la solución de acrilamida 6% y a esto se le añadía 4,4% TBE 10X en un volumen de 100 ml, de igual forma se lo mezclaba junto a 545 µl persulfato de amonio y 109 µl TEMED antes de inyectar dentro de la cámara. En seguida se introdujo el peine con las puntas hacia afuera para formar el frente de corrida y se dejó polimerizar el gel durante una hora.

Transcurrido este tiempo, se pasó el gel de la base de polimerización a la base de corrida en posición vertical. Se colocó TBE 1X caliente: 400 ml dentro de la base de polimerización y 1100 ml dentro de la cámara. Se retiró el peine, se limpió el frente de corrida de restos de

úrea con la pipeta Pasteur y se formó los pocillos introduciendo el peine con las puntas hacia abajo, se limpió de nuevo la urea con la pipeta Pasteur. Para la pre-corrída se cargó 1 μ l de buffer de carga saltando un pocillo para descartar filtraciones. Se programó la fuente de poder a 80 Watts por 30 minutos.

Se preparó las muestras de ADN añadiéndoles 1 μ l de Blue Juice 10X (Invitrogen) a cada uno de los productos de PCR y se preparó también ladder con 27,5 μ l de agua de PCR, 2,5 μ l de Blue Juice 10X y 5 μ l de ladder 10 bp (Invitrogen). Finalizada la pre-corrída se cargó 5 μ l de las muestras y 3 μ l del ladder 10bp (Invitrogen), denaturados a 95°C durante 5 minutos. Las condiciones de la electroforesis consistieron en dos horas y media a tres a 80 Watts y a una temperatura de 50°C.

El revelado con nitrato de plata en base al protocolo de Benbouza (2006), se realizó después de finalizada la corrída, de la siguiente forma. Se separó el vidrio (con el gel adherido en su superficie) de la cámara y se dejó en reposo durante 5 minutos en una bandeja con una solución fijadora fría. Luego con las luces apagadas, se colocó el vidrio con el gel cara arriba en una solución de tinción por 7 minutos en agitación constante. Todavía en oscuridad, se lavó el vidrio 8 segundos con 2 litros de agua destilada. Se pasó el vidrio a la solución de revelado por 7 minutos con agitación leve, revisando que el gel no se despegue. En seguida se llevó el vidrio a la solución fijadora por 3 minutos sin agitación y con luz. Finalmente se realizó un segundo lavado con 2 litros de agua destilada y se dejó secar el gel en posición vertical a temperatura ambiente toda la noche para después ser analizado.

6.5. Toma de datos y elaboración de matrices alélicas:

La toma de datos se realizó colocando el vidrio, con el gel adherido a él, en el transiluminador de luz blanca. Primero se identificó los alelos a ser incluidos en el análisis

basado en el tamaño esperado. Para determinar el tamaño exacto de los alelos se realizó una regresión lineal tomando como base el tamaño de los fragmentos del ladder. El rango de tamaños esperados y analizados en pares de bases de los alelos se muestra en la Tabla 2. Cabe mencionar que los tamaños esperados reportados por Kashiwagi et al. (2012) consideraban unas colas adicionales en el extremo 5': los primers forward tenían un segmento GTTT extra y los primers reverse tenían un "CAG tag" (5'-CAGTCGGGCGTCATCA-3'). La razón por la que colocó un CAG tag es para permitir el uso de un tercer primer marcado cuya secuencia sea complementaria a la secuencia de CAG tag y así facilitar la detección del fragmento. Por esta situación se restó 20 pares de bases a los tamaños esperados reportados.

Para construir la matriz alélica, en una hoja de Excel, se colocó en las columnas el nombre de los 8 loci, en las filas el código de los individuos y a cada alelo se le asignó un número entero. A partir de esta matriz alélica se realizó tanto el análisis genético como poblacional con diferentes softwares.

6.6. Análisis de diversidad genética y estimación de la estructura poblacional de mantarrayas (*M. birostris*) de la Isla de la Plata:

En cuanto a la diversidad genética se calcularon valores como: frecuencia alélica, número de alelos diferentes (N_a), número de alelos efectivos (N_e), índice de Shannon (I), heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e), índice de fijación (F), probabilidad de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) usando el software GenAlEx 6.501 (Peakall y Smouse, 2012). No se realizaron análisis de distancias genéticas de Nei y estadísticos F (F_{st}) de Wright o análisis de varianza molecular (AMOVA), ya que el muestreo dentro de los tres años fue heterogéneo y no resulta adecuado realizar pruebas estadísticas confiables si se las divide por años.

Con el software DARwin 5.0.158 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006) se construyó una matriz de distancia o de disimilitudes con el método de simple matching y con un total de 500 bootstraps. Con esta matriz se creó un dendrograma usando el método Neighbor Joining (unweighted) para determinar los agrupamientos o relaciones genéticas entre los individuos y un PCoA con métodos factoriales para visualizar la diversidad y dispersión de *M. birostris* en base a distancias Euclidianas.

En relación a la interpretación de la estructura poblacional se usó el programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) basado en inferencias bayesianas. Para ello se realizó varias corridas, probando valores de K (número supuesto de poblaciones) entre 1 y 8, con 10 iteraciones para cada valor; con un máximo de 60000 pasos de burning y 60000 pasos de cálculos de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Primero se intentó realizar el análisis sin colocar información previa de los años en que las muestras fueron colectadas y después se probó dividiendo a las muestras según los 3 años: 2010, 2011 y 2012 de recolección. El número de subpoblaciones o el K óptimo, se obtuvo mediante el doble logaritmo natural de la probabilidad de cada K (delta K) (Evanno *et al.*, 2005), en un programa en línea *Structure harvester*.

Los alineamientos de los resultados de las 10 iteraciones para el K óptimo, se generaron en el software CLUMPP utilizando un algoritmo *greedy* (Jakobsson y Rosenberg, 2007) para obtener una matriz consenso. Con esta última y el software Distruct 1.1 (Rosenberg, 2002) se visualizó los gráficos de la estructura poblacional más factible según los datos introducidos.

7. RESULTADOS:

7.1. Extracción y cuantificación de ADN de tejido de *M. birostris*:

Se extrajo el ADN de las 57 muestras empezando por las que tenían mayor cantidad de tejido. A pesar que se obtuvo ADN de las 57 muestras, no todas presentaron concentraciones de ADN similares, siendo el rango muy amplio entre 6,9 -2663,9 ng/ μ l (Anexo 1). Los valores para los índices de absorbancia 260/280, 260/230 variaron entre 1,68-2,08 y 0,38-2,28 respectivamente (no se muestran estos valores). Basados en estos datos, no todas las muestras presentaban ADN de alta calidad.

En la electroforesis de agarosa al 1,5% para comprobar la integridad del ADN se observaron bandas de alto peso molecular. Esto demostró que el ADN genómico no estaba degradado (Figura 3).

7.2. Amplificación de regiones microsatélites:

Se probó 9 pares de primers diseñados para *M. alfredi* pero que también amplificaron regiones microsatélites en ADN de *M. birostris* (Kashiwagi et al. 2012). De los 9 pares de primers solo 8 presentaron bandas en los geles de poliacrilamida en este estudio (Figuras 4 y 5). A pesar de que se intentó varias pruebas cambiando algunas variables en la PCR, la amplificación no fue exitosa para el locus 9 (MA41- JX269150).

Además fue necesario estandarizar la reacción de PCR y temperatura de annealing para cada par de primers, mediante PCR de gradiente debido a la presencia de bandas inespecíficas observadas en el gel de acrilamida (Tabla 2).

7.3. Diversidad genética de las muestras de *M. birostris* en años consecutivos:

Se obtuvo un total de 46 alelos para los 8 loci en las 57 muestras. Ninguno de los 8 loci fue monomórfico pues el número de alelos por locus fue de 3-11. Los loci más informativos

fueron MA14 con 11 alelos y MA30 con 9 alelos (Tabla 2). En 10 muestras no se tuvo éxito en la amplificación para los 8 loci. Una de las muestras críticas fue USFQ 8, de la que no se logró obtener datos de 5 loci (62.5%).

Con el objetivo de determinar genotipos, se analizó la información de los 8 loci para las muestras de los tres años y se encontró que se había muestreado 47 individuos diferentes. Solo para este análisis se descartó las 10 muestras que no contaban con información de algún loci, pero para el resto de análisis se incluyó a estas muestras ya que los softwares (GenAlEx 6.501, Darwin y Structure 2.3.4) pueden manejar los datos faltantes.

7.3.1 Análisis basado en frecuencias:

Los parámetros usados para evaluar la diversidad genética de los 57 individuos se presentan en las Tablas 3 y 4. Estos fueron: número promedio de alelos efectivos, índice de fijación, el índice de Shannon, la heterocigosidad y el equilibrio de Hardy-Weinberg.

El número de alelos efectivos se define como el número de alelos igualmente frecuentes que mantendrían el valor de la heterocigosidad observada. En otras palabras, mide la uniformidad en frecuencia de los alelos más comunes (Allendorf et al., 2013). El valor promedio de alelos efectivos para la muestra de *M. birostris* en el Ecuador fue de 3,08, que resulta menor a 4,375 que fue el número promedio de alelos observados para la misma muestra.

El índice de fijación varía entre -1 a +1. Peakall y Smouse (2009) indican que valores cercanos a 0 se explican cuando el apareamiento es al azar. Mientras que los valores positivos altos indican consanguinidad o alelos nulos no detectados. Los valores negativos indican que los individuos analizados son heterocigotos en su mayoría, debido al apareamiento selectivo o a la selección de heterocigotos (Peakall y Smouse, 2009). En este estudio el valor obtenido fue -0,098 para este índice, lo que indicaría apareamiento

selectivo o selección de heterocigotos, según lo establecido por Peakall y Smouse (2009). Sin embargo este valor negativo puede ser resultado del número reducido de muestras (Tabla 4).

El índice de Shannon, es un parámetro usado en estudios de diversidad genética basado en la riqueza alélica (Mehdi et al. 2011). En este caso, el valor promedio obtenido para el índice de Shannon fue de 1,16; lo que indica una alta variabilidad alélica dentro de las muestras estudiadas.

Del mismo modo, el valor de la heterocigosidad esperada fue alto para los tres años de muestreo, con un promedio de 0,614. Lo que corrobora que las muestras estudiadas de *M. birostris* presentan una alta diversidad genética. Se debe tomar en consideración que estos valores pueden verse influenciados por el bajo número de muestras.

Para determinar si los loci analizados estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó una prueba estadística de chi-cuadrado. Lo que se obtuvo es que 3 locus MA21, MA15 y MA30 no se mantienen equilibrio (Tabla 3), a diferencia del resto que si están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

7.3.2 Análisis basado en distancias genéticas:

Aplicando el método de Neighbor Joining, se construyó un dendrograma en el que se busca minimizar la longitud de las ramas dentro del árbol cuando agrupa a los vecinos (Acero, 2007). En este estudio se obtuvo un dendrograma Neighbor Joining, en donde las 56 (excluyó la muestra USFQ ya que tenía más de 50% de missing data) se organizaron en tres grupos (Figura 6). Dos de estos grupos (1 y 2) reúnen la mayor cantidad de individuos y el tercero es un grupo no resultado que agrupa solo 3 muestras (USFQ33, USFQ 25, USFQ 27).

El análisis de PCoA, que trata de posicionar dos objetos en un espacio dimensional conservando o ajustando lo mejor posible la distancia generada en la matriz de disimilitud (Analysis of ecological distance by ordination, s.f), demostró que los 56 (excluyó la muestra USFQ ya que tenía más de 50% de missing data) individuos se encuentran dispersos en los cuatro cuadrantes (Figura 7).

7.4. Estructura poblacional de mantarrayas (*M. birostris*) de la Isla de la Plata:

El valor óptimo de K que se obtuvo fue 2, cuando se usaron altos valores de MCMC y burning. En la Figura 8 se visualiza un gráfico consenso de la estructura poblacional generado en el software CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007) y Distruct 1.1 (Rosenberg, 2002), en el cual se observan dos franjas de colores que ocupa cada una casi el 50% del rectángulo. Esto indicaría que las 57 muestras estudiadas no tiene una estructura poblacional, ya que los coeficientes de asignación para los individuos son similares.

8. DISCUSIÓN:

8.1. Extracción de ADN y amplificación de regiones microsatélites:

El protocolo de extracción de Broderick et al. (1984 citado en Kashiwagi et al. 2012) pre estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito fue efectivo. Se logró obtener ADN a partir de muestras pequeñas 0,0019 hasta 0,0172 gramos (Anexo 1). Algunas muestras de ADN, no eran de buena calidad y el volumen recuperado era limitado. Esto provocó que en algunos casos no hubiera suficiente ADN puro para la amplificación con todos los primers.

Referente a las muestras de *M. birostris*, las del 2010 y las del 2011 tenían una consistencia más blanda comparada con las muestras del 2012, posiblemente porque se trataba de mucus junto con poco tejido muscular, lo que dificultó la extracción de ADN.

En cuanto a la forma de conservación de las muestras en DMSO, se sabe que en estudios realizados en elasmobranquios como *Sphyrna lewini* (Castillo et al., 2012; Daly-Engel et al. 2012), *Rhincodon typus* (Schmidt et al. 2012), *Carcharhinus leucas*, *Ginglymostoma cirratum* (Castro, 2009), no se han reportado inconvenientes al extraer el ADN de muestras de tejido para realizar posteriores análisis moleculares. Por lo que las muestras de tejido de *M. birostris* para este estudio fueron conservadas adecuadamente.

Se sabe que los marcadores microsatélites son usados para estudiar la estructura genética de las poblaciones naturales (Balloux, y Lugon-Moulin, 2002). De hecho han sido útiles para estimar la demografía de las poblaciones marinas (Daly-Engel et al. 2012) y se han convertido en una herramienta para investigar poblaciones de elasmobranquios (Heist, 2004; Portnoy, 2010 citado en Couturier et al. 2012). Una de las ventajas en estudios genéticos es que sólo una pequeña muestra de tejido de animales vivos o fallecidos es suficiente para obtener ADN (Heist, 2004 citado en Couturier et al. 2012).

De los 9 marcadores microsatélites probados, solo se obtuvo datos de 8 de ellos. A pesar de que se cambiaron ciertas condiciones de la PCR para lograr que el primer 9 (MA41-JX269150) amplificara como concentración de $MgCl_2$, temperatura de annealing y hasta se probó un PCR touchdown, no se logró encontrar bandas claras en las muestras analizadas. Más bien aparecían bandas en tamaños no reportados. Esto posiblemente puede deberse a que las regiones flanqueantes de los microsatélites pueden sufrir mutaciones, lo que da lugar a alelos nulos que no se amplifican mediante PCR ya que esta regiones dejan de ser complementarias a los primers usados (Portnoy y Heist, 2012).

En los 8 primers analizados los rangos de tamaño considerados se asemejan a los reportados por Kashiwagi et al. (2012) a excepción de los dos primers MA15/JX269146 y MA30/JX269148 que difieren ligeramente (Tabla 2). Además en estos dos primers se

encontraron varias bandas en el gel de acrilamida, pero se analizaron aquellas que más se acercaban con el tamaño esperado. Estas diferencias de rangos reportados y obtenidos, se podrían explicar por la existencia de mutaciones que pueden originar cambio de tamaño en los alelos (Portnoy y Heist, 2012) o porque Kashiwagi et al. (2012) probó los 9 primers con dos muestras de *M. birostris*, una de Mozambique y otra de Japón, pero no con muestras del Ecuador.

En el presente estudio se reportan varias temperaturas de annealing para cada par de primers (Tabla 2), situación que no sucede en el estudio de Kashiwagi et al. (2012). Una de las posibles explicaciones podría ser la adición de segmento GTTT extra a los primers forward y una cola “CAG tag” a los primers reverse por parte de Kashiwagi et al. (2012). Además del uso de un tercer primer marcado para facilitar la identificación de la región amplificada. Otra posible explicación es el uso de diferentes reactivos en la PCR, Kashiwagi et al. (2012) reporta haber usado Q-solution, que es un aditivo, usado cuando el molde de ADN a amplificar tiene un alto contenido de GC. Se sabe que esto afecta la temperatura de annealing de primers. Además usa un Master Mix (Qiagen) que contiene concentraciones pre-optimizadas de HotStarTaq polimerasa, MgCl₂, dNTPs y un buffer (Qiagen, 2013). Es conocido que la temperatura de annealing se ve afectada por la concentración de sales presentes en el buffer y por los requisitos de funcionamiento de la polimerasa usada (New England Biolabs, 2014).

8.2. Diversidad genética:

Un dato interesante es que en los tres años de recolección de muestras de *M. birostris* no se repite el genotipo de ningún individuo, esto quiere decir que se han muestreado 47 ejemplares diferentes (solo para este análisis se excluyeron 10 muestras de las que no se tenía información completa de los 8 loci). Consecuentemente, en este estudio no se pudo

hacer inferencias sobre fidelidad de sitio, primero porque no se muestreó al mismo individuo y por el bajo número de muestras. Sin embargo, Marshall (2009; et al. 2014) si reporta fidelidad de sitio de *M. birostris* tanto en Mozambique (6 años de estudio); como en el Ecuador (3 años de estudio). Por lo que se puede pensar que si el período de recolección de muestras en el Ecuador hubiese sido más prolongado y el número de muestras hubiesen más grande para todos los años; posiblemente se hubiese podido muestrear al mismo individuo más de una vez.

Debido a que no existen estudios publicados de diversidad genética de *M. birostris* o *M. alfredi*, se tomó los datos no procesados de la tesis de Doctorado de Tom Kashiwagi (2014) relacionados con 60 muestras de *M. alfredi* y se los analizó con el software GenAlEx 6.501 (Peakall y Smouse, 2012). La razón por la que los datos de *M. alfredi* pueden compararse con los de *M. birostris*, es porque son especies muy cercanas. Pues se ha demostrado mediante un estudio molecular, basado en marcadores mitocondriales y nucleares, que la especiación y la dispersión de estas especies pudo haber ocurrido hace 0,5 o 1 millón de años (durante los ciclos glaciales del Pleistoceno) (Kashiwagi, 2014).

Vale mencionar que solo se tiene información genética de dos agrupaciones pequeñas de especies de *Manta* (Japón y Ecuador) de manera que no se puede generalizar resultados y solo plantear posibles hipótesis.

Comparando los valores obtenidos en este estudio con las 57 muestras de *M. birostris* y los reportados por Kashiwagi et al. (2012) y Kashiwagi (2014) para *M. alfredi*, se visualiza que los valores de los índices heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada, número de alelos efectivos para cada locus no se asemejan como en los loci 2, 3, 4, 6 y 7 (Tabla 3). En parte porque las muestras de *M. alfredi* analizadas por Kashiwagi (et al. 2012; 2014) provienen de Japón y las muestras de este estudio son del Ecuador.

A pesar de que los valores por loci difieren, el número promedio de alelos obtenidos en este estudio con las 57 muestras fue 4,375, muy cercano a 4, valor que fue calculado para 60 muestras de *M. alfredi* en Japón con 10 microsatélites (Kashiwagi, 2014).

Los resultados de alta variabilidad genética global con índice de Shannon y con la heterocigosidad esperada, pueden mostrar la eficacia con la que los microsatélites revelan la variación dentro de las 57 muestras, sin embargo Ward y Jasieniuk (2009) reportan que con un bajo número de muestras, se podría sobreestimar la diversidad genética.

Los valores de heterocigosidad esperada y observada promedio (H_e y H_o) de la muestra colectada fueron 0,614 y 0,679 respectivamente (Tabla 4); los que resultan ser altos comparados a los obtenidos por Kashiwagi (2014) para *M. alfredi*, que fueron 0,48 y 0,477 respectivamente. Una de las explicaciones presentada por Kashiwagi (2014) es que su población de *M. alfredi* tiene una tasa de crecimiento baja, y que existe una endogamia nociva que podría poner en peligro a la especie. Este hecho puede estar relacionado con que *M. alfredi* es una especie más residente, por lo que tiende a reproducirse con sus parientes cercanos.

En cambio *M. birostris*, es una especie altamente migratoria y no puede descartarse la ocurrencia de eventos recientes de hibridación con otras subpoblaciones. Ni tampoco se puede descartarse la existencia de procesos de inmigración de individuos nuevos, situación que sucede incluso con *M. alfredi* (Kashiwagi, 2014). Estos procesos de inmigración en el caso de *M. birostris* podrían suceder mar adentro, lo que dificultaría el registro de intercambios regionales hasta el momento (Marshall et al. 2011). La idea del reciente cruce con otra población genéticamente diferente o de la inmigración podría explicar la alta heterocigosidad (Tabla 4).

Otra suposición es que *M. birostris* prefiera reproducirse con individuos con los que no tenga parentesco familiar o que sean genéticamente diferentes (Nature Education, 2014).

También cabe la posibilidad de que exista una mejor supervivencia de los individuos heterocigotos (Nature Education, 2014). Esto se ve reflejado en el valor negativo para el índice de fijación, lo que indica que la mayoría de individuos muestreados son heterocigotos ya sea por apareamiento selectivo o por el bajo número de muestras. Sin embargo, el valor absoluto del índice de fijación es cercano a 0, de modo que también se podría retomar la idea de apareamiento al azar con una reciente hibridación con otra subpoblación, lo que aumenta los valores de heterocigosidad.

Los factores que pueden ocasionar que los loci MA21, MA15 y MA30 no se mantengan en equilibrio de Hardy-Weinberg son mutaciones, existencia de genotipos con mejor éxito reproductivo que otros, presencia de poblaciones pequeñas y desplazamiento de individuos (inmigración o emigración) (Curtis et al. 2006). Al saber que *M. birostris* es altamente migratoria, se podría decir que el efecto de desplazarse trayectos más largos e integrarse a otras subpoblaciones, hace que *M. birostris* tenga 3 loci que no están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Mientras que en *M. alfredi*, especie más residente, solamente tiene 1 loci no está en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 3). Al ser el Ecuador un punto de agregación para alimentación, cada año podrían venir individuos de varias regiones distantes como México, Colombia, Perú (lugares en donde se ha reportado la presencia de *M. birostris*) y después éstos podrían viajar como migrantes a distintas subpoblaciones o regiones distantes.

M. birostris y *M. alfredi* presentan 3 loci con alelos exclusivos (Tabla 3), la presencia de estos alelos pudo darse debido al azar en el muestreo o por efectos de deriva génica al analizar un reducido número de muestras. Podría ser que al tener mayor número de muestras estos alelos exclusivos sean compartidos con otros individuos.

Al realizar el dendrograma se formaron 3 grupos con las 56 muestras, éstos no agruparon las muestras por años de recolección (Figura 6). Esto indica que las muestras de cada año

no tienen origen genético diferente que las separe en varios grupos. En el caso del PCoA no se observan grupos independientes. Las 56 muestras están dispersas en los cuatro cuadrantes lo que refleja la gran diversidad genética de la muestra analizada (Figura 7).

8.3. Estructura poblacional de *M. birostris*:

Para detectar la estructura poblacional de las 57 muestras de *M. birostris* que visita la Isla de la Plata a partir de los genotipos obtenidos de los 8 SSR, se aplicó el programa, Structure 2.3.4, basado en algoritmos bayesianos que se utiliza ampliamente para la agrupación de datos genéticos (Pritchard et al., 2000).

A pesar de que, estadísticamente en los resultados se obtuvo un valor óptimo para K de 2. Se observa que todos los individuos tienen un coeficiente de asignación igual. Esta situación sucedía también con otros valores de K probados, de modo que no existen dos agrupaciones dentro de los individuos en estudio (Figura 8). En base a esto se determina que este dato de K no es informativo, de manera que no se pudo establecer con este análisis una estructura poblacional.

Se puede pensar que las muestras colectadas de *M. birostris* pertenecen a una población. Marshall (2013) manifiesta que la población que visita el Ecuador es una agrupación regional probablemente compartida con Perú, Colombia y Galápagos. Esto revelaría que las muestras de este estudio pertenecen a una mezcla de individuos pertenecientes a una población que tiene un origen común posiblemente del Pacífico del Sur. Aunque se desconoce hasta el momento información satelital de que *M. birostris* de localidades del Norte y Centro del Pacífico visiten el Ecuador (Marshall, 2013), no se descarta esta idea por su capacidad de nadar largas distancias, aprovechando islas o montes pelágicos en donde se puede alimentar para continuar sus migraciones.

Vale mencionar que poca estructura poblacional ha sido reportada por Schmidt et al. (2009) y Feldheim et al. (2001) en varias especies de peces pelágicos a nivel mundial, principalmente, por las mínimas barreras para que exista flujo génico o cruces al azar en especies migratorias.

9. CONCLUSIONES:

- Se logró estandarizar el protocolo de extracción de ADN mediante proteinasa K para fragmentos reducidos de tejido cutáneo conservado en DMSO.
- Se consiguió amplificaciones para 8 de los 9 pares de primers probados, en los que se encontró 46 alelos (4,375 promedio) en las 57 muestras analizadas.
- Se encontró que los individuos estudiados de *M. birostris* que visitaron la Isla de la Plata durante los años 2010-2012 presentan un alto nivel de diversidad genética representada en los valores de heterocigosidad ($H_e = 0,61$) y el índice de Shannon ($I = 1,161$).
- Mediante inferencia bayesiana, se determinó que la muestra de *M. birostris* colectada para este estudio no presenta una estructura poblacional definida.

10. RECOMENDACIONES:

- Para poder obtener información de los 8 primers con todas las muestras es importante que el tejido inicial sea de buena calidad y que se tenga la cantidad suficiente para la extracción de ADN.
- En lo posible sería bueno tomar más muestras por año, para poder relacionar datos genéticos entre años y tener una idea más clara de los índices de diversidad genética de *M. birostris* y estructura poblacional.
- Los resultados obtenidos en este estudio son preliminares, ya que el número de muestras con las que se trabajó es reducido y no comparable entre años. De modo que se recomienda tomar más muestras durante la época en la que las mantarrayas están en la Isla de la Plata. Más aun conociendo que la población que visita al Ecuador es de alrededor de 1000 individuos (Marshall et al. 2014).

- Al igual que se hace en otros estudios se recomienda usar los mismos marcadores moleculares en otros sitios de agregación en el oeste Océano Pacífico como de América del Norte, del Sur y de Océano Atlántico para poder realizar comparaciones, determinar si se muestrea al mismo individuo a nivel molecular y para conocer varios aspectos sobre la diversidad genética de la población de *M. birostris*.

11. REFERENCIAS:

- Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. Hindawi Publishing Corporation <http://dx.doi.org/10.1155/2014/691759>
- Acero, M., 2007. Algoritmo para análisis filogenético UPGMA, Barranquilla: Universidad del Norte.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27: 617–631. DOI 10.1007/s00299-008-0507-z
- Allendorf, F. W., Luikart, G. H., Aitken, S. N. (2013). Conservation and the Genetics of Populations. Wiley-Blackwell. UK. p 92-93.
- Analysis of ecological distance by ordination. (s.f). CHAPTER 10 153-196 http://www.planta.cn/forum/files_planta/chapter_10_analysis_of_ecological_distance_by_ordination_162.pdf
- Arcos, A., Ayala, E. (2001). Proyecto de creación de una Hostería en Puerto López, Provincia de Manabí. (Tesis previa la obtención del título de Ingeniero en Empresas Turísticas Y Áreas Naturales). Universidad Tecnológica Equinoccial. Recuperado. http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/8587/1/18276_1.pdf
- Balloux, F. Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 11, 155–165.
- Benbouza, H. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 10(2), 77-81.

- Burgos, L., Gamboa, M. (2002). Condiciones Físico Químicas en el entorno de la Isla de la Plata (Agosto/2001). Acta Oceanográfica del Pacífico. Vol 11. N°1
- Castillo, E., Uribe, M., Díaz, P. (2012). Evaluación de la estructura genética poblacional de *Sphyrna lewini* para la identificación de unidades de conservación en el Pacífico mexicano Ciencias Marinas 38(4): 635–652. doi:10.7773/cm.v38i4.2110
- Castro, A. L. (2009). Use of Molecular Tools on Surveys of Genetic Variation and Population Structure in three Species of Sharks. (Tesis para el grado de Doctor en Filosofía del Departamento de Biología). Universidad del Sur de Florida.
- Çiftci1, Y., Okumuú, I. (2002). Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2: 145-155.
- CITES. (2013). Fact sheet for the 16th Meeting of the Conference of the Parties (CoP16) to the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). Manta rays *Manta birostris* & *Manta alfredi*. Proposal # 46.
- Clark, T.B., 2002. Population structure of *Manta birostris* (*Chondrichthyes: Mobulidae*) from the Pacific and Atlantic Oceans. M.Sc. Thesis, Texas A&M University, College Station, USA.
- Couturier, L. I. E. Marshall, A. D. Jaine, F. R. A. Kashiwagi, T. Pierce, S. J. Townsend, K. A. Weeks, S. J., Bennett, M. B. Richardson, A. J. (2012). Biology, ecology and conservation of the Mobulidae. Journal of Fish Biology 80, 1075–1119. doi:10.1111/j.1095-8649.2012.03264.
- Curtis, H., Barnes, D., Schnek, A., Flores, G. (2006). Invitación a la Biología. 6ta ed. Buenos Aires, Médica Panamericana
- Daly-Engel, T.S., Seraphin, K.D., Holland, K.N., Coffey, J.P., Nance, H.A. (2012) Global Phylogeography with Mixed-Marker Analysis Reveals Male-Mediated Dispersal in

- the Endangered Scalloped Hammerhead Shark (*Sphyrna lewini*). PLoS ONE 7(1): e29986. doi:10.1371/journal.pone.0029986
- Dewar, H., Mous, P., Domeier, M., Muljadi, A., Pet, J., Whitty, J. (2008). Movements and site fidelity of the giant manta ray, *Manta birostris*, in the Komodo Marine Park, Indonesia. Mar Biol. 155, 121–133. doi: 10.1007/s00227-008-0988-x
- Duffy, C., Abbott, D. (2003) Sightings of mobulid rays from northern New Zealand, with confirmation of the occurrence of *Manta birostris* in New Zealand waters. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 37: 715–721.
- Eguiluz, M. (2014). Identificación de Marcadores Microsatélites para el Estudio de la Diversidad Genética de *Taenia Solium* (Tesis previa la obtención del título de Magister en Bioquímica y Biología Molecular). http://dspace.concytec.gob.pe/bitstream/concytec/82/1/eguiluz_mm.pdf
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: A simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611 – 2620.
- Feldheim, K. A., Gruber, S. H., Ashely, M. V. (2001). Population genetics structure of the lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in the Western Atlantic: DNA microsatellites variation. *Molecular Ecology*. 10. 295-303.
- González, E. (2008). Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de especies Vegetales Amenazadas: *Ilex perado ssp. Lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Resultados Preliminares. (Tesis previa la obtención del título de Doctor en Ecología y gestión de los Recursos Vivos Marinos).

- Graham, R. T., Witt, M. J., Castellanos, D. W., Remolina, F., Maxwell, S., Godley, B. J., Hawkes, L. A. (2012). Satellite Tracking of Manta Rays Highlights Challenges to their Conservation. PLoS ONE 7(5): e36834. doi:10.1371/journal.pone.0036834
- Gray, J. (1997). Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity and Conservation* (6), 153-175.
- Herbert, J. (2012). *Manta birostris* (Giant Manta Ray). The Online Guide to the Animals of Trinidad and Tobago.
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N., Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11: 609–623. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x
- Hurtado, M. (s.f.). Monografía sobre las Áreas Marinas y Costeras Protegidas del Pacífico Sudeste. Guayaquil – Ecuador.
- Instituto Oceanográfico de la Armada, (2005). De la Costa Continental e Insular del Ecuador. 4ta ed. Ecuador.
- Jain, S. M., Minocha, S. C. (2000). *Molecular Biology of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers. Países Bajos 1: 452-455
- Jakobsson, M., Rosenberg N.A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801–1806.
- Kashiwagi, T., Broderick, D., Lance, S., Bennett, M., Ovenden, J. (2012). Development and characterization of ten microsatellite loci for the reef manta ray *Manta alfredi*. *Conservation Genet Resour*, Author`s personal copy. DOI 10.1007/s12686-012-9705-7
- Kashiwagi, T., Marshall, A., Bennett, M., Ovenden, J. (2011) Habitat segregation and mosaic sympatry of the two species of manta ray in the Indian and Pacific Oceans:

Manta alfredi and *M. birostris*. Marine Biodiversity Records, 1-8.
doi:10.1017/S1755267211000479; Vol. 4; e53; 2011 Published online

Kashiwagi, T., Marshall, A., Bennett, M., Ovenden, J. (2012). The genetic signature of recent speciation in manta rays (*Manta alfredi* and *M. birostris*). Molecular Phylogenetics and Evolution. 64, 212–218.

Luiz Jr. O. J. Balboni, A. P. Kodja, G., Andrade, M., Marum, H. (2008) Seasonal occurrences of *Manta birostris* (Chondrichthyes: Mobulidae) in southeastern Brazil. Ichthyol Res. doi: 10.1007/s10228-008-0060-3

Manta Ray of Hope, (2014). Populations of Manta and Mobula Rays are facing extreme threats. Recuperado de <http://www.mantarayofhope.com/learn/about-manta-and-mobula-rays/population-estimates/>.

Manta Trust, (2014). Global Tourism 'Hot Spots' for Manta Ray Sightings. Recuperado de <http://www.mantatrust.org/about-mantas/manta-hotspots/>

MantaWatch Internship Program, (2012). Fully Funded Marine Science Internship. London. Recuperado de <http://guystrust.org/downloads/MW%20Internship%20Report2012.pdf>

Marshall, (2013). Conferencia Magistral en Glaxo. Quito- Ecuador.

Marshall, A. D. (2009). Biology and population ecology of *Manta birostris* in southern Mozambique. PhD Thesis, University of Queensland. Marshall, A., Compagno, L., Bennett, M. (2009). Redescription of the genus *Manta* with resurrection of *Manta alfredi* Krefft, 1868) (Chondrichthyes; Myliobatoidei; Mobulidae). Zootaxa 2301: 1–28

Marshall, A., Bennett, M.B., Kodja, G., Hinojosa-Alvarez, S., Galvan-Magana, F., Harding, M., Stevens, G. & Kashiwagi, T. (2011). *Manta birostris*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>.

- Marshall, A., Guerrero, M., Winstanley, G., Burges. K. (2014). Reporte de Investigación Anual 2013. Marine Megafauna Foundation. NAZCA.
- Mccusker, M., Bentzen, P. (2010). Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes. *Molecular Ecology*. 19, 4852–4862. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04822.x
- Mehdi K., Vandepitte, K., Kheibarshekan, L., Van Bockstaele, E. (2011). Towards an optimal sampling strategy for assessing genetic variation within and among white clover (*Trifolium repens* L.) cultivars using AFLP. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 2, 252-258.
- Mejia-Falla, P. A., Navia, A. F. (s.f.). Population Dynamic and Habitat Use of the Whitetip Skark (*Triaenodon obesus*), Whale Shark (*Rhincodon typus*) and Manta ray (*Manta birostris*) in Gorgona National Natural Park, Colombian Pacific. Fundación colombiana para la Investigación y Conservación de Tiburones y Rayas, SQUALUS.
- Mundy-Taylor V. y Crook V. (2013). Into the deep: Implementing CITES measures for commercially-valuable sharks and manta rays. Report prepared for the European Commission. Traffic.
- Munpholsri, Nut., Poompuang, Supawadee., Senanan, Wansuk., Kamonrat, Wongpathom. (2013). Microsatellite Markers Suggested Moderate Genetic Variation in Indian Mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) Populations from the Andaman Sea, Thailand. (*Nat. Sci.*) 47 : 853 - 863
- NanoDrop Technologies. (2007). NanoDrop and design are registered trademarks of NanoDrop Technologies. USA
http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf

- Nature Education. 2014. The Genetic Variation in a Population Is Caused by Multiple Factors. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-genetic-variation-in-a-population-is-6526354>
- New England Biolabs. (2014). Guidelines for PCR Optimization with Taq DNA Polymerase. <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-pcr-optimization-with-taq-dna-polymerase>.
- Noble, L.R., Jones, C.S., Sarginson, J., Metcalfe J.D., Sims, D.W., Pawson, M.G. (2006). Conservation Genetics of basking sharks. Final report for Defra
- Peakall, R., Smouse, P. (2009). GenAlEx Tutorials – Part 1: Introduction to Population Genetic Analysis. Genetic Analysis in Excel
- Peakall, R., Smouse, P. (2012) GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. Bioinformatics.
- Perrier, X., Jacquemoud-Collet, JP. (2006). DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/>
- Portnoy, D. S., Heist, E. J. (2012) Molecular markers: progress and prospects for understanding reproductive ecology in elasmobranchs. *Journal of Fish Biology* 80, 1120–1140. doi:10.1111/j.1095-8649.2011.03206.x,
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 – 959.
- Proyecto Mantas Ecuador, 2012 <http://www.mantasecuador.org/>
- Qiagen, 2013. Samples & Assay Technologies. QIAGEN Multiplex PCR Kit. <http://www.qiagen.com/products/catalog/assay-technologies/end-point-pcr-and-rt-pcr-reagents/qiagen-multiplex-pcr-kit#productdetails>
- Ramanatha, R., Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. Kluwer Academic Publishers - Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68: 1–19.

- Rocha, P. (2003). Molecular Markers, a Useful Tool for Genetic Selection in Oil Palm. PALMAS, 24(2)11:25
- Rohner, C. A., Pierce, S. J., Marshall, A. D., Weeks, S. J., Bennett, M. B., Richardson, A. J. (2013). Trends in sightings and environmental influences on a coastal aggregation of manta rays and whale sharks. Marine Ecology Progress Series 482, 153–168. doi: 10.3354/meps10290
- Rosenberg, N. A., Pritchard, J. K., Weber, J. L., Cann, H. M., Kidd, K. K., Zhivotovsky, L. A., Feldman, M. W. (2002). Genetic structure of human populations. *Science* 298: 2381 – 2385
- Schmidt, J.V., Schmidt, C.L., Ozer, F., Ernst, R.E., Feldheim, K.A. (2009) Low Genetic Differentiation across Three Major Ocean Populations of the Whale Shark, *Rhincodon typus*. PLoS ONE 4(4): e4988. doi:10.1371/journal.pone.0004988
- Semagn, K., Bjørnstad, A., Ndjiondjop, M. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology. 5(25) 2540-2568
- Stevens, G. (s.f.) Field Guide to the Identification of Mobulid Rays (*Mobulidae*): Indo-West Pacific. Manta Trust. 1-19.
- Vinueza, D. (2007). Propuesta temática a desarrollar en el Parque Nacional Machalilla (Tesis previa la obtención del título de Ingeniero en Empresas Turísticas Y Áreas Naturales). Universidad Tecnológica Equinoccial. Recuperado http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/8812/1/32101_1.pdf
- Ward, S., Jasieniuk, M. (2009). Review: Sampling Weedy and Invasive Plant Populations for Genetic Diversity Analysis. Weed Science of Society, 57(6):593-602.
- Yano, K., Sato, F., Takahashi, T. (1999). Observations of mating behavior of the manta ray, *Manta birostris*, at the Ogasawara Islands, Japan. The Ichthyological Society of Japan.

12. TABLAS:

Tabla 1. Distribución mundial de mantarrayas

Region	Country	Location	Prevalent Manta Species at Location	Peak Season	Estimated Manta Population
Central & Eastern Pacific	Fiji	Kadavu Island	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i>	Year Round	Unknown, but likely to be fairly small
	Hawaii	Kona & The Big Islands	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i>	Year Round	< 350
	Ecuador	Isla de la Plata	Oceanic Manta – <i>Manta birostris</i>	June-October	> 400 but expected to be much larger
	México	The Revillagigedo Island (Socorro)	Oceanic Manta – <i>Manta birostris</i>	November-June	> 350 but expected to be much larger
Caribbean	USA	Florida-Flower Garden Banks National Marine Sanctuary	Caribbean Manta – <i>Manta cf. birostris</i>	Year Round	Unknown
	Mexico	Isla Mujeres & Isla Holbox, Yucatan	Caribbean Manta – <i>Manta cf. Birostris</i>	June- Septiembre	Unknown
Indian Ocean	Republic of Maldives	Throughout the Archipelago	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i>	Year Round	> 2300 individuals identified (pop estimates 5000). Oceanic mantas > 100
	Mozambique	Tofo Beach	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i>	Year Round	Reef Mantas > 500 individuals identified (pop estimates 900) Oceanic mantas > 100 (pop estimates 600)
	Thailand	Koh Bon, Similan Islands	Oceanic Manta – <i>Manta birostris</i>	Year Round (best January - May)	Unknown
	Indonesia	Komodo National Park	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i>	Year Round	Unknown
	Indonesia	Nusa Penida Island, Bali	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i>	Year Round	Unknown
	Australia	Coral Bay in western Australia	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i>	Year Round	> 500
Western Pacific	Indonesia	Raja Ampat	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i> & Oceanic Manta – <i>Manta birostris</i>	Year Round (best October- June)	Unknown
	Australia	Grat Barrier Reef, Eastern Australia	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i>	Year Round	> 500
	Philippines	Manta Bowl, Donsol	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i>	Year Round	Unknown
	Federated States of Micronesia	Yap, Palau, Kiribati & Guam	Reef Manta – <i>Manta alfredi</i>	Year Round	> 300

Acceso 5 de agosto de 2014 <http://www.mantatruster.org/about-mantas/manta-hotspots/>

Tabla 2. Información de los 8 loci microsatélites de las 57 muestras analizadas de *M. birostris* de la Isla de la Plata, Ecuador

Nº	Locus GenBank	Secuencia de Primers 5' → 3' *	Motivo repetido *	T°C de annealing	Nº alelos encontrados	Nº Genotipos encontrados	Tamaño de Alelos (bp)	Concentración de ADN (ng/μl)	Porcentaje de Acrilamida usado en el gel de corrida
1	MA34 JX269149	F: CGTCCAAGGCAGGATTGATT R: TCGAGCACTCACCTATCCAC	(GT)15	55	4	4	169-177	40	6
2	MA21 JX269147	F: GTGGCGAAACCCAATTTCC R: GAGCAAATCTCAGCACATCCAA	(TCTA)8	61,8	4	7	188-212	20	6
3	MA49 JX269152	F: CCATGAACACAGCCTCAGATT R: TGAGTCCCTCCAGCATTTTGT	(CTAT)15	61,8	7	19	216-252	20	6
4	MA09 JX269144	F: GATGCGTGTTCCTGTTG R: GCCAGCAATCTTCTTCCACATT	(ACAT)7	65	4	8	365-381	20	4
5	MA14 JX269145	F: CAACCCACGGACTGACTTTC R: TGCACGCTATGCACAAACAA	(ATCT)6	57	11	30	170-214	10	6
6	MA15 JX269146	F: CATATAAAGGACCCCGGCAC R: TGGTGGAGTGAAGAGGCTG	(AC)18	56	3	7	151-157	20	6
7	MA43 JX269151	F: GCAGCTCCCATATCTCTCTCCC R: CCACTTGACCCGAACATGAG	(TCA)7	60	4	7	275-291	20	4
8	MA30 JX269148	F: CTCGTGCCCCTTCTTCTG R: GACTGTGGGAGGCATGGAA	(AC)17	56	9	20	186-216	10	6

* Primers reportados por Kashiwagi et al. 2012. La temperatura de annealing T°C, el número de alelos, genotipos y tamaño de alelos observados fueron obtenidos en el presente estudio.

Tabla 3. Análisis comparativo de los parámetros promedio de diversidad genética de la especie *M. birostris* y *M. alfredi* Kashiwagi et al. (2012) de acuerdo al locus considerando todos los años de recolección (para el cálculo de estos valores se usó el software GenAlEx 6.501).

	Locus1		Locus2		Locus3		Locus4		Locus5		Locus6		Locus7		Locus8	
	MA34		MA21		MA49		MA09		MA14		MA15		MA43		MA30	
	*	+	*	+	*	+	*	+	*	+	*	+	*	+	*	+
Na	2,667	4	3,333	2	5,333	4	3,333	3	7,667	4	2,667	10	3,333	2	6,667	3
Ho	0,436	0,450	0,814	0,033	0,875	0,400	0,640	0,217	0,782	0,783	0,342	0,867	0,850	0,417	0,693	0,517
He	0,346	0,392	0,579	0,064	0,762	0,485	0,581	0,199	0,732	0,664	0,528	0,804	0,626	0,460	0,755	0,540
HW	0,297	0,719	0,026 ^b	0,00018 ^a	0,694	0,620	0,080	0,829	0,911	0,295	0,00004 ^a	0,615	0,825	0,467	0,00001 ^a	0,467
AE	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2	1	0	2	0

* Valores obtenidos en el estudio +Valores tomados de Kashiwagi et al. (2012) y Kashiwagi, (2014)

Na número promedio de alelos observados por locus; *Ho* heterocigocidad observada; *He* heterocigocidad esperada; *AE* alelos exclusivos por locus. *HW* probabilidad de Hardy Weinberg. Existen diferencias significativas entre frecuencias genotípicas observadas y calculadas ^a P<0,001 ^b P<0,05; por tanto no existe equilibrio para estos loci.

Tabla 4. Resumen general de parámetros de diversidad genética de la especie *M. birostris* de los 3 años de recolección y de *M. alfredi* (Kashiwagi, 2014) usando el software GenAlEx 6.501 (Peakall y Smouse, 2012).

Especie	Na ± SD	Ne ± SD	I ± SD	Ho ± SD	He ± SD	F ± SD
<i>Manta birostris</i>	4,375 ± 0,454	3,084 ± 0,291	1,161 ± 0,086	0,679 ± 0,060	0,614 ± 0,032	-0,098 ± 0,080
<i>Manta alfredi</i>	4,000 ± 0,730	2,298 ± 0,362	0,881 ± 0,144	0,477 ± 0,077	0,480 ± 0,069	0,048 ± 0,061

Na número promedio de alelos observados por locus; *Ne* número promedio de alelos efectivos observados por locus; *I* índice de Shannon; *Ho* heterocigocidad observada; *He* heterocigocidad esperada; *F* índice de fijación.

13. FIGURAS:

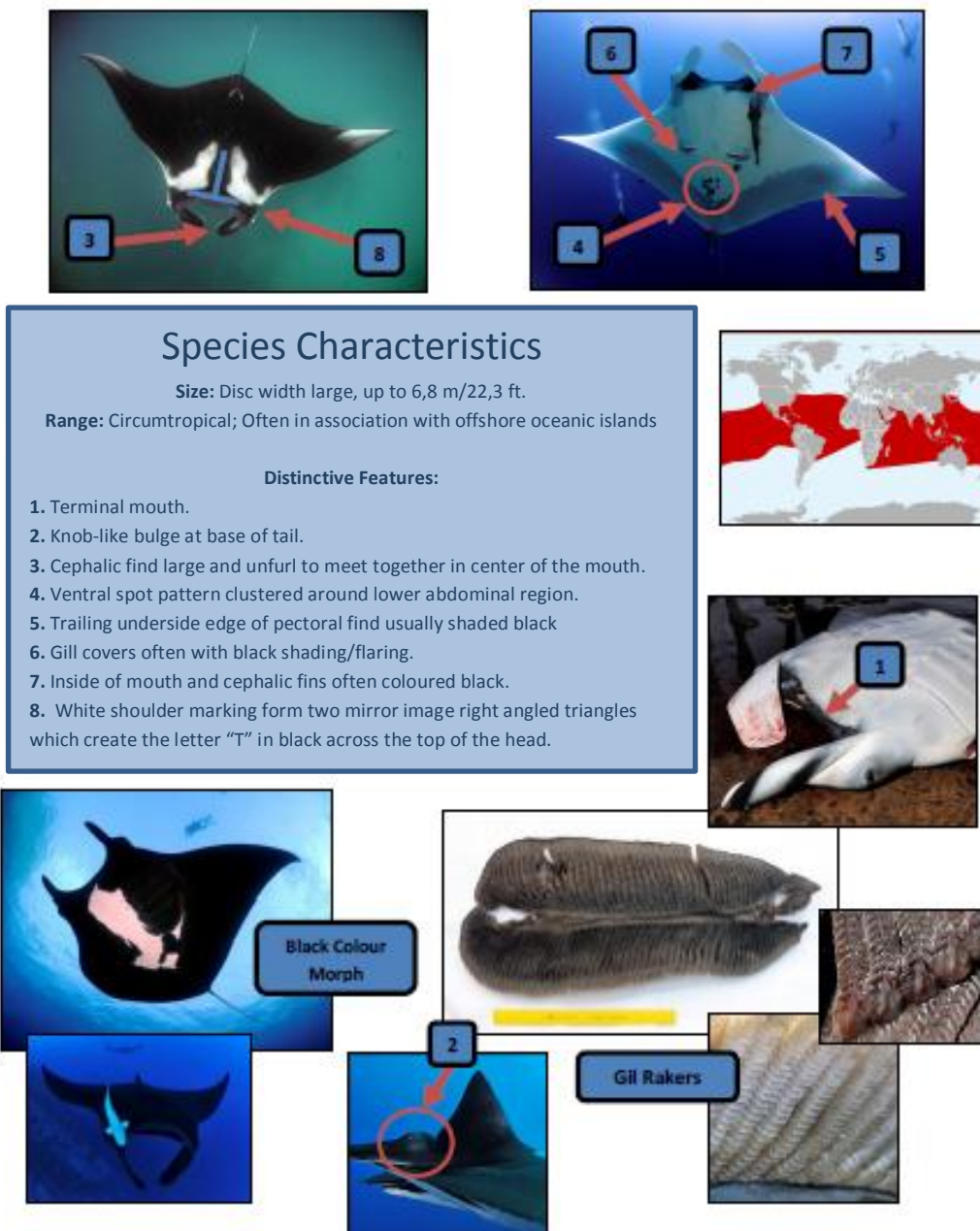
Oceanic Manta Ray – *Manta birostris* (Walbaum, 1792)

Figura 1. Características específicas de *M. birostris* (Stevens, s.f.)

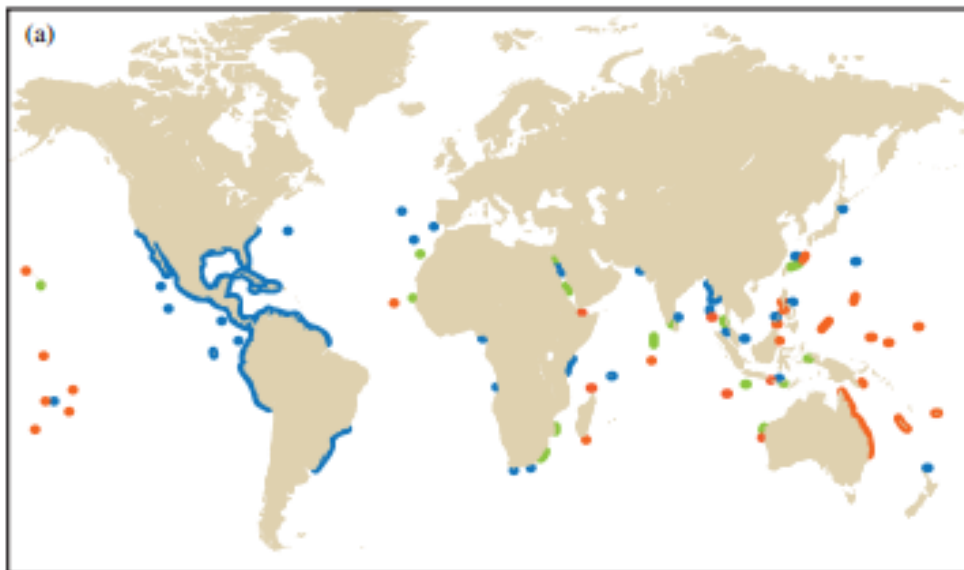


Figura 2. Distribución de dos especies conocidas de mantarrayas, *Manta alfredi* (tomate) y *Manta birostris* (azul), Relación simpátrica o alopátrica de ambas especies (verde) (Couturier et al, 2012).

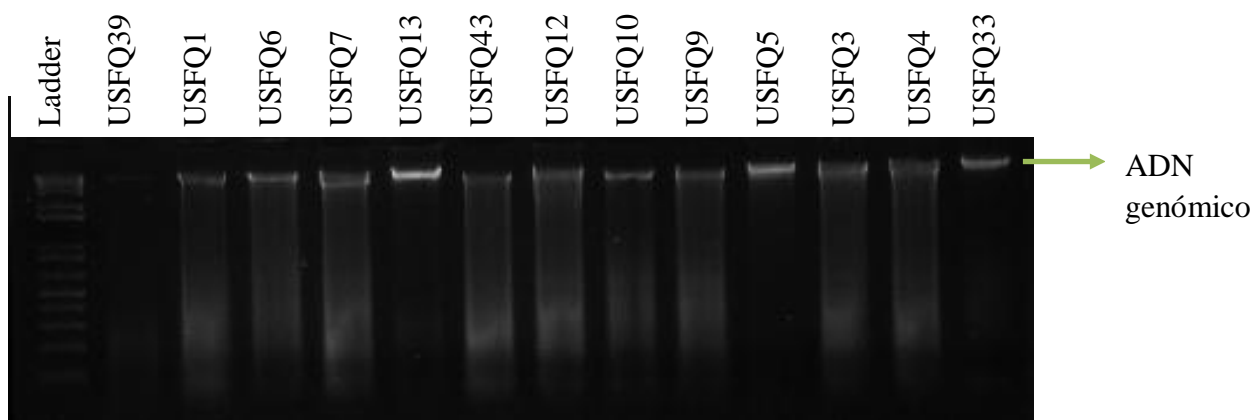


Figura 3. Electroforesis en gel agarosa al 1,5% de muestras de ADN extraído a partir de tejido de *M. birostris* del Ecuador.

Se observa ADN de alto peso molecular correspondiente al ADN genómico en todas las muestras (USFQ #). Ladder: marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen)

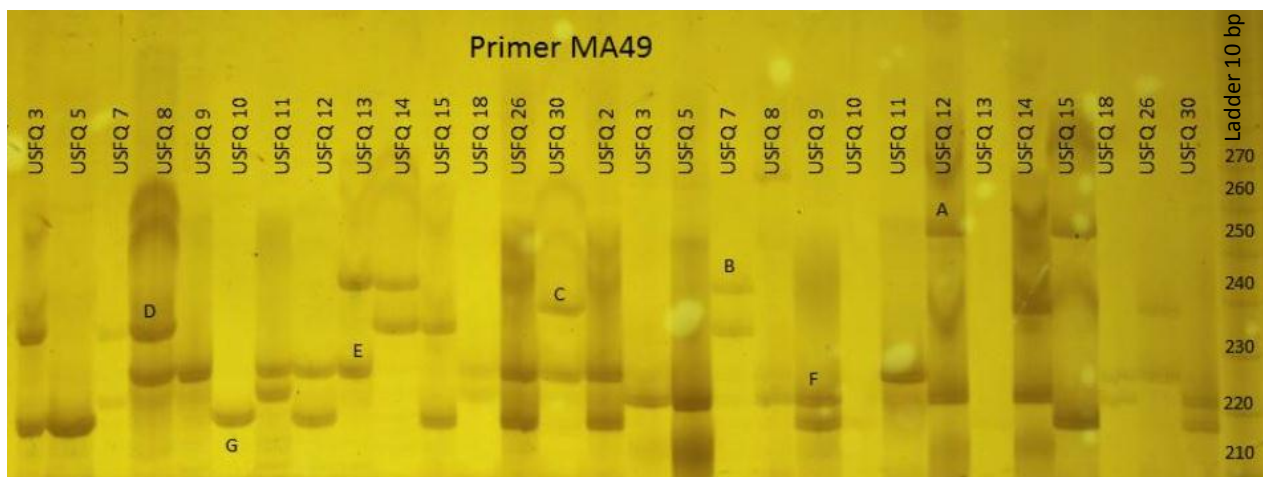


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de los productos de amplificación con el par de primers MA49- JX269152 de 29 muestras de ADN de la especie *M. birostris* provenientes de la Isla de la Plata (USFQ #).

Se observa un total de 7 alelos (A-G). Se utilizó como marcador de peso molecular al Ladder 10 bp (Invitrogen). La temperatura de annealing fue de 61,8 °C y los alelos se encuentran en un rango de 216-252 bp.

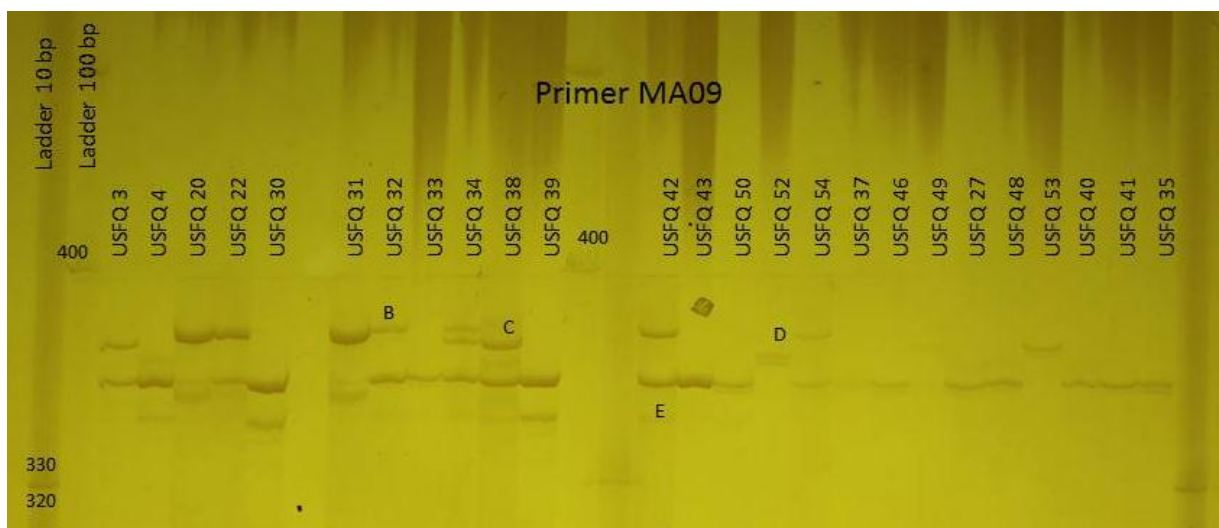


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 4% de los productos de amplificación con el par de primers MA09- JX269144 de 25 muestras de ADN de la especie *M. birostris* provenientes de la Isla de la Plata (USFQ #).

Se observa un total de 4 alelos (B-E). Se utilizó como marcador de peso molecular al Ladder 10 bp (Invitrogen) junto al ladder de 100 bp (Invitrogen). La temperatura de annealing fue de 65 °C y los alelos se encuentran en un rango de 365-381 bp.

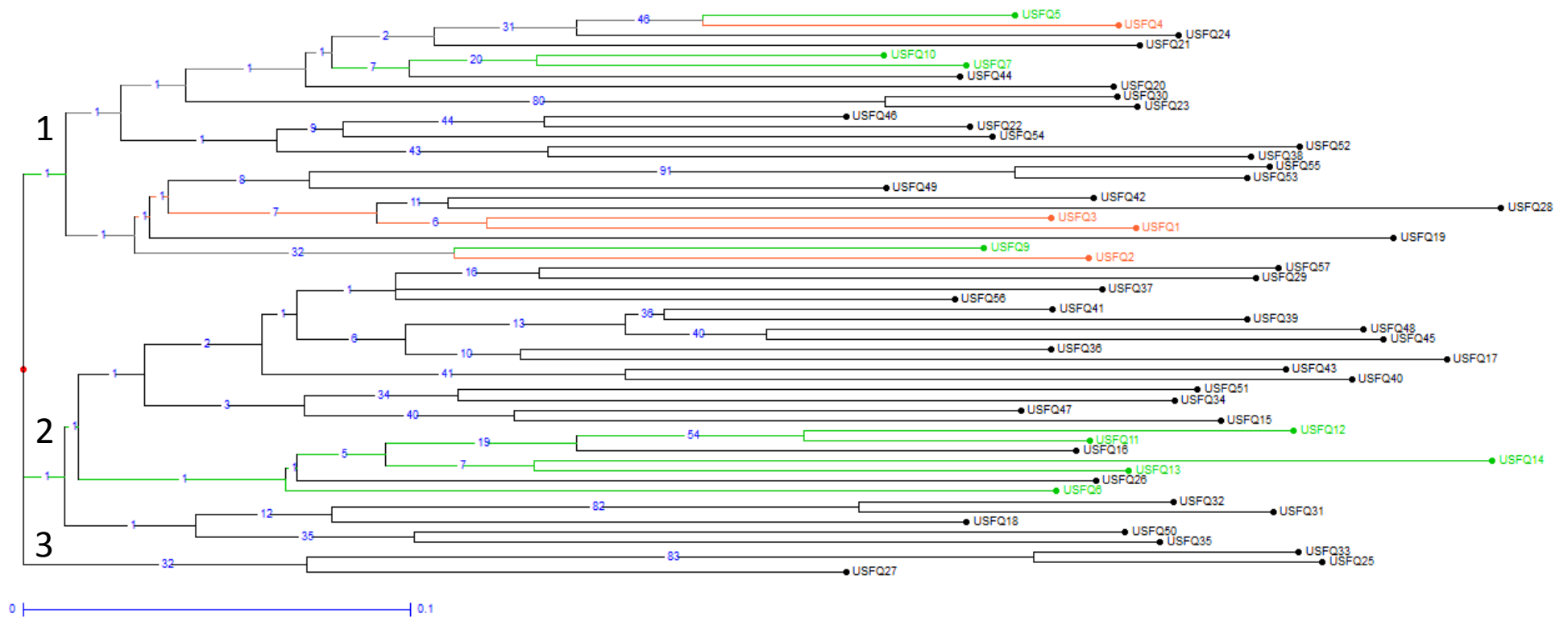


Figura 6. Dendrograma basado en el método de Neighbor Joining con las 56 muestras (se excluyó a la muestras USFQ 8 ya que tenía más del 50% de missing data) de la especie *M. birostris* durante 3 años de recolección. Los valores que se ubican en las ramas indican los valores de bootstraps de cada agrupamiento.

Se obtuvieron 3 grupos, pero no se agrupan por años de recolección. Dentro del grupo 1, se agrupan individuos de los 3 años, no así en los otros. Esto indica que los individuos no tiene un origen genético diferente cada año, vale recalcar que no existe igual número de muestras por años y que el número total de muestras es bajo. Para detalles de la nomenclatura original de las muestras y colores revisar Anexo 1.

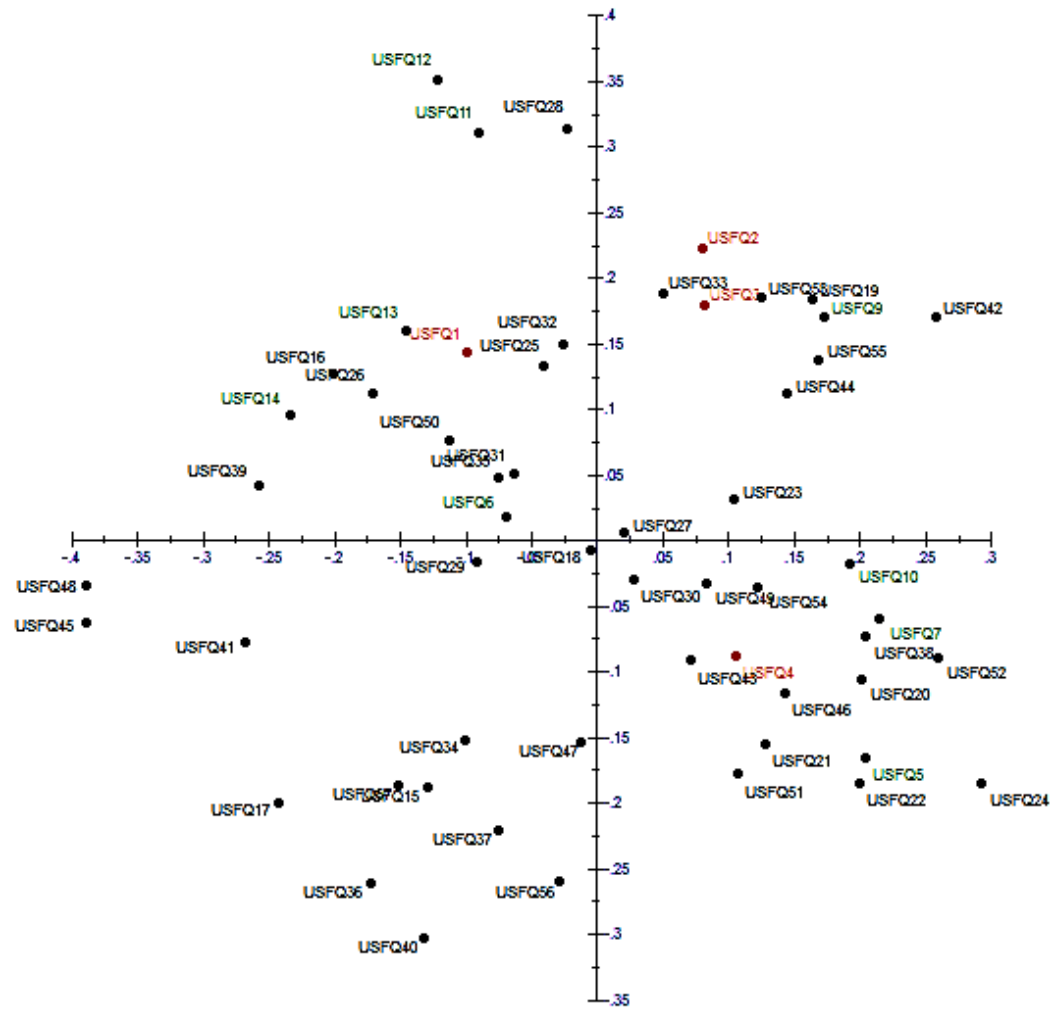


Figura 7. Análisis factorial de coordenadas principales (PCoA) usando una matriz de distancia con 56 muestras (se excluyó a la muestras USFQ 8 ya que tenía más del 50% de missing data) de *M. birostris* durante 3 años de recolección.

Todos los ejemplares están dispersos sobre el plano. Para detalles de la nomenclatura original de las muestras revisar Anexo 1.

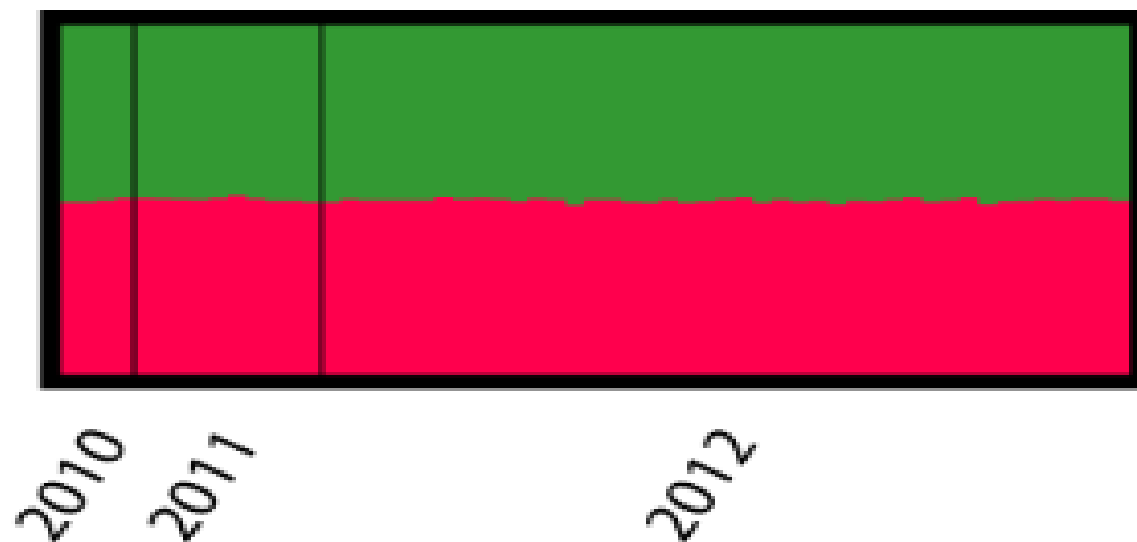


Figura 8. Determinación del número de grupos ancestrales asignados por el valor óptimo de K (K=2). Se incluyó las 57 muestras de ADN y se las dividió según el año en el que fueron recolectadas las muestras de la especie *M. birostris*

14. ANEXOS:

Anexo 1. Muestras de tejido muscular-cutáneo de la especie *M. birostris* recolectadas en la Isla de la Plata durante 3 años consecutivos y concentración de ADN obtenido después de la extracción

Año	Fecha colección	Nomenclatura USFQ	Cantidad de Tejido para la extracción (g)	Cuantificación de ADN extraído ng/ μ l
2010	02/09/2010	USFQ01	0,0118	92,2
	03/09/2010	USFQ02	0,0095	33,5
	06/09/2010	USFQ03	0,0149	162,4
	08/09/2010	USFQ04	0,0129	107,1
2011	06/09/2011	USFQ05	0,0053	96,7
	06/09/2011	USFQ06	0,0117	153,8
	06/09/2011	USFQ07	0,0119	23,4
	07/09/2011	USFQ08	0,0105	39,2
	07/09/2011	USFQ09	0,0125	151,3
	08/09/2011	USFQ10	0,012	127,1
	08/09/2011	USFQ11	0,0035	18,6
	09/09/2011	USFQ12	0,0097	97,4
	09/09/2011	USFQ13	0,0119	69,6
	09/09/2011	USFQ14	0,0033	43,9
2012	11/09/2012	USFQ15	0,0113	100,2
	11/09/2012	USFQ16	0,0101	2663,9
	06/09/2012	USFQ17	0,0134	160,1
	12/09/2012	USFQ18	0,0133	145,3
	13/09/2012	USFQ19	0,0145	142,5
	14/09/2012	USFQ20	0,0104	516,8
	15/09/2012	USFQ21	0,0125	208,7
	15/09/2012	USFQ22	0,0135	311,9
	17/09/2012	USFQ23	0,011	607,2
	17/09/2012	USFQ24	0,0121	132,4
	19/09/2012	USFQ25	0,0103	967,8
	19/09/2012	USFQ26	0,0128	369,9
	21/09/2012	USFQ27	0,0123	312,4
	21/09/2012	USFQ28	0,0172	957,5
	23/09/2012	USFQ29	0,0126	429,5
	23/09/2012	USFQ30	0,0103	131,5
	23/09/2012	USFQ31	0,0019	76,7
	23/09/2012	USFQ32	0,0106	184,5
25/09/2012	USFQ33	0,0058	174,6	
25/09/2012	USFQ34	0,012	407,7	

Año	Fecha colección	Nomenclatura USFQ	Cantidad de Tejido para la extracción (g)	Cuantificación de ADN extraído ng/μl
2012	25/09/2012	USFQ35	0,0124	212,2
	26/09/2012	USFQ36	0,0118	148,6
	27/09/2012	USFQ37	0,0135	920,2
	27/09/2012	USFQ38	0,0105	725,4
	27/09/2012	USFQ39	0,0128	866,8
	28/09/2012	USFQ40	0,011	277
	29/09/2012	USFQ41	0,0127	548,2
	03/10/2012	USFQ42	0,0107	675,9
	03/10/2012	USFQ43	0,0034	87
	03/10/2012	USFQ44	0,0113	506,9
	03/10/2012	USFQ45	0,0109	224,2
	03/10/2012	USFQ46	0,0115	420,3
	04/10/2012	USFQ47	0,011	685,1
	04/10/2012	USFQ48	0,0116	690,6
	04/10/2012	USFQ49	0,0114	384,3
	04/10/2012	USFQ50	0,0026	6,9
	06/10/2012	USFQ51	0,0105	1424,3
	06/10/2012	USFQ52	0,0129	755,4
	06/10/2012	USFQ53	0,0166	769,7
	06/10/2012	USFQ54	0,0106	444,4
07/10/2012	USFQ55	0,0109	1141,9	
07/10/2012	USFQ56	0,0103	799,5	
08/10/2012	USFQ57	0,012	202,9	