

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Diversidad genética y estructura poblacional de individuos de *Manta birostris* muestreados en la Isla de la Plata en las temporadas de los años 2010 al 2013

Proyecto de Investigación

Sebastián Jaén Vinueza Sotelo

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 8 de mayo del 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Diversidad genética y estructura poblacional de individuos
de *Manta birostris* muestreados en la Isla de la Plata en las
temporadas de los años 2010 al 2013**

Sebastián Jaén Vinueza Sotelo

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 8 de mayo de 2018

DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Sebastián Jaén Vinueza Sotelo

Código: 00117052

Cédula de Identidad: 0922470901

Lugar y fecha: Quito, 8 de mayo de 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme su bendición en el transcurso del desarrollo de mi tesis y mi carrera universitaria, porque fue imposible atribuir al azar la suerte que tuve y lo bien que resultó todo para mí. Sé que Dios estuvo siempre a mi lado.

A mi padre y a mis hermanos por apoyarme en todo lo que necesité para poder estudiar en esta prestigiosa universidad, por sus palabras de ánimo y por ser los pilares fundamentales de mi fortaleza. Sin duda me han dado la mejor educación. Agradezco también a mi madre por ser mi ejemplo a seguir, por haber luchado hasta su último aliento por mí y mi futuro.

A todos mis tíos y primos por recibirme con alegría cuando regresaba a la Costa, por todas las reuniones que se hicieron en mis cumpleaños y por sus consejos. Ellos me motivaron a seguir adelante con mis estudios, me hicieron saber que podía contar con ellos en las buenas y en las malas.

A mi novia por darme ánimo y ayudarme en las últimas etapas de mi tesis. Agradezco su paciencia, su bondad y su compañía en los momentos difíciles de estos últimos 7 meses. Gracias a ella pude continuar con mejor entusiasmo los detalles finales de mi proyecto.

A mis compañeros y amigos biotecnólogos, especialmente a Daniel, Daniela, Paula, Dominique, Stephany, Mishelle, Darío y Antonia. Aprendí mucho de cada uno de ustedes, sin su ayuda no sé qué habría hecho en varias ocasiones a lo largo de estos 5 años de carrera. Son excelentes personas, sé que llegarán muy lejos y espero volver a verlos en el futuro. A mis amigos de la infancia y del colegio del grupo “La Plancha” por su apoyo moral desde lejos, por los memes y las risas que me sacaron cuando todo parecía difícil o aburrido.

Agradezco a María de Lourdes Torres por permitirme trabajar en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. A Venancio Arahana, Andrea Montero, Gabriela Pozo y Bernardo Gutiérrez por su guía en el desarrollo de este trabajo. A Michel Guerrero por facilitar las muestras de ADN y toda la bibliografía e información adicional sobre las mantarrayas. A los asistentes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal a quienes considero mis amigos.

Agradezco también al Chanceller Grant de la Universidad San Francisco de Quito que financió la realización de esta investigación

DEDICATORIA

Dedico este trabajo y todo el esfuerzo de mi carrera universitaria a Dios y a mi madre.

RESUMEN

La mantarraya gigante, *Manta birostris*, es la especie de mantarrayas más grande del mundo. Su distribución abarca todos los océanos y presenta patrones migratorios de largas distancias, ocupando áreas tropicales y semi-templadas, a diferencia de su especie hermana más residente *Manta alfredi* que ocupa arrecifes de coral. Lamentablemente, *M. birostris* ha sido catalogada como una especie vulnerable dentro de la Lista Roja de la UICN a causa de actividades antropogénicas como la pesca incidental e intencionada. Su lento ciclo reproductivo es una característica que la hace vulnerable y propensa a la extinción. En Ecuador, durante los meses de julio a septiembre, centenas de *M. birostris* visitan la Isla de la Plata en búsqueda de alimento, sitios de limpieza o reproducción. El objetivo de este estudio fue analizar, mediante marcadores microsatélite, la diversidad genética de una muestra de estos individuos. Se analizaron 24 individuos muestreados en el 2013 con ocho pares de primers heterólogos, y se los comparó con los resultados obtenidos de 57 individuos muestreados en el periodo 2010-2012, analizados en un trabajo previo. En los individuos del 2013 se identificaron 39 alelos y se obtuvo una diversidad genética moderadamente alta. En cuanto a la estructura poblacional se observó una separación en dos grupos compuestos por los individuos muestreados en las temporadas 2010-2012 y en los individuos de la temporada 2013, respectivamente. Además, se concluyó que no existe una dispersión sesgada por sexo en ninguno de los grupos estudiados y que los individuos muestran un bajo nivel de parentesco en todas las temporadas. Se sugiere que puede existir una relación entre los patrones migratorios y la diferenciación genética que presentan los individuos muestreados en la temporada del 2013.

Palabras clave: Isla de la Plata, Bajo Copé, *Manta birostris*, microsatélites, heterocigosidad esperada, estructura poblacional, dispersión sesgada por sexo, parentesco

ABSTRACT

The giant manta ray, *Manta birostris*, is the largest manta ray species in the world. Its distribution covers all oceans and has long-distance migration patterns, occupying tropical and semi-temperate areas. *M. birostris* differs to its more resident sister species, *Manta alfredi*, which occupies coral reefs. Unfortunately, *M. birostris* has been listed as a vulnerable species within the IUCN Red List because of anthropogenic activities such as incidental and intentional fishing. Its slow reproductive cycle is a characteristic that makes it vulnerable and prone to extinction. In Ecuador, during the months of July to September, hundreds of *M. birostris* visit the Isla de la Plata in search of food, cleaning or reproduction sites. The objective of this study was to analyze the genetic diversity in a group of manta rays sampled during 2013 using microsatellite markers. We analyzed 24 individuals with eight pairs of heterologous primers, and compared them with the results of a previous work where 57 individuals were sampled in the period 2010-2012. In the individuals of 2013, 39 alleles were identified and a moderately high genetic diversity was determined. Regarding the population structure, a separation was observed between two groups. One group was composed of the individuals sampled in the seasons of the years 2010 to 2012. The other group was composed of the individuals sampled in the season of 2013. In addition, it was concluded that there is no biased dispersion by sex in any of the years studied and that individuals show a low level of kinship in all seasons. It is suggested that there may be a relationship between migratory patterns and the genetic differentiation presented by the individuals sampled in the season of 2013.

Key words: Isla de la Plata, *Manta birostris*, microsatellites, expected heterozygosity, population structure, sex-biased dispersal, relatedness

TABLA DE CONTENIDO

DERECHOS DE AUTOR	3
RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
TABLA DE CONTENIDO.....	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
INDICE DE ANEXOS	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Taxonomía de <i>M. birostris</i> :.....	13
1.2 Morfología y patrón de pigmentación:	13
1.3 Alimentación.....	15
1.4 Reproducción	16
1.5 Comportamiento migratorio.....	16
1.6 Importancia de estudios moleculares para la conservación de especies marinas migratorias	18
1.7 Marcadores moleculares microsatélites	19
1.8 Importancia de la diversidad genética en la conservación de especies.....	20
1.9 Estudios genéticos en <i>Manta birostris</i>	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo General.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. ÁREA DE ESTUDIO	24
4. JUSTIFICACIÓN	26
5. MATERIALES	30
5.1 Extracción de ADN a partir de muestras de tejido de <i>M. birostris</i>	30
5.2 Cuantificación de ADN:	30
5.3 Amplificación de regiones microsatélite (SSRs) mediante PCR:.....	30
5.4 Electroforesis en geles de acrilamida.....	31
5.5 Tinción con Nitrato de Plata	32
5.6 Electroforesis en geles de agarosa	32
5.7 Extracción de bandas en geles de agarosa	32
5.8 Análisis de datos	33
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> :.....	34
6.3 Selección de primers y amplificación de regiones microsatélites:	35
6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata:	36
6.5 Toma de datos y elaboración de matrices alélicas:	38
6.6. Análisis de diversidad genética y estimación de la estructura poblacional de <i>M. birostris</i> de la Isla de la Plata:	40
7. RESULTADOS.....	43
7.1 Extracción y cuantificación de ADN de tejido de <i>M. birostris</i> :.....	43
7.2 Amplificación de secuencias cortas repetitivas	43
7.3 Diversidad genética y estructura poblacional de las muestras de <i>M. birostris</i> del año 2013	44
7.4 Análisis basado en frecuencias alélicas de muestras de <i>M. birostris</i> de los años 2010-2013.....	44
7.5 Análisis de estructura poblacional temporal	46

7.6 Análisis de Dispersión Sesgada por Sexo.....	47
7.7 Análisis de parentesco.....	48
8. DISCUSIÓN	49
8.1 Diversidad genética y estructura poblacional de las muestras de M. birostris de la temporada de año 2013	49
8.2 Diversidad genética de M. birostris que visitaron la Isla de la Plata durante el periodo 2010-2013.	50
8.3 Análisis de la estructura poblacional de M. birostris que visitaron la Isla de la Plata durante el periodo 2010-2013.	52
8.4 Dispersión sesgada por sexo y fidelidad de sitio	57
8.5 Análisis de parentesco.....	59
9. CONCLUSIONES	61
10. RECOMENDACIONES.....	62
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
12. TABLAS	67
13. FIGURAS	72
14. ANEXOS	74

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Información de los 8 loci microsatélites de los 24 individuos analizados de *M. birostris* de la Isla de la Plata, Ecuador del año 2013. En la tabla se muestra la información resumida de cada locus. La temperatura de annealing de cada par de primers fue estandarizada por Yumiceba (2013). A los loci MA09, MA15, MA30, MA34 y MA43 (Kashiwagi et al., 2012) se les agregó la cola universal A descrita por Blacket et al. (2010) con secuencia GCCTCCCTCGCGCCA.67
- Tabla 2.** Concentraciones de ADN de *Manta birostris* extraído de muestras de tejido muscular y de moco y volúmenes obtenidos. La tabla muestra la identificación de las muestras de la temporada del 2013 con su concentración de ADN y el volumen aproximado disponible con el que se trabajó.68
- Tabla 3.** Heterocigosidad esperada de individuos de *M. birostris* muestreados en el 2013 provenientes de la Isla de la Plata y de Bajo Copé. Las heterocigosidades esperadas de los individuos de la Isla de la Plata y Bajo Copé son estadísticamente iguales según la comparación realizada mediante simulación de datos aplicada con la función *hs.stest* del paquete *adegenet*.69
- Tabla 4.** Distancia F_{ST} entre individuos de *M. birostris* muestreados en el 2013 provenientes de la Isla de la Plata y de Bajo Copé. La distancia F_{ST} es relativamente baja entre individuos muestreados en dos localidades dentro del mismo año.69
- Tabla 5.** Alelos exclusivos entre individuos de la Isla de la Plata y de Bajo Copé. Se muestra el número de alelos exclusivos en cada locus para las dos localidades. Los alelos exclusivos se encuentran sólo en uno o dos individuos para cada localidad. Se muestran únicamente estos 4 loci donde existieron alelos exclusivos. El resto de loci no presentó alelos exclusivos entre localidades.69
- Tabla 6.** Heterocigosidad esperada de poblaciones de *Manta birostris* de cada año. Las heterocigosidades esperadas de todos los años son estadísticamente iguales según la comparación realizada mediante simulación de datos aplicada con la función *hs.stest* del paquete *adegenet*.69
- Tabla 7.** Distancias F_{ST} entre individuos de *Manta birostris* de diferentes años muestreados en la Isla de la Plata. Se observa que las distancias entre individuos del 2013 y los demás años de muestreo son mayores.70
- Tabla 8.** Resultados de valor *p* para las pruebas de dispersión sesgada por sexo utilizando diferentes estadísticos. Se obtiene que no existe dispersión sesgada por sexo significativa con ninguno de los 4 estadísticos probados. El rango del valor *p* de la prueba de cada estadístico va de 0 a 1. Un valor de *p* menor a 0.05 indica que existe una diferencia significativa entre los estadísticos calculados para los grupos de cada sexo.70
- Tabla 9.** Valores del Índice de parentesco de Wang comparando individuos de cada año por separado y comparando a todos los individuos de todos los años juntos. En el año 2010 no se muestreó ningún individuo hembra. El rango del índice de Wang va de 0 a 0.5 Los valores negativos indican que no existe parentesco entre los individuos.70
- Tabla 10.** Valores del índice de parentesco de Wang comparando individuos pertenecientes a diferentes años. La pareja de años con mayor parentesco son el 2011 y el 2012, dado que presentan un valor del índice de Wang positivo. Los valores negativos indican que no existe parentesco entre los individuos pertenecientes a la pareja de años probada.71

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Resultado de Structure graficados con Distruct de individuos del año 2013. Se obtuvo un valor óptimo de K igual a 2. Sin embargo, no se observa estructura poblacional en los individuos del 2013 muestreados en la Isla de la Plata y Bajo Copé. 72
- Figura 2.** Resultados de Structure graficados con Distruct de individuos del periodo 2010-2013. El panel A muestra el resultado obtenido de los individuos muestreados en los años 2010-2013 tomando un K óptimo 2. El panel B muestra el resultado utilizando un K óptimo de 4. Se observa claramente cómo se separan en dos grupos los individuos del periodo 2010-2012 de los del año 2013. 72
- Figura 3.** PCoA de individuos de *M. birostris* del año 2013. Los individuos de la Isla de la Plata (color negro) se agrupan entre sí, como se observa en el círculo de color negro. Los individuos de Bajo Copé (color amarillo) se distribuyen ampliamente en varios cuadrantes. 73
- Figura 4.** PCoA de individuos de *M. birostris* de años 2010-2013. Los individuos del 2010 están representados por puntos de color rojo; los del 2011, de azul; 2012, verde y 2013, negro. Se observa que existen dos agrupaciones claras representadas por el círculo negro (individuos del 2013) y el círculo verde (individuos del periodo 2010-2012). Esto indica que los individuos del 2013 forman un grupo genéticamente diferente a los individuos del periodo 2010-2012. 73

INDICE DE ANEXOS

Anexo A. Trayectoria de migración de individuos de <i>M. birostris</i> rastreados desde septiembre hasta diciembre del año 2010. (Cedido por Michel Guerrero, Proyecto Mantas Ecuador)	74
Anexo B. Trayectoria de migración de individuos de <i>M. birostris</i> rastreados desde septiembre hasta diciembre del año 2012. (Cedido por Michel Guerrero, Proyecto Mantas Ecuador)	74
Anexo C. Trayectoria de migración de individuos de <i>M. birostris</i> rastreados desde septiembre hasta diciembre del año 2017. (Cedido por Michel Guerrero, Proyecto Mantas Ecuador)	75
Anexo D. Datos mensuales de temperatura superficial del agua en el año 2010. Cada barra representa el promedio de la temperatura medida en los dos puntos de muestreo, Manta y La Libertad. (Fuente: INOCAR)	75
Anexo E. Datos mensuales de temperatura superficial del agua en el año 2011. Cada barra representa el promedio de la temperatura medida en los dos puntos de muestreo, Manta y La Libertad. (Fuente: INOCAR)	76
Anexo F. Datos mensuales de temperatura superficial del agua en el año 2012. Cada barra representa el promedio de la temperatura medida en los dos puntos de muestreo, Manta y La Libertad. (Fuente: INOCAR)	76
Anexo G. Datos mensuales de temperatura superficial del agua en el año 2013. Cada barra representa el promedio de la temperatura medida en los dos puntos de muestreo, Manta y La Libertad. (Fuente: INOCAR)	77
Anexo H. Concentración de copépodos muestreados por arrastre vertical en el punto de muestreo de Manta en el año 2012. (Fuente: INOCAR).....	77
Anexo I. Concentración de copépodos muestreados por arrastre vertical en el punto de muestreo de Manta en el año 2013. (Fuente: INOCAR).....	78

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Taxonomía de *M. birostris*:

Las mantarrayas pertenecen a la superclase Peces, clase Condrictios, orden Rajiformes, suborden Myliobatoidei, familia Mobulidae y actualmente se encuentran divididas en dos géneros: *Mobula* y *Manta* (Marshall et al., 2009). El género *Mobula* cuenta con 9 especies reconocidas (Bustamante et al., 2012), mientras que el género *Manta* ha sido considerado monotípico hasta hace poco, cuando Marshall et al. (2009) propusieron su separación en dos especies. Esta nueva descripción de la especie *Manta birostris* fue basada en medidas morfométricas y características externas fácilmente reconocibles como la coloración, dentición, la presencia de una protuberancia postdorsal en la espina caudal y el tamaño. La segunda especie, *Manta alfredi*, también fue descrita nuevamente, resucitando la descripción realizada por Krefft (1868) (Kitchen-Wheeler, 2010). Marshall et al. (2009) sugieren la existencia de una tercera especie putativa endémica del Océano Atlántico y el Caribe: *Manta sp. cf. birostris* que podría ser recuperada de la descripción de Lesueur (1824) como *Manta giorna*, pero se necesita más evidencia científica para poder declararla una especie nueva.

1.2 Morfología y patrón de pigmentación:

Manta birostris tiene un cuerpo cartilaginoso aplanado, cuyo ancho es 2.2-2.3 veces mayor que el largo. Su ancho de disco (DW), es decir, la distancia entre las puntas de sus dos aletas pectorales de forma triangular, alcanza los 7 m, con reportes ocasionales de hasta 9.1 m (Marshall et al., 2009). Dewar et al. (2008) confirman que *M. birostris* puede pesar hasta 1.400 kg. Su cabeza presenta dos aletas cefálicas a modo de cuernos, una a cada lado, donde se ubican los ojos, justo antes del comienzo de cada aleta cefálica. Su boca se encuentra al frente del cuerpo y consta de bandas de 12 a 16 filas y 220 a 250 hileras de dientes únicamente en la

mandíbula inferior con un rango de 3000-4000 dientes. La morfología de los dientes entre individuos es variable y puede ser dimórfica entre sexos (Marshall et al., 2009).

Su piel está cubierta por dentículos con cúspide bífida, tanto en la superficie dorsal como ventral, en forma de crestas orientadas sagitalmente que la hacen áspera (Marshall et al., 2009). Las branquias se encuentran en la parte ventral cercana a la cabeza como dos columnas de 5 ranuras branquiales horizontales. En el área post-dorsal se encuentra la aleta dorsal, seguida de una protuberancia formada por masa calcificada debajo de la piel que la diferencia de *M. alfredi*. El largo de la cola corresponde a aproximadamente el 90% del largo de disco (DL, distancia entre la cabeza y el inicio de la cola). Al igual que otros elasmobranquios, como los tiburones, los machos de *M. birostris* presentan dos órganos reproductivos denominados “claspers”; y las hembras, una cloaca (Marshall et al., 2009).

Dentro de lo que corresponde a la pigmentación de *M. birostris* se tienen tres casos: individuos comunes, melanísticos y leucísticos. En los individuos comunes, la superficie dorsal es de color negro, presentando marcas blancas en los hombros en la región supra branquial. Las marcas de los hombros, que ocurren a los lados de una línea central negra, tienen forma triangular con una especie de extensión lateral en forma de anzuelo. El borde anterior de las marcas blancas de los hombros está alineado de forma paralela con el borde del maxilar superior, una característica importante que identifica a la especie. Una marca pálida en forma de una pequeña “V”, de tamaño variable, se encuentra anterior a la aleta dorsal. Pequeñas marcas de color blanco también son visibles en las puntas dorsales de las aletas pectorales (Marshall et al., 2009).

La superficie ventral es predominantemente blanca con manchas grises a negras que ocurren comúnmente en la región abdominal, a partir de la quinta ranura branquial hasta la apertura de la cloaca. No existen manchas entre las ranuras branquiales ni tampoco en las aletas pectorales. La tercera parte posterior del disco es de color carbón y en forma de una gran “V”,

formando un margen en los bordes posteriores de las aletas pectorales y dándole la característica de diagnóstico para la especie *M. birostris* (Marshall et al., 2009).

Las formas melanísticas son completamente negras en su superficie dorsal y en la parte ventral predomina el color negro, excepto por manchas blancas de tamaño variable en la línea media de la porción abdominal. Los individuos leucísticos tienen coloración blanca aumentada en la superficie dorsal y en la parte ventral son completamente blancas, excepto por el margen de las aletas pectorales con manchas de color carbón interrumpidas. De estas dos variantes, la leucística es la más rara (Marshall et al., 2009).

Marshall et al. (2011) comentan que es posible aprovechar estos patrones de pigmentación y utilizar programas de identificación de individuos de *M. birostris* por fotografías, ya que cada individuo presenta un patrón único de manchas negras en la superficie ventral que no cambia a través del tiempo.

1.3 Alimentación

M. birostris son animales filtradores, al igual que las grandes ballenas y ciertos tiburones (Dewar et al., 2008). Individuos de *M. birostris* en cautiverio han sido alimentados con eufásidos (pequeños crustáceos pelágicos) como *Euphasia pacifica*, *E. superba* y el camarón sakura, *Sergestes lucens* (Homma et al., 1999). En la naturaleza, son usualmente observadas alimentándose en canales de oleaje y cerca de luces en la noche que actúan como concentradores de la presa. Se ha visto que también pueden alimentarse de pequeños camarones, cangrejos, huevos, larvas y pequeños peces (Dewar et al., 2008).

Homma et al. (1999) reportan que en cautiverio, un macho de *M. birostris*, consume un 12.7% de su peso total en una semana. Otros autores comentan que, en la naturaleza, consumen un promedio de 20 a 30 kg de plancton por día (Stevens, 2006). Utilizan las aletas cefálicas para canalizar el agua y llevar la presa hacia la boca. El agua que ingresa

se dirige a las branquias, donde atrapan el plancton, y luego sale a través de las hendiduras branquiales (Dewar et al., 2008).

1.4 Reproducción

El comportamiento sexual de *M. birostris* consiste en cinco fases: persecución, mordida, copulación, post-copulación y separación. Primero se forma un “tren de apareamiento” en el que varios machos persiguen a una hembra compitiendo entre sí. Uno de los machos vence a los otros y empieza el ritual de reproducción. Luego de perseguir a la hembra por aproximadamente 20 minutos a una velocidad de 10 km/h a 1 m de la superficie del agua, el macho muerde la aleta pectoral izquierda de su pareja para sostenerla y proceder a la copulación. La copulación sucede cuando se juntan abdomen con abdomen y el macho inserta uno de sus claspers en la cloaca de la hembra durante 90 segundos (Yano et al., 1999).

Las mantas hembra alcanzan la madurez sexual alrededor de los 8 a 10 años de edad. Se las considera una especie ovovivípara porque las crías que dan a luz se desarrollan en un huevo dentro de la madre. Se estima que el periodo de gestación de *M. birostris* es de 12 a 13 meses, con un ciclo reproductivo de un año o dos. Por lo general, dan a luz a una sola cría y pueden tener otra después de 2 a 5 años. La madurez de los machos está entre los 5 y 6 años, y ocurre cuando el ancho del disco alcanza 3.8 m aproximadamente, y los claspers están completamente calcificados (Marshall et al, 2009).

1.5 Comportamiento migratorio

M. birostris se encuentra distribuida a nivel global en regiones tropicales y subtropicales, y ocasionalmente migran a aguas templadas (Bigelow y Schroeder, 1953; Compagno, 1999). Se han realizado estudios sobre la distribución geográfica-temporal de las mantas registrando la presencia de individuos identificados por fotografía. Dewar et al., (2008) han observado que las mantas presentan una dependencia de sitio basada en patrones de residencia local. En ciertas

regiones como Yap, Hawaii y Bora Bora se han observado a los mismos individuos repetidas veces durante largos periodos de tiempo, mientras que en otras como Nueva Zelanda, Australia, Baja California, México, África, Ecuador y Japón, la presencia ocurre por temporadas (Homma et al., 1999). El avistamiento de mantas en múltiples ocasiones en un mismo sitio es frecuente en zonas de limpieza y de alimentación (Homma et al., 1999). En aguas de la Guayana Francesa, Girondot y Ponge (2006) reportaron un grupo de 50 individuos de *M. birostris* nadando juntos en un área de 20 km² hacia una misma dirección. Reportes no publicados indican que las mantas se congregan en números de hasta 100 individuos en áreas como México, Mozambique, Maldives, Hawaii y Micronesia para aparearse y visitar estaciones de limpieza (Graham et al., 2012).

Investigaciones con dispositivos satelitales de rastreo se han desarrollado recientemente para el estudio de los patrones migratorios de *M. birostris*. Stewart et al. (2016) comentan que, a pesar de que la mayoría de grandes planctívoros realizan migraciones de largas distancias relacionadas a actividades de forrajeo, *M. birostris* presenta patrones de residencia. Sin embargo, también se han registrado movimientos de largas distancias que sobrepasan los 400 km (Germanov y Marshall, 2014). Stewart et al. (2016) revelan que el movimiento vertical de las mantas en las diferentes capas marinas puede estar asociado a la profundidad de la termoclina y a la densidad de zooplankton presente en el agua. Graham et al. (2012) sugieren que la temperatura superficial del mar y la concentración superficial de clorofila pueden ser variables que influyen en la migración de *M. birostris*. Se reporta un rango de temperatura con ocurrencia de mantas que va desde 25,1 a 30,06 °C y una concentración de clorofila entre 0.14 y 0.76 mg/m³ (Graham et al., 2012).

1.6 Importancia de estudios moleculares para la conservación de especies marinas migratorias

Uno de los objetivos principales de la conservación de especies marinas migratorias como *Manta birostris* es proteger a las agrupaciones de individuos de la pesca indiscriminada. Desde el punto de vista ecológico, se puede definir a un grupo de individuos como una población dependiendo del área geográfica en que se encuentran. Esto es lo que usualmente se hace en los programas de conservación para establecer una zona de protección y manejo de la pesca de especies marinas. Sin embargo, al delimitar una población sólo por el espacio que ocupa no se está tomando en cuenta su aspecto genético. Los estudios moleculares, a nivel genético, permiten comprender la estructura poblacional de los individuos y su diversidad intraespecífica. La comprensión de estos dos elementos podría ayudar a mejorar las estrategias de conservación de especies marinas migratorias (Reiss et al., 2009).

La definición de población a nivel ecológico refleja principalmente la co-ocurrencia y la interacción demográfica de los individuos en el espacio y tiempo. Por otro lado, la definición de población a nivel genético refleja las interacciones reproductivas entre individuos y su historia evolutiva. El nivel estimado de flujo génico dado por la reproducción entre individuos es un criterio que podría determinar la distinción entre poblaciones diferentes. Las poblaciones distintas genéticamente, en especies marinas migratorias, pueden estar explicadas por múltiples factores independientemente de las zonas geográficas que ocupan. Es por esto que es necesario entender no sólo las implicaciones ecológicas y geográficas de las poblaciones, sino también sus implicaciones a nivel molecular. La integración de estos dos aspectos biológicos resultaría en un mejor entendimiento de la estructura poblacional y una aplicación de estrategias de conservación de poblaciones más adecuadas (Reiss et al., 2009).

1.7 Marcadores moleculares microsatélites

Un marcador molecular genético es una sección del ADN (locus) que puede ser fácilmente rastreada y cuantificada en una población. Debe ser polimórfico y puede o no estar asociado a un gen en particular (Hayward et al., 2015). Los marcadores moleculares son utilizados en el estudio de genética de poblaciones para tratar de entender cómo la variación de la supervivencia, fertilidad y flujo génico contribuyen a la frecuencia alélica intra e inter poblacional (Parker et al., 1998). Los individuos de una especie pueden tener cierto grado de variación genética causada por mutaciones, inserciones, deleciones, inversiones, duplicaciones y translocaciones (Hayward et al., 2015). Esta variación puede ser detectada utilizando marcadores moleculares. Otras aplicaciones de los marcadores moleculares incluyen análisis filogenéticos, búsqueda de genes útiles, pruebas de paternidad y trazabilidad de alimentos (Konstantinov et al., 2005).

Existen dos tipos de marcadores moleculares genéticos: los marcadores basados en la técnica de PCR y los marcadores basados en la secuencia específica del ADN. Dentro de los marcadores basados en la técnica de PCR se tienen los RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNAs), RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) y los microsatélites. Los marcadores basados en secuenciación incluyen los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) (Hayward et al., 2005). De todos éstos, los microsatélites han sido los más utilizados en las últimas dos décadas. Sin embargo, existe una tendencia cada vez mayor de utilizar marcadores moleculares basados en secuenciación (Schöltterer, 2004).

Los microsatélites, o secuencias simples repetitivas (SSR), son segmentos de ADN compuestos por repeticiones en tándem de motivos. Los motivos son secuencias específicas de ADN de 2-6 nucleótidos (ej. AG, ATC). Los microsatélites pueden estar presentes en regiones codificantes, pero predominan en regiones no codificantes. Se caracterizan por tener un alto

grado de polimorfismo en cuanto a su longitud. El origen de este polimorfismo se debe a eventos de deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN. El deslizamiento de la polimerasa provoca la repetición adicional o la eliminación de motivos. De esta forma, se producen diferentes alelos para un locus en función de la longitud del segmento (Zane et al., 2002).

Los microsatélites tienen una gran aplicabilidad como marcadores moleculares. Se ha probado que pueden ser valiosos para el mapeo genético de varios organismos (Schuler et al., 1996). Se pueden aplicar en estudios filogenéticos, forenses y de genética de poblaciones. Tienen una gran popularidad entre los estudios enfocados en la conservación y manejo de recursos biológicos (Zane et al, 2002).

1.8 Importancia de la diversidad genética en la conservación de especies

Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), la diversidad genética dentro de las especies se refiere a la frecuencia y variedad de genes dentro y entre poblaciones de la misma especie. La diversidad genética es una de las formas de biodiversidad reconocida por dicha institución que necesita ser conservada. Existen dos argumentos principales para conservarla: la necesidad de diversidad genética para que ocurra evolución y la relación que existe entre la heterocigosidad y la adaptabilidad de las poblaciones. La heterocigosidad de una población determina la cantidad de individuos que tienen dos alelos diferentes para un mismo locus. Es una medida de la diversidad genética ampliamente utilizada. Una baja heterocigosidad podría estar relacionada con una mayor endogamia. La alta endogamia, a su vez, se relaciona con una menor capacidad de adaptación o *fitness* de los individuos a las condiciones ambientales. De igual manera, una población de tamaño pequeño puede tener una mayor tasa de endogamia, produciendo menor *fitness*. Conocer la diversidad genética de una población puede servir para determinar el estado en que se encuentra en

términos de vulnerabilidad y desarrollar programas de conservación adecuados (Reed y Frankham, 2003).

1.9 Estudios genéticos en *Manta birostris*

En general, existen muy pocas publicaciones científicas disponibles sobre genética en esta especie en particular a pesar de ser una de las mantarrayas más populares a nivel mundial. Kashiwagi et al. (2012) establecieron una firma genética para distinguir a las especies *M. alfredi* y *M. birostris* tiempo después de que Marshall et al. (2009) hayan hecho la distinción morfológica entre ambas y dado una nueva descripción del género *Manta*. Esta firma genética utiliza el gen *RAG1* (681 pb) del genoma nuclear y el gen mitocondrial *ND5* (1188 pb), en donde se observan haplotipos no compartidos por ambas especies, útiles para poder diferenciarlas. El gen *RAG1* codifica para las proteínas encargadas de activar la recombinación somática de los genes de los receptores de antígenos en los linfocitos (Spanopoulou et al., 1995); es un gen conservado que muestra variabilidad y se lo utiliza comúnmente para estudios filogenéticos en animales. El gen *ND5* codifica para la proteína NADH dehidrogenasa 5, que es parte del complejo I de las mitocondrias; interviene en la fosforilación oxidativa (Bai et al., 2000) y también se lo ha utilizado frecuentemente para estimar relaciones filogenéticas entre taxones animales (Simon et al., 1994). Walter et al. (2013) sugieren haber encontrado el primer híbrido viviente entre *M. alfredi* x *M. birostris* utilizando las firmas genéticas caracterizadas por Kashiwagi et al. (2012) con estos dos genes. Se encontró un individuo con características morfológicas de *M. alfredi* que contaba con un haplotipo mitocondrial nuevo para esta especie. Para la secuencia del gen *RAG1* se encontró que el individuo era heterocigoto mostrando 2 SNPs exclusivos para *M. alfredi* y *M. birostris*, por lo que se estimó que podría existir cierta compatibilidad sexual entre ambas especies.

En otro estudio realizado por Kashiwagi et al. (2012) se identificaron 10 loci microsatélites para *M. alfredi*, los cuales también amplificaron exitosamente para otras especies de

mantarrayas como *M. birostris* (9/10 loci), *Mobula japonica* (7/10), *M. thurstoni* (8/10), *M. tarapacana* (5/10). Estos loci han servido para la caracterización de la diversidad genética y estructura poblacional de *Manta birostris* en un estudio realizado por Yumiceba (2014) donde se analizaron individuos que visitaron la Isla de la Plata, Ecuador en el período 2010-2012. La diversidad genética de *M. birostris* en este estudio resulta ser relativamente alta basándose en la heterocigosidad esperada ($H_e = 0.61$) e Índice de Shannon ($I = 1.161$). Sin embargo, no existen otros estudios de este tipo en *M. birostris* como para comparar la diversidad genética en otras partes del mundo, ya que la investigación más reciente se ha enfocado en su alimentación, distribución y migración (Burges et al. 2017a; Stewart et al. 2016; Girondot et al. 2015).

En el presente estudio se utilizaron 8 de los 10 microsatélites descritos por Kashiwagi et al. (2012) para determinar la diversidad genética y estructura poblacional de individuos de *Manta birostris* muestreados en la Isla de la Plata y Bajo Copé en el año 2013. Adicionalmente, se utilizaron los datos de la matriz alélica obtenida en un estudio previo donde se analizaron muestras de *M. birostris* de la Isla de la Plata en el periodo 2010-2012. Como aporte nuevo al análisis de las muestras del estudio previo se realizaron pruebas de parentesco y dispersión sesgada por sexo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Determinar la diversidad genética y estructura poblacional en individuos de *Manta birostris* muestreados en la Isla de la Plata y Bajo Copé, Ecuador, en el año 2013 mediante microsatélites.

2.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar protocolo de PCR con primers heterólogos de regiones microsatélites para *M.birostris* (Kashiwagi et al., 20120) marcados con fluoróforos según el método de Blacket et al. (2010).
- Caracterizar la diversidad genética y la estructura poblacional de individuos de *Manta birostris* que visitaron la Isla de la Plata y Bajo Copé en el año 2013 analizando frecuencias y distancias genéticas.
- Determinar si existe dispersión sesgada por sexo en la muestra analizada.
- Comparar resultados obtenidos para el año 2013 con los resultados reportado por Yumiceba (2014) para los años 2010, 2011 y 2012.

3. ÁREA DE ESTUDIO

La Isla de la Plata ($01^{\circ}16'S$ $81^{\circ}03'W$) se encuentra aproximadamente a 30 km de la costa de la provincia de Manabí, Ecuador y abarca una extensión de 14.2 km^2 . Sus costas presentan altos acantilados, de modo que el único acceso a la isla para las embarcaciones es la playa de Bahía Drake. Forma parte del Parque Nacional Machalilla y se encuentra oficialmente protegida por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) (Cisneros-Heredia, 2005). Sus condiciones climáticas están influenciadas por las corrientes cálidas de Panamá y del Niño, por la corriente fría de Humboldt y la Contra-Corriente Ecuatorial. Es un sitio con importante diversidad biológica que cuenta con especies animales únicas en el Ecuador que han sido registradas también en las Islas Galápagos (Miranda, 2011). Las actividades turísticas que se realizan aquí incluyen el avistamiento de ballenas jorobadas y de mantarrayas gigantes que visitan la isla por temporadas (Sheidat et al., 2004). Las ballenas jorobadas pasan por las isla y varias playas a lo largo de toda la costa ecuatoriana entre junio y octubre (Félix y Haase, 1995). La temporada de avistamientos de *M. birostris* en la Isla de la Plata es desde junio hasta comienzos de octubre, con un pico marcado a desde mediados de agosto y principios de septiembre (Guerrero y Hearn, 2017).

De las 24 muestras procesadas y analizadas en este estudio 15 fueron recolectadas específicamente en el sitio de buceo de la Isla de la Plata conocido como La Pared ($01^{\circ}15'35.92''S$ $81^{\circ}4'52.26''W$). Se recolectaron muestras de tejido muscular o moco de individuos diferentes. Los individuos fueron fotografiados e identificados por el patrón de pigmentación en su vientre. La recolección fue realizada por Michell Guerrero y Andrea Marshall, investigadores del Proyecto Mantas Ecuador, cumpliendo con un el respectivo permiso ministerial. La recolección se realizó mediante inmersiones de buceo SCUBA en los meses de agosto, septiembre y octubre. Las inmersiones de buceo se realizaron alrededor de las 11 am. La profundidad máxima de buceo fue de aproximadamente 20 metros. Las muestras

fueron entregadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, donde se realizaron los análisis moleculares. La electroforesis capilar que se realizó para determinar el genotipo de los individuos se llevó a cabo en Macrogen (Seúl, República de Korea).

Las 57 muestras analizadas en el estudio previo (Yumiceba, 2014) fueron recolectadas por los investigadores mencionados anteriormente en los años 2010 (n = 4 individuos), 2011 (n = 10) y 2012 (n = 43). De igual manera, se analizaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la misma institución. Estas muestras fueron recolectadas en diferentes sitios de buceo de la Isla de la Plata conocidos como Punta el Faro (1°15'30.15''S 81°4'21.94''W), Roca Honda (1°15'28.73''S 81°4'30.00''W) y también en La Pared.

Bajo Copé (01°48'S 81°03'W) es un área marina ubicada al sur del Parque Nacional Machalilla en la provincia de Santa Elena, 18 millas frente a las costas de Montañita, con una extensión de 52 km² y un rango de profundidad aproximada de 10 a 80 m (Ministerio del Ambiente, 2010). Representa uno de los cuatro sitios de buceo más destacados de Santa Elena junto al Islote El Pelado, Black Sand y Barco Hundido (Suárez, 2013). En esta plataforma rocosa submarina los avistamientos de *M. birostris* ocurren también en la temporada de junio a octubre, y parece ser un sitio de agregación estacional importante para esta especie. Una actividad considerable de alimentación ha sido registrada en el Bajo Copé e incluso existen resultados de monitoreo que sugieren que los individuos permanecen mayor tiempo en este sitio de agregación que en la Isla de la Plata (WWF, 2015).

De las 24 muestras procesadas y analizadas en este estudio 9 se recolectaron en dos sitios específicos del Bajo Copé. Las coordenadas de los dos sitios son: 1°48'7.59''S 81°3'8.11''W y 1°49'7.10''S y 81°3'8.87''W. Los recolectores y condiciones de recolección fueron las mismas que en la Isla de la Plata, mencionadas anteriormente. De igual manera, los análisis moleculares y la electroforesis capilar se realizaron en Quito y Korea, respectivamente.

4. JUSTIFICACIÓN

Una de las principales justificaciones de este estudio es el hecho de que *M. birostris* se encuentra catalogada en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como una especie migratoria vulnerable con alto riesgo de extinción (Marshall et al., 2006). Al igual que otras especies de la familia Mobulidae, se encuentra amenazada por actividades antropogénicas como la pesca incidental e intencionada (Couturier et al., 2012). Actualmente existe poca información sobre el estado genético de las poblaciones de *M. birostris* y sus patrones migratorios que permita el desarrollo de programas de conservación adecuados (Stewart et al., 2016).

La especie representa un atractivo turístico para la Isla de la Plata y, por ende un ingreso económico importante (O'Malley et al., 2013). Sin embargo, en el Ecuador se registró un total de 15 toneladas de *M. birostris* capturadas en el periodo 2002-2011 (Mundy-Taylor y Crook, 2013). Es así que desde el 2009 el Proyecto Mantas Ecuador, dirigido por la Fundación Megafauna Marina del Ecuador (FMME), ha logrado generar datos útiles para el informe del estado de conservación de *M. birostris* en la valoración de especies consideradas en la Lista Roja de la UICN. Además, han desempeñado un papel fundamental en la inclusión de la especie en los apéndices de la Convención sobre la Conservación de las Especies Migratorias de Animales Silvestres (CMS) y la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), ambas propuestas presentadas a nivel internacional y dirigidas por el Ministerio del Ambiente del Ecuador (Guerrero y Hearn, 2017).

Al igual que con otras especies migratorias, los esfuerzos de conservación de *M. birostris* se han enfocado principalmente en acuerdos internacionales como el CMS y la CITES en un intento de restringir el impulso económico de la pesca de mantarrayas y prevenir su captura dirigida. Sin embargo, la efectividad del enfoque de manejo internacional de especies migratorias marinas es cuestionable, ya que ciertos países que han firmado los acuerdos

internacionales continúan practicando la explotación de mantarrayas (Stewart et al., 2016). Uno de los propósitos del presente estudio es fortalecer la conservación de esta especie tratando de establecer un enfoque de protección a nivel local en la Isla de la Plata y Bajo Copé.

Si bien existen estudios de rastreo satelital de *M. birostris* donde se observa que los individuos tienden a regresar al mismo sitio de avistamiento en diferentes años, el estudio de su estructura poblacional a nivel genético es escaso. Determinar la estructura poblacional de *M. birostris* en años consecutivos podría ayudar a entender si el grupo que visita la Isla de la Plata pertenece a una misma población que regresa año tras año o si existan múltiples poblaciones que visitan la isla y convergen en ciertas temporadas. Si se tratara del primer caso, es probable que la población permanezca relativamente cerca al lugar de avistamiento durante el resto del año y que tenga menor flujo genético con otras poblaciones. Se ha encontrado evidencia de esta posibilidad en 2 localidades de México relativamente cercanas entre sí (600 km) (Stewart et al, 2016). Stewart y colaboradores (2016) investigaron dos sitios de agregación de *Manta birostris* en México. Un sitio de agregación es el lugar donde se observa una gran cantidad de individuos en determinadas temporadas. Los autores antes mencionados encontraron que las mantarrayas rastreadas satelitalmente no se alejaban a más de 150 km a la redonda de su sitio de agregación y sus rutas migratorias no se solapaban. Además, los resultados obtenidos a nivel genético revelaban que los individuos muestreados en estos dos sitios de agregación presentaban una estructura poblacional bien definida. Los individuos de un sitio de agregación pertenecían a una población diferente a la del otro sitio de agregación según los resultados de Structure.

En Ecuador se tiene evidencia de individuos de *M. birostris* que se mueven desde la Isla de la Plata hacia Bajo Copé y luego hacia la Isla Santa Clara (El Oro, Ecuador) recorriendo aproximadamente 230 km. La distancia podría ser mayor en dirección al Sur. Por otro lado, no se ha documentado movimientos de gran escala de *M. birostris* fuera de la línea costera.

Guerrero y Hearn (2017) asumen que se trata de una gran población que migra apegada a lo largo de la costa oeste de América del Sur en función de la disponibilidad de alimento y condiciones ambientales. Rastreadores satelitales colocados recientemente (septiembre, 2017) en la Isla de la Plata mostraron el movimiento de dos individuos. Se logró dar seguimiento de los dos individuos durante 4 meses, es decir, hasta enero del 2018. El rastreo de estos individuos mostró que se mantuvieron desplazándose en la zona costera entre Ecuador y el norte de Perú. No se alejaron a más de 200 km de la costa en dirección al oeste y no se dirigieron a más de 300 km al sur de la Isla de la Plata. Se necesitaría rastrear a un mayor número de individuos y durante un periodo de tiempo más extenso para comprobar si verdaderamente se trata de un grupo de individuos con comportamiento residente de esta zona costera.

Si se tratara de un grupo residente de la zona costera ecuatoriana-peruana se podría establecer una estrategia de conservación que vincule sólo a estos dos países. Las consideraciones de manejo a tomar en cuenta no se aplicarían a una población que viaja distancias largas y que podría tener mayor flujo génico con diferentes poblaciones. Las consideraciones de manejo se harían considerando a una población relativamente más residente y vulnerable. Además, el manejo de la conservación de una población residente puede tener ventajas socio-económicas como un menor número de partes involucradas, facilidad en aplicar consideraciones jurídicas y un área de protección más pequeña (Stewart et al., 2016).

Hasta ahora la información obtenida de *M. birostris* en Ecuador y, específicamente en la Isla de la Plata por el Proyecto Mantas Ecuador se ha basado en transectos visuales, métodos de identificación por fotografía y telemetría (satelital y acústica) para monitorear patrones estacionales de visita, composición y abundancia (Guerrero y Hearn, 2017). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre diversidad genética o estructura poblacional. Es por esto que los datos presentados en este estudio podrían servir para complementar la información recopilada por el Proyecto Mantas Ecuador. De esta forma, se podría promover la participación

del Ministerio del Ambiente, Ministerio del Turismo y la Subsecretaría de Recursos Pesqueros para desarrollar una protección integral y perenne de *M. birostris* en el Ecuador.

5. MATERIALES

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

- Fragmentos de tejido cutáneo y muscular de *M. birostris*
- Buffer de lisis (10mM NaCl – 10mM Tris – 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 LA230 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 Amplificación de regiones microsatélite (SSRs) mediante PCR:

- ADN extraído de tejido de *M. birostris*
- Pares de primers de regiones microsatélites (Tabla 1)
- Cola universal marcada con fluoróforo 6-FAM, VIC, NED, PET
- *Taq* DNA polimerasa 5 U/ μ L (Invitrogen)
- Platinum *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)

- MgCl₂ 50 mM (Invitrogen)
- Ultra Pure Distilled Water (GIBCO)
- dNTPs 10 mM (Invitrogen)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- T Personal Thermocycler (Biometra)

5.4 Electroforesis en geles de acrilamida

- Ultra Pure Acrylamide (Invitrogen)
- Ultra Pure N,N'-Methylenebisacrylamide (Invitrogen)
- TBE 1X (89.15 mM Tris base – 88.95 mM Ácido Bórico – 2.54 mM EDTA)
- Ultra Pure UREA (Invitrogen)
- Detergente Alconox
- Cleaning sheets-Kimwipes (Kimberly-Clark)
- Etanol 70%
- Rain.X™
- Sigmacote^R (SIGMA)
- Solución para tratamiento de vidrios (etanol 96% y ácido acético glacial 0.5%)
- Bind-Silane (3-Trimethoxysilyl-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)

5.5 Tinción con Nitrato de Plata

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

5.6 Electroforesis en geles de agarosa

- SeaKem LE Agarosa
- TBE 1X (86.15 mM Tris base – 88.95 mM Ácido Bórico – 2.54 mM EDTA)
- SYBR Safe (Invitrogen)
- Ultra Pure 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)

5.7 Extracción de bandas en geles de agarosa

- Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)

- Bisturí
- Hojas de bisturí
- Alcohol isopropílico (98%)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- Tubos Eppendorf 1.5 mL
- Balanza analítica (Sartorius LA230 S)
- Transiluminador de luz azul (Safe Imager 2.0, ThermoFisher)

5.8 Análisis de datos

- Software R-studio (RStudio Team, 2015) incluyendo el paquete:
 - *hierfstat* (Goudet y Jombart, 2015)
 - *adegenet* (Jombart, et al., 2016)
- Software Structure 2.3.4 (Pritchard, et al., 2000)
 - Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2014)
 - CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007)
 - distruct 1.1 (Rosenberg, 2004)
 - Adobe Illustrator®
- Software DARwin (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006)

6. MÉTODOS

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

Se recolectaron 24 muestras de tejido de individuos de *M. birostris* que visitaron la Isla de la Plata durante los meses de agosto a octubre del 2013. La colecta se realizó cumpliendo los requerimientos del permiso de investigación N° 008 RM-DPM-MA otorgado 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 y de Bajo Copé, Santa Elena, Ecuador, Proyecto Mantas Ecuador” del instituto NAZCA de investigaciones marinas. Las personas encargadas de tomar las muestras fueron Michel Guerrero y Andrea Marshall, investigadores del Proyecto Mantas Ecuador, quienes entregaron las muestras de tejido muscular de *M. birostris* al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ.

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) previamente estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

Se cortó y pesó 0.01 g de tejido muscular o moco en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se añadieron 495 µL de buffer de lisis y 5 µL de proteinasa K al tubo, y se mezcló varias veces. Se incubó por 16-19 horas a 56°C con agitación hasta que la mayor parte del tejido sufrió lisis. Se agregaron 250 µL de acetato de amonio frío y se mezcló vigorosamente. Se centrifugaron los tubos a una velocidad de 13200 rpm durante 20 min a una temperatura de 4°C. Se trasladó el sobrenadante a tubos eppendorf nuevos previamente rotulados, evitando resuspender el precipitado en el fondo de los tubos centrifugados. Se añadieron 750 µL de etanol frío al 100% y se mezcló. Se centrifugó nuevamente a 13200 rpm por 20 min a 4°C y se comprobó que se haya formado un precipitado en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante y se añadieron

500 μ L de etanol frío al 100%. Se resuspendió el precipitado que contenía el ADN para lavarlo y se volvió a centrifugar con las condiciones anteriores. Se descartó la mayor cantidad de etanol sin levantar el precipitado y se colocaron los tubos en la cámara de flujo laminar para que el etanol remanente se evapore. Finalmente, se resuspendió el ADN en 30-50 μ l de TE 1X y se almacenó a -20°C hasta ser utilizado.

La concentración de ADN se determinó usando un espectofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). La integridad del ADN se determinó mediante geles de agarosa al 1% (80V, 45 min) con el uso de SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) y fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD). Se diluyeron las muestras a una concentración final de 10 ng/ μ L para las reacciones de PCR y se almacenaron a -20°C .

6.3 Selección de primers y amplificación de regiones microsatélites:

En un estudio realizado por Kashiwagi et al. (2012) se diseñaron y estandarizaron 10 pares de primers de regiones microsatélites que se probaron en *M. alfredi*, *M. birostris* y ciertas especies del género *Mobula*. De estos marcadores, sólo 9 mostraron amplificación para *M. birostris*. Posteriormente, Yumiceba (2014) reportó amplificación para 8 de estos 9 primers. En este estudio se utilizaron los 8 primers distribuidos de la siguiente manera: primers MA14, MA21 y MA49 para amplificar y genotipar con geles de poliacrilamida siguiendo los protocolos reportados por Yumiceba (2014); y los 5 primers restantes MA09, MA15, MA30, MA34 y MA43 fueron resintetizados con una cola universal (secuencia de 15 pares de bases) agregada al extremo 5' para aplicar la metodología de amplificación con fluoróforos descrita por Blacket et al. (2010) y genotipar utilizando el software GeneMarker (SoftGenetics LLC, 2012).

Las reacciones de PCR con los tres primeros primers se realizaron con un volumen final de 10 μ L compuestas por una concentración de 1X de Buffer de PCR (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl_2 (Invitrogen), 1 mg/mL de BSA, 0.4 mM de dNTPs (Invitrogen), 5 μ M de los primers

forward y reverse, 1 unidad de *Taq* polimerasa (Invitrogen) y 20 ng de ADN genómico. Las reacciones de PCR con los cinco primers restantes se realizaron con un volumen final de 25 μ L compuestas por las mismas concentraciones de Buffer de PCR, $MgCl_2$, BSA y dNTPs. Los primers forward con la cola universal se aplicaron a una concentración de 0.15 μ M; los primers marcados con fluoróforo a 0.2 μ M y los reverse a 0.5 μ M. Se utilizó una unidad de Platinum *Taq* polimerasa (Invitrogen) por reacción y 10 ng de ADN genómico.

El programa del termociclador se estableció con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, luego 37 ciclos de tres fases cada uno: 30 segundos a 94°C; 45 segundos a la temperatura de *annealing* estandarizada para cada primer (Tabla 1) y 90 segundos de extensión a 72°C; seguido de una extensión final de 72°C por 10 minutos (Kashiwagi et al., 2012; Yumiceba, 2014)

Para las muestras que presentaban bandas inespecíficas en las fotos de geles de agarosa o generaban picos inespecíficos dentro del tamaño esperado en GeneMarker (SoftGenetics LLC, 2012) se realizó una extracción de bandas utilizando el protocolo del PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). El PCR para generar estas bandas se realizó sin fluoróforo y el PCR de reamplificación del ADN extraído de las bandas obtenidas del gel de agarosa se realizó aplicando el primer marcado con fluoróforo. Las concentraciones de los reactivos de PCR en estos casos específicos corresponden a las mismas mencionadas anteriormente (con y sin fluoróforo). La temperatura de *annealing* de los primers para estas muestras se incrementó hasta un máximo de 65°C con el fin de eliminar las bandas inespecíficas en la amplificación.

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

Los productos de las reacciones de PCR de los primers MA14, MA21 y MA49 se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% con el uso del sistema Sequi-Gen™ (Biorad). Para revelar las bandas obtenidas se utilizó nitrato de plata basándose

en el protocolo de Benbouza (2006) y un protocolo estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

Se lavó el vidrio 4 veces cuidadosamente con el detergente Alconox y pequeños trozos de cleaning-sheets Kimwipe. Se enjuagó con agua tibia y se dejó secar al ambiente. Se limpió el vidrio con etanol 70%. Se añadió de forma homogénea en la superficie del vidrio 3 mL de una solución Bind-Silane (SIGMA-ALDRICH). Se dejó secar y se limpió nuevamente con etanol al 70%. Se añadió 3 mL de Rain X y después 800 µL de Sigmacote (SIGMA). Se limpiaron todas las piezas de la cámara de electroforesis con etanol al 70% y se la armó con las indicaciones del fabricante. Una vez armada la cámara se inyectaron 100 mL de una solución de acrilamida al 6% (5M de urea y acrilamida/bisacrilamida en proporción 19:1), con 545 µL de persulfato de amonio al 10% y 109 µL de TEMED. Se introdujo el peine con las puntas hacia el exterior de la cámara para formar el frente de corrida y se dejó polimerizar el gel durante 60 min. Se pasó el gel de la posición de polimerización a la posición vertical de corrida. Se añadieron 400 mL de TBE 1X caliente a la base de polimerización y 1100 mL en el interior de la cámara. Se retiró el peine y se limpiaron restos de urea con pipeta Pasteur. Se formó los pocillos metiendo las puntas del peine en el gel y se limpió nuevamente la urea con la pipeta Pasteur. Se realizó una pre-corrida cargando 1 uL de buffer de carga y saltándose un pocillo para descartar posibles filtraciones. Se programó la fuente de voltaje a 80 Watts por 30 min.

Se prepararon los productos de PCR agregándoles 1 uL de Blue Juice 10X (Invitrogen). Una vez finalizada la pre-corrida se cargaron 5 uL de las muestras en cada pocillo y 3 uL del *ladder* 10 pb (Invitrogen), denaturados a 95°C por 5 min. La electroforesis se realizó durante 2 horas y media a 3 horas aproximadamente a 80 Watts a una temperatura de 50 °C.

Terminada la electroforesis se reveló el gel de acrilamida con nitrato de plata basándose en el protocolo de Benbouza (2006). Se separó el vidrio de la cámara y se dejó reposar por 5

min en una bandeja que contiene solución fijadora fría. Se apagaron las luces para colocar el gel cara arriba en una bandeja con solución de tinción por 7 min con agitación constante. Se lavó el vidrio durante 10 segundos con 2 litros de agua destilada y se pasó inmediatamente el vidrio a una bandeja con solución de revelado por 7 min manteniendo una leve agitación. Se trasladó el vidrio a una bandeja con solución fijadora por 3 min sin agitación y con la luz encendida. Se realizó un segundo lavado con 2 L de agua destilada y se dejó secar al ambiente en posición vertical hasta el siguiente día.

6.5 Toma de datos y elaboración de matrices alélicas:

Para los primers utilizados con la metodología de electroforesis en geles de poliacrilamida la toma de datos se realizó con transiluminador de luz blanca. Se marcó sobre el vidrio en la cara opuesta al gel el área que corresponde al tamaño esperado de cada primer para todas las muestras y se identificaron los alelos. Para determinar el tamaño de los alelos se midió la distancia de migración de las bandas del *ladder* (marcador de peso molecular) y de cada uno de los alelos. Se realizó una regresión lineal tomando como base la distancia en centímetros de las bandas del ladder y su tamaño en pares de bases, y se introdujo a la ecuación lineal obtenida los datos de distancia de los alelos para convertirlos en tamaño en pares de bases.

Para los primers utilizados con la metodología de amplificación con fluoróforos la toma de datos se realizó mediante el software GeneMarker (SoftGenetics LLC, 2012). Se colocó en placas de 96 pocillos los productos de amplificación de las reacciones de PCR de los diferentes primers combinando un máximo de 2 primers por muestra en cada pocillo. La organización del contenido de los pocillos se realizó en base a los tamaños esperados de cada primer, poniendo juntos a los que tenían mayor diferencia en pares de bases y utilizando diferentes fluoróforos para cada primer. De esta forma, las amplificaciones de las muestras en cada pocillo quedaron organizadas de la siguiente manera: primers MA09 (fluoróforo VIC) y MA34 (NED) juntos;

primers MA15 (PET) y MA43 (FAM), juntos; y MA30 (NED), solo. Se identificó cada pocillo y se envió la placa a Macrogen (Seúl, Korea) para que los fragmentos amplificados sean analizados con un secuenciador ABI 3130xl (Applied Biosystems). Los resultados obtenidos del secuenciador permitieron determinar el tamaño de los amplicones. El tamaño de los amplicones se determina identificando los picos intensidad de fluorescencia de cada muestra. Los picos de cada fluoróforo (VIC, NED, PET y FAM) asociado a un locus se examinaron en GeneMarker (SoftGenetics LLC, 2012) para las 24 muestras. Se tomaron en cuenta sólo los picos de fluorescencia que estaban más cercanos al tamaño esperado de cada primer. A los tamaños esperados de los primers estandarizados por Yumiceba (2014) se les añadió 15 pares de bases pertenecientes a la cola universal (Tabla 1). Los picos que se observaban en el software se analizaron siguiendo dos patrones para el reconocimiento de alelos: tomando en cuenta los picos de mayor intensidad y registrando los tamaños de pares de bases de los alelos de forma que la diferencia de tamaño entre alelos de un mismo locus sea coherentes con el número de pares de bases del motivo de cada locus.

Para elaborar la matriz alélica se utilizó MS Excel. Se realizó una tabla donde se escribió el nombre de los 8 loci en las columnas, utilizando dos columnas por locus; el código de cada individuo en las filas y el tamaño en pares de bases correspondiente al alelo en las celdas. Con esta matriz alélica se realizaron los análisis de diversidad genética y de estructura poblacional utilizando diferentes programas. Para ciertos programas de análisis de datos el formato de la matriz fue modificada utilizando un simple editor de texto como Notepad++ para generar archivos en formatos separados por comas (.csv) u otros específicos para cada programa.

6.6. Análisis de diversidad genética y estimación de la estructura poblacional de *M.*

birostris de la Isla de la Plata:

Para determinar la diversidad genética de las muestras de mantarrayas de la temporada del 2013, se calcularon los siguientes valores: número de alelos encontrados e índice de Shannon (I) por locus y heterocigosidad esperada (H_e), utilizando los softwares GenAlEx 6.501 (Peakall y Smouse, 2012) y RStudio (RStudio Team, 2015) con el paquete *adegenet*, comando `Hs` (Jombart, et al., 2016). Se calculó la heterocigosidad esperada de las localidades Isla de la Plata y Bajo Copé por separado y se determinó si existe diferencia significativa entre ambas mediante simulación de datos aplicada con la función `hs.test` del paquete *adegenet*.

Para los análisis de estructura poblacional, se removió al locus MA15 de la matriz de alelos, ya que se determinó que era monomórfico. Se calculó la distancia F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) entre los individuos de las dos localidades utilizando el paquete *hierfstat* comando `pairwise.fst`. Para estimar el número de grupos que mejor explica la estructura poblacional de nuestra muestra se utilizó el programa Structure (Pritchard, et al., 2000) y la herramienta Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2014) tomando en cuenta todos los loci. Ambos programas se utilizaron para determinar el valor K óptimo, el cual corresponde al número supuesto de linajes al que corresponden los individuos que está mejor explicado por los datos en base a inferencia bayesiana. Se evaluaron valores de K entre 1 y 8, realizando 10 réplicas por cada K, con modelo *admixture* utilizando 100.000 pasos de *burn-in* y 1'000.000 de pasos de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Los programas CLUMMP (Jakobsson y Rosenberg, 2007) y Distruct 1.1 (Rosenberg, 2002) se usaron para poder graficar un consenso de los resultados obtenidos con Structure.

Se utilizó el programa DARwin 5.0.158 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006), para realizar un análisis de PCoA donde se pueden agrupar visualmente a los individuos según

distancias euclidianas entre puntos (en este caso, las distancias genéticas entre individuos). Se tomaron en cuenta los 8 loci para el análisis incluyendo el MA15. Se utilizaron los datos de los individuos muestreados el 2013 en la Isla de la Plata y en Bajo Copé.

Se realizó una ampliación de la muestra con los resultados obtenidos en el trabajo de titulación realizado por Yumiceba (2014) donde se analizan individuos de los años 2010-2012. Con esta ampliación se pudo analizar si existe estructura poblacional entre en los individuos que visitaron la Isla de la Plata en años consecutivos. Para analizar la muestra ampliada se utilizó el programa RStudio (RStudio Team, 2015), paquete *adegenet* (Jombart, et al., 2016) para determinar si existe diferencia significativa entre las heterocigosidades esperadas (removiendo el locus MA15) de cada año mediante una simulación de datos implementada en la prueba *hs.test* que utiliza el método de Montecarlo (Jombart, et al., 2016). Se utilizó el paquete *hierfstat* (Goudet y Jombart, 2015), comando *fstat*, para calcular los índices de fijación F_{ST} , F_{IT} y F_{IS} , que van a determinar si la diversidad genética está explicada mayormente por la variabilidad que existe entre individuos de diferentes años, o por la variabilidad dentro de cada año. Las distancias F_{ST} se calcularon con el comando *pairwise.fst*

Con el programa DARwin 5.0.158 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006) se realizó un PCoA de la muestra ampliada con los individuos de *M. birostris* de las temporadas del 2010-2013. Se tomaron en cuenta los datos de los 8 loci. Los individuos de cada año fueron identificados con colores diferentes en la gráfica para que se puedan distinguir visualmente.

Con el paquete *hierfstat* (Goudet y Jombart, 2015) se realizó una prueba de dispersión sesgada por sexo usando la función *sexbias.test*. Esta prueba se lleva a cabo mediante simulación y permutación de datos utilizando cuatro estadísticos para determinar si son los machos o las hembras las que se alejan de su lugar de nacimiento antes de reproducirse. Los estadísticos son: la media del coeficiente del índice de asignación (mAIC), la varianza del coeficiente del índice de asignación (vAIC), y los estadísticos F_{IS} y F_{ST} . La razón por la cual se

utilizan 4 estadísticos para una misma prueba es que $vAIC$ es más sensible a la presencia de pocos migrantes con genotipos bastante diferentes, mientras que F_{ST} y F_{IS} son más sensibles cuando la dispersión se da en una proporción grande de la muestra aun cuando sus genotipos son poco diferentes. La prueba con el estadístico $mAIC$ representa un intermedio entre los tres (Goudet, Perrin y Waser, 2002).

El programa CoAncestry (Wang, 2011) se utilizó para estimar el grado de parentesco que existe entre individuos de un mismo año de muestreo y entre individuos pertenecientes a diferentes años. Se interpretaron los resultados en base al índice de coancestro de Wang, uno de los estimadores generados por el programa, el cual compara un individuo x y un individuo y , que pueden estar genéticamente correlacionados de dos maneras: que un solo alelo de un determinado locus sea *identical by descent* entre ambos individuos, o que los dos alelos de un locus sean *identical by descent*. Las probabilidades de que ocurran estos dos eventos son estimados a través de *Maximum Likelihood* mediante un modelo matemático descrito por Wang (2002), que finalmente permite obtener el nivel de parentesco entre dos individuos clasificándose de la siguiente manera: un valor de 0.5 entre padres e hijos; 0.25 entre hermanos completos y 0.125 entre medios hermanos.

7. RESULTADOS

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

Las concentraciones de ADN obtenidas de la extracción de las 24 muestras de mantarrayas de la temporada del 2013 fueron medidas con el sistema NanoDrop 1000 (Termo Fisher Scientific). Las concentraciones se encuentran en el rango de 10-1314.4 ng/ μ L (Tabla 2). Los índices de calidad de ADN 260/280 y 260/230 variaron entre 1,74-2,76 y 0.36-2.04, respectivamente (valores no mostrados). Algunas muestras provenían de tejido y otras de moco, lo cual puede explicar la diferencia de calidad en el ADN entre diferentes muestras.

7.2 Amplificación de secuencias cortas repetitivas

De los 8 pares de primers utilizados solo uno resultó ser monomórfico, el MA15, que en resultados obtenidos por Yumiceba (2014) mostraba 3 alelos en un rango de 151-157 pb en geles de poliacrilamida. En el presente estudio se consideró este locus como monomórfico para las muestras de individuos del periodo 2010-2013. Esta decisión se tomó luego de amplificar el locus MA15 con 4 muestras de ADN escogidas al azar de individuos del periodo 2010-2012. Se utilizó una muestra de ADN de un individuo para el año 2010 y 2011, y dos para el 2012. El genotipado con electroforesis capilar reveló un único alelo de 146 pb para todos los individuos. Los demás loci presentaron amplificación utilizando las temperaturas de *annealing* mostradas en la Tabla 1 y un rango de alelos entre 3 y 8.

Las muestras MB16, MB18 y MB24 que presentaban picos inespecíficos en GeneMarker dentro del rango esperado para ciertos primers fueron sometidas a una nueva amplificación aumentando la temperatura de *annealing* hasta un máximo de 65°C para eliminar bandas inespecíficas y pasar por un proceso de extracción de banda en gel de agarosa y reamplificación que permitió completar información faltante del genotipado. En muestras MB13 y MB16 no se obtuvo información para 3 y 2 loci, respectivamente por falta de ADN stock.

7.3 Diversidad genética y estructura poblacional de las muestras de *M. birostris* del año 2013

Se obtuvo un total de 39 alelos para los 8 loci en las 24 muestras. El número de alelos por locus fue de 1-8. Los loci más informativos fueron el MA43, MA14 y MA49 con índices de información de Shannon de 1.503, 1.705 y 1.754, respectivamente (Tabla 1). El índice de Shannon promedio de la muestra fue 1.064 y la heterocigosidad esperada promedio fue 0.606. La heterocigosidad esperada encontrada en los individuos analizados de la Isla de la Plata ($n = 15$, $H_e = 0.591$) resultó ser estadísticamente igual ($p < 0.05$) a la heterocigosidad esperada de los individuos analizados de Bajo Copé ($n = 9$, $H_e = 0.601$) (Tabla 3). La distancia F_{ST} (0.019) entre ambas localidades fue relativamente baja (Tabla 4). Se encontraron pocos alelos exclusivos para cada locus (de 1 a 2) entre ambas localidades. De igual manera, los alelos exclusivos de cada locus se presentaron en sólo uno o dos individuos. Los alelos exclusivos sólo se encontraron en 4 de los 8 loci: MA30, MA34, MA43 y MA40 (Tabla 5).

Los resultados obtenidos del Structure utilizando solo las muestras recolectadas en el año 2013 indican que el valor óptimo de K es 2, sin embargo se observó que no existe una estructura poblacional definida (Figura 1).

7.4 Análisis basado en frecuencias alélicas de muestras de *M. birostris* de los años 2010-2013

Las heterocigosidades esperadas de cada uno de los grupos de individuos muestreados en diferentes años se encuentra entre 0.596-0.638 siendo el año 2012 el de mayor valor. Es necesario tomar en cuenta que el número de individuos muestreados en cada año es diferente. Para el 2010 se tienen 4 individuos; para el 2011, 10 individuos; para el 2012, 43 individuos; y para el 2013, 24 individuos (Tabla 6). Se realizó la prueba $h_s.test$ del paquete *adegenet* que sirve para comparar las heterocigosidades esperadas de los diferentes años y determinar si

son estadísticamente iguales. Según la prueba *hs.test* realizada entre las heterocigosidades esperadas de los diferentes años, se obtuvo que éstas son estadísticamente iguales. Se comparó la heterocigosidad esperada entre las posibles combinaciones de parejas de años. Para la comparación de las heterocigosidades esperadas del 2010 y del 2011 con la prueba *hs.test* se obtuvo que son estadísticamente iguales entre sí ($p = 0.879$). La comparación entre heterocigosidades esperadas del 2010 y 2012 indica que también son estadísticamente iguales ($p = 0.224$). Las heterocigosidades esperadas del 2010 comparadas con las del 2013, a su vez, son estadísticamente iguales ($p = 0.623$). Lo mismo ocurre cuando se comparan las heterocigosidades del 2011 y 2012 ($p = 0.144$); 2011 y 2013 ($p = 0.531$) y 2012 y 2013 ($p = 0.253$); todas son estadísticamente iguales cuando se comparan en parejas.

Se utilizó la prueba *fstat* del paquete *hierfstat* (Goudet y Jombart, 2015). Esta prueba calcula los estadísticos F de Wrigth de una muestra de individuos. Los estadísticos F de Wrigth sirven para analizar la diversidad genética dentro y entre subpoblaciones. Los estadísticos F de Wrigth calculados de los individuos muestreados en el periodo 2010-2013 fueron: $F_{ST} = 0.100$, $F_{IT} = 0.082$ y $F_{IS} = -0.021$. El estadístico F_{ST} , también llamado índice de fijación, es una medida de la diferenciación genética que existe entre subpoblaciones. En este caso, las subpoblaciones para el índice global de F_{ST} fueron los cuatro años de muestreo. El rango de F_{ST} va desde cero, que implicaría que no existe diferenciación entre subpoblaciones, hasta uno, que implicaría una completa diferenciación entre subpoblaciones. El valor obtenido de $F_{ST} = 0.100$ indica que la variabilidad total de los datos está mayormente explicada por la diferenciación que existe entre individuos muestreados en diferentes años (Weir y Cockerham, 1984).

El estadístico F_{IT} , también conocido como índice de fijación total, es una medida de la diferenciación de los individuos entre sí en relación al total de individuos muestreados. El rango de F_{IT} va desde cero, que implicaría que no existe diferenciación entre individuos, hasta

uno, que implicaría una completa diferenciación entre individuos. El valor obtenido de $F_{IT} = 0.082$ es más bajo que el índice $F_{ST} = 0.100$. Esto indica que una menor parte de la variabilidad total de los datos está explicada por la diferenciación que existe entre los individuos totales (Weir y Cockerham, 1984).

El estadístico F_{IS} , también conocido como coeficiente de endogamia, es una medida de la endogamia genética que existe dentro de las subpoblaciones. En este caso las subpoblaciones son los cuatro años de muestreo. El rango de F_{IS} va desde menos uno, que implicaría que todos los individuos son heterocigotos, hasta uno, que implicaría que todos los individuos son homocigotos. El valor obtenido de $F_{IS} = -0.021$ indica que no existe endogamia en los grupos de individuos muestreados en diferentes años. El valor negativo indica que existe un mayor número de heterocigotos de lo que se esperaría en una población en equilibrio de Hardy-Weinberg (Weir y Cockerham, 1984).

7.5 Análisis de estructura poblacional temporal

Con el programa Structure se obtuvieron tres resultados. Primero se analizaron los individuos muestreados sólo en la temporada del 2013. En este análisis se obtuvo un valor óptimo de K mediante el método de Evanno et al. (2005) simulado en la plataforma en línea Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2014). El K óptimo ($K = 2$) que se obtuvo tenía la probabilidad más alta de las K probadas del 1 al 8. Como se observa en la Figura 1, la proporción de cada linaje o acervo genético para todos los individuos representa la mitad de la contribución genética. Por lo tanto, se podría sugerir que no existe estructura poblacional definida dentro de los individuos muestreados el 2013 en la Isla de la Plata y Bajo Copé.

Luego se analizaron los individuos de la muestra total del periodo 2010-2013. Igual que en el caso anterior, el valor de K óptimo fue de 2. En este caso, la contribución genética de los dos posibles linajes separa a los individuos muestreados en dos grupos marcados. Un grupo conformado por los individuos de los años 2010-2012 y otro formado por los del año 2013

(Figura 2). Después, se tomó arbitrariamente un valor K óptimo de 4 (uno por cada año de muestreo) se obtuvo que los individuos del periodo 2010-2012 acumulan la contribución de tres linajes en proporción similar, mientras que los del año 2013 acumulan la contribución de un cuarto linaje diferente a los anteriores. (Figura 2). Este tercer análisis sólo confirma que los individuos se separan en los dos grupos antes mencionados: 2010-2012 y 2013.

En el análisis de PCoA se observa que los individuos del año 2013, analizando sólo ese año, no forman agrupaciones lo suficientemente claras. Cabe recalcar que se distinguieron los individuos de las localidades Isla de la Plata y Bajo Copé con diferentes colores (Figura 3). Sin embargo, cuando se analizan los 4 años juntos, se observa que los individuos de los años 2010-2012 se separan claramente de los individuos del 2013. Los individuos del año 2011 también se agrupan, pero esta agrupación no es clara, mientras que los individuos del año 2010 se encuentran dentro del grupo de los del 2012 (Figura 4).

7.6 Análisis de Dispersión Sesgada por Sexo

Los resultados obtenidos con *hierfstat* utilizando la función `sexbias.test` indican que no existe dispersión sesgada por sexo en individuos de *M. birostris* muestreados en el periodo 2010-2013. Se tomó la muestra total de los 81 individuos sin distinguir entre años de muestreo y se agruparon en dos grupos: machos y hembras. En esta prueba se calcularon los estadísticos $mAIC$, $vAIC$, F_{ST} y F_{IS} explicados en la sección 6.6 para el grupo de los machos y de las hembras por separado. La prueba determinó que el estadístico $mAIC$ es estadísticamente igual en machos y hembras ($p = 0.58$); el estadístico $vAIC$ también es estadísticamente igual en los grupos de ambos sexos ($p = 0.51$); lo mismo sucede para el estadístico F_{ST} ($p = 0.77$) y el estadístico F_{IS} ($p = 0.77$) (Tabla 8). Estos resultados indican, por cuatro estadísticos diferentes, que los machos y hembras de la muestra se dispersan por igual.

Cuando el estadístico $mAIC$ calculado del grupo de un sexo es estadísticamente diferente al del grupo del otro sexo, el sexo dispersante es el de mayor valor. Lo mismo sucede

en el caso del estadístico $vAIC$. En cuanto al estadístico F_{ST} , el sexo dispersante debe presentar un menor valor que el sexo filopátrico. En contraste, el estadístico F_{IS} es mayor en el sexo dispersante que en el sexo filopátrico (Goudet, Perrin y Waser, 2002).

7.7 Análisis de parentesco

Según los resultados de CoAncestry se encontró que no existe parentesco entre los individuos muestreados en las temporadas de los cuatro años consecutivos, reflejado en un valor del estimador de parentesco de Wang negativo (-0.033). El rango del estimador de Wang, asumiendo una población grande donde todos los individuos se aparean completamente al azar, va desde 0 a 0.5. Un valor de 0 implicaría que no existe parentesco entre los individuos muestreados; un valor de 0.25 implicaría que los individuos muestreados son hermanos; y un valor de 0.5 implicaría que los individuos corresponden a padres e hijos. Sin embargo, también se pueden obtener valores negativos. Un valor negativo indica que los individuos están menos emparentados de lo que se esperaría asumiendo una población grande donde todos los individuos se aparean completamente al azar. Se obtuvo un nivel moderadamente alto de parentesco según el estimador de Wang entre individuos dentro de un mismo año en los casos del 2011 y 2013 (0.194 y 0.182, respectivamente) (Tabla 9), mientras que al comparar parejas de diferentes años se encontraron valores de parentesco bajos. Entre los individuos de los años 2011 y 2012 se obtuvo un valor de índice de Wang de 0.048. En las comparaciones de individuos de la pareja 2011 y 2013 y la pareja 2012 y 2013 se obtuvieron valores del índice de Wang negativos (-0.186 y -0.181, respectivamente) (Tabla 10).

Al analizar el parentesco entre individuos hembra y macho por separado se obtienen resultados similares, es decir, valores globales del estimador de parentesco de Wang negativos, valores moderadamente altos en 2011 y 2013, y valores bajos y negativos cuando se comparan individuos de diferentes años (Tablas 9 y 10).

8. DISCUSIÓN

8.1 Diversidad genética y estructura poblacional de las muestras de *M. birostris* de la temporada de año 2013

Se encontró una diversidad moderadamente alta para este año tanto en la Isla de la Plata ($H_e = 0.591$) como en Bajo Copé ($H_e = 0.601$). Podría sugerirse que los individuos de ambas localidades tienen una buena capacidad de adaptabilidad o *fitness* a las condiciones ambientales (Reed y Frankham, 2003). La diversidad genética encontrada en ambas localidades, podría explicarse por el elevado número de individuos avistados en estos puntos de agregación. Guerrero y Hearn (2017) reportan un total de 2539 individuos de *M. birostris* avistados entre el 2009 y el 2016 en la Isla de la Plata y Bajo Copé, siendo el mayor número registrado a nivel mundial. Con un tamaño de población grande es más probable que exista mayor heterocigosidad y un menor grado de endogamia (Reed y Frankham, 2003).

Se ha podido evidenciar una alta conectividad entre individuos de la Isla de la Plata y Bajo Copé (Guerrero y Hearn, 2017). Los resultados de estructura poblacional para individuos muestreados en el 2013 en el presente estudio corroboran esta conectividad. La distancia genética de F_{ST} calculada entre individuos de ambas localidades es baja (0.019). Este resultado sugiere que los individuos son genéticamente parecidos en cuanto a los alelos encontrados por loci y su frecuencia en cada localidad. Además, se encontró que existen pocos alelos exclusivos entre individuos de ambas localidades (Tabla 5). Si se tratara de dos poblaciones genéticamente diferenciadas posiblemente se observaría un mayor número de alelos exclusivos entre sí, pero este no es el caso.

En el análisis de PCoA de los individuos del 2013 (Figura 3) se observa que los individuos muestreados en la Isla de la Plata forman una agrupación. Mientras que los individuos de Bajo Copé están distribuidos abiertamente. Este resultado sugiere que no existe una separación clara entre individuos de ambas localidades. Sin embargo, indica que los

individuos muestreados en la Isla de la Plata son más parecidos genéticamente entre sí que los individuos muestreados en Bajo Copé. Resultaría interesante investigar a nivel ecológico porqué los individuos muestreados en Bajo Copé resultaron genéticamente más distantes entre sí en ese año. Sin embargo, fue a partir del año 2013 que el Proyecto Mantas Ecuador comenzó a expandir sus esfuerzos de monitoreo de *M. birostris* en Bajo Copé. Por esta razón, no existe tanta información de los individuos de Bajo Copé, como la que se encuentra disponible para los de la Isla de la Plata. Lo que se sabe de Bajo Copé es que representa también un lugar importante de apareamiento y un punto de alta concentración de alimento para *M. birostris* (Guerrero y Hearn, 2017).

El resultado obtenido con el análisis utilizando Structure indica que no existe una estructura poblacional definida en los individuos muestreados en el año 2013 (Figura 1). Esto podría sugerir que los individuos que visitaron la Isla de la Plata y Bajo Copé en ese año pertenecen a una sola gran población. Este resultado apoya la conectividad entre individuos de la Isla de la Plata y Bajo Copé encontrada por Guerrero y Hearn (2017) mediante estudios de marcaje satelital de *M. birostris*. En estudios preliminares de marcaje satelital realizados por los mismos autores se encontró que existen individuos que se movilizan entre la Isla de la Plata, Bajo Copé y aguas peruanas.

8.2 Diversidad genética de *M. birostris* que visitaron la Isla de la Plata durante el periodo 2010-2013.

El total de individuos de *M. birostris* muestreados en el periodo 2010-2013 presentó una diversidad genética moderadamente alta ($H_e = 0.679$). Además, el resultado de la prueba *hs.test* muestra que las heterocigosidades esperadas de los cuatro años del período 2010-2013 son estadísticamente iguales entre sí. Este resultado podría sugerir que la diversidad genética de los individuos muestreados en años diferentes ha permanecido moderadamente alta

a través del periodo 2010-2013. Esta diversidad podría estar explicada por la alta probabilidad de reproducción entre individuos pertenecientes posiblemente a poblaciones distantes geográficamente y diferentes genéticamente (Stewart et al., 2016). La probabilidad de encontrarse con individuos lejanos está dada por las largas distancias de migración que presenta la especie *M. birostris*. Esta relación directamente proporcional entre la distancia de migración y la heterocigosidad esperada ha sido observada en otras especies migratorias de gran importancia para los biólogos dedicados a la conservación de megafauna marina (Schmidt et al., 2009).

Dado que no existen estudios publicados sobre diversidad genética de *M. birostris* utilizando marcadores moleculares microsatélites aparte del presente trabajo, no se puede realizar una comparación con individuos de otros lugares del mundo. Sin embargo, se puede tomar como referencia las diversidades genéticas encontradas en otras especies marinas migratorias de gran tamaño. En un estudio reciente realizado por Kershaw y colaboradores (2017) se encontraron valores de heterocigosidad esperada entre 0.678-0.738 en individuos de ballena jorobada (*Megaptera novaengliae*) muestreados en el Océano Atlántico e Índico. Schmidt y colaboradores (2009) determinaron la heterocigosidad esperada de individuos de tiburón ballena muestreados en diferentes océanos (incluyendo muestras de la Isla de la Plata) y obtuvieron un valor promedio de 0.690. En individuos de raya águila (*Aetobatus narinari*) muestreados en Florida, México y Cuba se ha obtenido una heterocigosidad esperada entre 0.726-0.764 (Sellas et al., 2015).

Mientras que en un estudio de Kashiwagi y colaboradores (2012) realizado en individuos de Japón, se encontró una heterocigosidad esperada de 0.48 para mantarrayas de arrecife (*Manta alfredi*), la especie hermana de *M. birostris*. Esta baja heterocigosidad esperada (0.48) comparada con la encontrada en este estudio (0.679) podría estar explicada por la alta fidelidad de sitio y residencia que presenta *M. alfredi*. De esta forma, se confirma la idea de

que un comportamiento migratorio de distancias relativamente largas, como el que presenta *M. birostris*, puede estar relacionado a una alta diversidad genética.

En cuanto a la investigación sobre distancias de migración y análisis genético de *Manta birostris* en zonas diferentes a la Isla de la Plata, existe uno en particular realizado por Stewart y colaboradores (2016). En este estudio, realizado en individuos de *M. birostris* muestreados en localidades de Indonesia y México, se sugiere que los individuos migran distancias cortas (50 km y 150 km a la redonda, respectivamente) al contrario de lo que se ha observado en estudios realizados en la Isla de la Plata, donde se han registrado distancias de migración entre 230 km y 1500 km (Hearn et al., 2014). Sin embargo, Stewart y sus colaboradores (2016) no presentan la diversidad genética expresada en heterocigosidad esperada, dado que utilizaron secuenciación de ddRAD (double digested Restriction-site Associated DNA) en lugar de regiones microsatélites.

8.3 Análisis de la estructura poblacional de *M. birostris* que visitaron la Isla de la Plata durante el periodo 2010-2013.

Los resultados de los tres análisis realizados para determinar la estructura poblacional de los individuos muestreados en el periodo 2010-2013 indican una clara separación en dos poblaciones. Una población está conformado por los individuos muestreados en los tres primeros años: del 2010 al 2012; y la otra población, por individuos muestreados en el 2013. El análisis de las distancias genéticas de F_{ST} (Tabla 7) indica que existe una mayor distancia genética entre individuos del año 2013 y los tres años anteriores. Mientras que la distancia genética entre los individuos muestreados dentro del periodo 2010-2012 es baja. El análisis de PCoA (Figura 4) y el de Structure (Figura 2) también muestran una diferenciación clara entre estos dos grupos. En esta sección se discutirán las posibles explicaciones de la diferencia genética encontrada en los individuos muestreados en el año 2013.

Como se mencionó anteriormente, los resultados del análisis utilizando el programa Structure indican que existen dos poblaciones bien definidas entre individuos muestreados en los años 2010-2012 y los del 2013 (Figura 2). Este resultado implica un valor del K óptimo igual a 2. El valor del K óptimo indica el número supuesto de linajes o acervos genéticos al que corresponden los individuos en base a inferencia bayesiana. Estos dos acervos genéticos podrían tener orígenes geográficos diferentes (Reiss et al., 2009). Sin embargo, no se puede conocer el origen geográfico de estos acervos genéticos, ya que haría falta mayor investigación de rastreo satelital y a nivel genético.

La información de rastreo satelital que se tiene disponible para individuos de *M. birostris* de la Isla de la Plata dentro del periodo de estudio corresponde a los años 2010 y 2012 (Anexos A y B). Desafortunadamente, en el año 2013 no se logró conseguir información de rastreo satelital (Guerrero y Hearn, 2017). En el año 2010 se colocaron rastreadores a tres mantarrayas. Sorprendentemente, una de ellas migró hacia el oeste, aproximadamente 1500 km, cerca del archipiélago de Galápagos. Esta migración representa la mayor distancia registrada por rastreo satelital en mantarrayas del mundo. Las otras dos mantarrayas se dirigieron hacia el sur manteniéndose cerca de la costa. En el año 2012 se colocaron rastreadores a cuatro mantarrayas. Una de ellas migró en dirección noroeste, y las otras tres en dirección al sur. Cabe mencionar que la aplicación de los rastreadores en ambos años se realizó entre los meses de septiembre y octubre, que corresponden al final de la temporada de avistamiento de mantarrayas en la Isla de la Plata (Guerrero y Hearn, 2017).

Esta evidencia de rastreo satelital no permite conocer de dónde provienen las mantarrayas que visitan la Isla de la Plata, sino sólo hacia dónde se dirigen. Sin embargo, se sugiere que una posible explicación de porqué una población diferente visitó la Isla de la Plata en el año 2013 puede estar relacionada con su patrón migratorio. Stewart y sus colaboradores (2016) comentan que *M. birostris* puede presentar dos tipos de migración: de largas distancias

y de distancias cortas. En el caso de las mantarrayas de Isla de la Plata, la evidencia de rastreo satelital muestra la posibilidad de los individuos de migrar largas distancias hacia Galápagos y distancias cortas hacia el sur (Guerrero y Hearn, 2017). Además, información reciente no publicada de rastreo satelital de individuos de la Isla de la Plata muestra un comportamiento residente. Se rastreó a dos individuos que no se alejaron de las costas ecuatorianas y peruanas durante 4 meses luego de la temporada de avistamiento en la Isla de la Plata (Anexo C). Estas dos formas de patrones migratorios (largas y cortas distancias) podrían explicar la estructura poblacional de las mantarrayas que visitan la Isla de la Plata. Sin embargo hace falta mayor investigación sobre el tema.

El comportamiento migratorio de *M. birostris* puede verse influenciado por las diferentes condiciones ambientales (Guerrero y Hearn, 2017). En la literatura se encuentran varias publicaciones donde se establece una relación entre variables oceanográficas y el patrón de migración de mantarrayas (Graham et al., 2012; Gironde et al., 2014; Burgess et al., 2016; Stewart et al., 2016). En la sección Anexos se muestra información sobre la temperatura superficial del agua y concentración de copépodos facilitada por el Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador (INOCAR) correspondiente a dos puntos de muestreo de la costa ecuatoriana. Un punto de muestreo se encuentra a 10 millas frente a Manta, Manabí y el otro a 10 millas frente a La Libertad, Santa Elena. Estas dos puntos de muestreo son los más cercanos a las localidades analizadas en este estudio: la Isla de la Plata y Bajo Copé, respectivamente.

Los datos de temperatura superficial del agua fueron tomados mensualmente en los años 2010, 2011, 2012 y 2013. Las mediciones de la temperatura se realizaron desde la superficie del agua hasta 50 m de profundidad en intervalos de 1 m. Es decir, se tomaron 50 valores de temperatura por cada día de muestro. Se realizaron dos muestreos al mes. Se realizó un promedio entre las mediciones realizadas en el punto de muestreo frente a Manta y frente a La Libertad. En los Anexos D-G se muestran gráficas de barras que representan la variación

de la temperatura superficial del agua a través de los meses de cada año. Para el año 2010 se obtuvo un valor promedio anual de la temperatura superficial del agua de 18.50 ± 1.36 °C; para el año 2011 se obtuvo 18.53 ± 1.86 °C; para el año 2012 se obtuvo 18.84 ± 1.86 °C; y para el año 2013 se obtuvo 17.84 ± 0.64 °C. Estos resultados indican que en el 2013 existió una disminución de la temperatura superficial del agua promedio en aproximadamente 1 °C en comparación a los tres años anteriores. Esta disminución de la temperatura podría ser otra de las explicaciones de la estructura poblacional encontrada en mantarrayas de la Isla de la Plata (Burgess et al., 2016).

Los copépodos son un grupo de crustáceos pequeños que forman parte del zooplancton y sirven de alimento para *M. birostris* (Dewar et al., 2008). Los datos disponibles para concentración de copépodos se encuentran en los Anexos H-I. Estos datos sólo corresponden al punto de muestreo a 10 millas de Manta, Manabí. La cuantificación de los individuos de copépodos se realizó utilizando una malla de 335 micras en un volumen de agua conocido. Las mediciones corresponden a un solo día de muestreo por mes. La información de estos datos sólo estuvo disponible para los años 2012 y 2013. En el 2012 se obtuvo un pico de individuos de copépodos por metro cúbico en el mes de marzo. En el 2013 se obtuvo un pico en el mes de mayo, es decir dos meses más tarde que en el año anterior. Esta diferencia en la época de afloramiento de copépodos que existe entre los dos años podría explicar por qué en el 2013 vino una población diferente a la Isla de la Plata. Se sabe que las mantarrayas pueden mostrar una alta plasticidad en cuanto a su patrón de migración cuando se trata de buscar alimento (Stewart et al., 2016).

Girondo y colaboradores (2014) sugieren que en individuos de *M. birostris* de Guayana Francesa existe una correlación entre los avistamientos, la temperatura superficial del y la producción primaria neta en el océano. Graham y colaboradores. (2012) encontraron que el 95% de los avistamientos de *M. birostris*, ocurrían cuando la temperatura superficial de agua

era mayor a 26.1°C. Esto se observó en una población de mantarrayas de la Península de Yucatán. Burgess y colaboradores (2016) reportan que mantarrayas de la Isla de la Plata suelen bajar a aguas más profundas y frías para buscar alimento y luego suben a la superficie para incrementar la temperatura de su cuerpo. Stewart y colaboradores (2016) encontraron que mantarrayas del Archipiélago de Revillagigedo (México), marcadas satelitalmente, tienen un alto nivel de plasticidad en cuanto a sus patrones de forrajeo en diferentes estaciones del año. Se evidenció que pueden forrajear cerca de la superficie, en la termoclina y a profundidades mayores a 100 m. Todos estos estudios presentan evidencia de que la temperatura y la concentración de alimento en el agua son variables que influyen sobre el patrón de migración de *M. birostris*.

Estas variables oceanográficas están influenciadas, a su vez, por las corrientes marítimas que convergen en las costas ecuatorianas como son: la corriente fría de Humboldt y la corriente cálida del Niño. De estas dos corrientes, la que podría tener mayor influencia sobre el patrón de migración de *M. birostris* que visitan la Isla de la Plata es la corriente fría de Humboldt. Esto se debe a la gran cantidad de nutrientes que trae a las costas ecuatorianas (Guerrero y Hearn, 2017). Una de las instituciones encargadas de monitorear los efectos climáticos de las corrientes marítimas en el Océano Pacífico es el Centro Internacional para la Investigación del Fenómeno de El Niño (CIIFEN). En la página web oficial del CIIFEN se tiene a disposición boletines mensuales de la temperatura superficial del agua de la zona del Pacífico ecuatorial y sus predicciones de cambio.

En el boletín mensual de julio del 2013 del CIIFEN se observa que ocurre una disminución de la temperatura superficial del agua de la zona costera ecuatorial bajo los rangos normales para esa época del año. Las predicciones de este boletín indican que la temperatura superficial del agua se mantendrá ligeramente por debajo del rango normal para los próximos tres meses. Este periodo de tiempo coincide con la temporada de avistamiento de *M. birostris*

en la Isla de la Plata. Esta disminución de la temperatura es atribuida a la influencia de la corriente de Humboldt (CIIFEN, 2013). Desafortunadamente, la página del CIIFEN no tiene a disposición las predicciones de la temperatura superficial del agua del mes de julio para los tres años anteriores. Sin embargo, el boletín del año siguiente, que corresponde a julio del 2014 sí está disponible. En este boletín se indica lo contrario al año 2013. Para el mes de julio del 2014 se tiene una temperatura más alta que el rango normal para esa época del año. Además, se menciona que en meses anteriores se consideraba la posibilidad de un fenómeno del Niño, debido a altas temperaturas registradas, sin embargo, en julio esta posibilidad se descartó (CIIFEN, 2014).

Estas anomalías climatológicas registradas para finales del 2013 y comienzos del 2014 pudieron haber influenciado en el patrón de migración de *M. birostris* en su búsqueda por temperaturas marinas adecuadas y alimento suficiente. El cambio en las condiciones ambientales del año 2013, específicamente, pudo haber promovido la llegada de una población diferente a los años anteriores (Stewart et al, 2016; Guerrero y Hearn, 2017). Otra evidencia que sugeriría un cambio en el ambiente durante el año 2013 es la baja cantidad de avistamientos de *M. birostris* registrada para ese año en comparación a años anteriores (M. Guerrero, comunicación personal, 8 de mayo del 2018). En este trabajo se sugiere que existe una relación estrecha entre la estructura poblacional y el patrón migratorio de *M. birostris* que visitaron la Isla de la Plata en el periodo 2010-2013. Además, que el patrón migratorio de las mantarrayas pudo haber sido influenciado por las condiciones oceanográficas del año 2013.

8.4 Dispersión sesgada por sexo y fidelidad de sitio

La prueba de dispersión sesgada por sexo analiza la proporción de individuos dispersantes en una muestra. Los individuos dispersantes son considerados inmigrantes en la población muestreada. Se dice que un individuo es dispersante cuando cumple dos condiciones: (i) tuvo que migrar lejos de su población de origen en una etapa juvenil; y (ii) su genotipo es menos

probable de encontrar en la población en la que fue muestreada siendo adulto. Según Goudet, y colaboradores (2002), el conjunto de individuos del sexo dispersante tiene déficit de heterocigotos y una menor estructura genética. El resultado obtenido con la función `sexbias.test` mostró que tanto machos como hembras del periodo 2010-2013 se dispersan por igual. Esto sugiere que la diversidad genética en machos y hembras es similar y que ambos sexos migran lejos de su lugar de nacimiento antes de alcanzar la madurez sexual. Este estudio representa el primer esfuerzo por determinar dispersión sesgada por sexo en esta especie a partir de información genética. Sellas et al. (2015) hicieron un análisis de dispersión sesgada por sexo basada en información de 10 regiones microsatélites en una especie migratoria cercana a *M. birostris*, la raya pintada, *A. narinari*, y encontraron que esta especie tampoco tiene una dispersión sesgada significativa por sexo.

Guerrero y Hearn (2017) afirman que de los 2539 encuentros con *M. birostris* registrados entre 2009-2016 en la Isla de la Plata, se obtuvo un promedio de 75 hembras y 111 machos avistados por año. En el presente estudio se tienen 32 hembras, 42 machos y 7 individuos con sexo desconocido muestreados en el periodo 2010-2013. Como se ha mencionado anteriormente, se cree que la Isla de la Plata podría ser un sitio de reproducción para *M. birostris* por evidencias de cópula y hembras preñada. En la especie hermana *M. alfredi* se ha encontrado que el mayor número de individuos avistados son hembras y que éstas presentan mayor fidelidad de sitio que los machos en localidades de agregación de Australia (Couturier et al., 2014). En el caso de *M. birostris* de la Isla de la Plata hace falta información sobre el sexo al que pertenecen los individuos identificados y reavistados en diferentes años, lo cual permitiría determinar si existe mayor fidelidad de sitio en machos o hembras. Otro dato importante es que en la Isla de la Plata sólo se tiene registro de individuos juveniles y adultos, pero nunca se han reportado neonatos o crías pequeñas (menores a 3 m) (Guerrero y Hearn, 2017).

8.5 Análisis de parentesco

Los resultados obtenidos por CoAncestry indican un nivel de parentesco bajo tomando en cuenta a todos los individuos del periodo 2010-2013 (-0.033). Este resultado sugiere que los 81 individuos muestreados en el periodo de los 4 años no pertenecen a un mismo grupo familiar. Con esto se descarta la posibilidad de que exista un solo grupo familiar que regresó en múltiples años. Guerrero y Hearn (2017) reportaron que el retorno de individuos a la Isla de la Plata en diferentes años es bastante raro.

Se obtuvo un nivel de parentesco alto en individuos pertenecientes al 2011 (0.194) y en individuos pertenecientes al 2013 (0.162). Este resultado sugiere que probablemente los individuos muestreados en esos años pertenecen a dos grupos familiares diferentes. Un grupo familiar del 2011 y otro grupo familiar del 2013. Se corrobora esta posibilidad al comparar el nivel de parentesco entre esta pareja de años (2011 y 2013). En esta prueba se obtuvo un valor de parentesco negativo, lo cual significa que no están emparentadas (Tabla 10). Estos dos resultados sugieren que puede existir migración en grupos familiares por parte de *M. birostris* hacia la Isla de la Plata. Hasta el momento, el presente estudio es el primer esfuerzo por determinar el nivel de parentesco en individuos de esta especie.

Cuando se calcula el índice de parentesco de individuos machos y hembras por separado se obtienen resultados comparables a los valores de índice de parentesco sin distinguir entre sexos. Es decir, en los años 2011 y 2013 se muestra un nivel de parentesco alto. Para poder confirmar que realmente *M. birostris* es un animal que migra en grupos familiares es necesaria mayor investigación. Jacoby y colaboradores (2012) afirman que ciertas especies de elasmobranquios (tiburones y rayas), presentan dos tipos de comportamientos: un comportamiento solitario con eventos de migración grupal y agregación en sitios específicos (como la Isla de la Plata y Bajo Copé) y un comportamiento social donde los individuos permanecen en grupos durante todo el año. En los alrededores de la Isla de la Plata se han

encontrado ocasionalmente individuos nadando solos en épocas del año cuando no es temporada de agregación de mantarrayas (M. Guerrero, comunicación personal, 2018). Hace falta mayor investigación para determinar si las mantarrayas migran en grupos familiares definidos o si migran en grupos no emparentados entre sí.

9. CONCLUSIONES

- La diversidad genética de *Manta birostris* de la Isla de la Plata ha permanecido moderadamente alta en el periodo 2010-2013, con un valor promedio de heterocigosidad esperada ($H_e = 0.679$) comparable al de especies relacionadas que presentan largas distancias de migración.
- El patrón de migración de esta especie puede estar relacionada con variables influenciadas por las corrientes marítimas como la temperatura superficial del agua y la concentración de producción primaria neta, sin embargo, no se ha logrado constatar si existe una correlación entre la presencia de *M. birostris* en ciertas temporadas y las variables mencionadas.
- Se encontró que los individuos muestreados en las temporadas del periodo 2010-2012 y en la temporada del 2013 forman dos grupos genéticamente diferentes.
- Los individuos muestreados no presentan dispersión sesgada por sexo, pero falta mayor investigación para saber cuál de los dos sexos presentan mayor fidelidad de sitio y si realmente la Isla de la Plata constituye un sitio de reproducción para esta especie.
- El nivel de parentesco entre los individuos es bastante bajo cuando se compara a toda la muestra, pero individuos de los años 2011 y 2013 presentan un nivel de parentesco alto, sugiriendo que podrían darse migraciones en grupos familiares.

10. RECOMENDACIONES

- Tomar un mayor número de muestras por año para que los resultados de los análisis estadísticos sean más robustos y para determinar si existen individuos que regresan a la Isla de la Plata en años siguientes.
- Se recomienda el desarrollo de primers de regiones microsatélites específicos para *M. birostris*, ya que en ciertos primers heterólogos utilizados en este estudio se observó bandas inespecíficas en la amplificación y, aunque la mayoría estaban fuera del rango de tamaño esperado de los alelos, pueden aumentar la probabilidad de cometer errores al momento de genotipar no sólo en geles de poliacrilamida, sino también en el análisis de picos de fluorescencia en GeneMarker.
- Realizar estudios de marcaje satelital ligados a estudios genéticos para entender mejor qué tan lejana es la distancia que recorren las *M. birostris* que visitan la Isla de la Plata, de dónde provienen, y si esto tiene alguna relación importante con su diversidad genética.
- Obtener información cuantitativa más amplia de variables como la temperatura superficial del agua, la producción neta primaria y flujo de corrientes para determinar cómo éstas influyen en el comportamiento migratorio de *M. birostris* en diferentes años.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bai, Y., Shakeley, R. M., y Attardi, G. (2000). Tight control of respiration by NADH dehydrogenase ND5 subunit gene expression in mouse mitochondria. *Molecular and cellular biology*, 20(3), 805-815.
- 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.
- Bigelow H.B. and Schroeder W.C. (1953) Sawfish, guitarfish, skates and rays. In Bigelow H.B. and Schroeder W.C. (eds) *Fishes of the Western North Atlantic. Part 2*. New Haven, CN: Sears Foundation for Marine Research, Yale University, pp. 508–514
- Blacket, M. J., Robin, C., Good, R. T., Lee, S. F., y Miller, A. D. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 456-463.
- Burgess, K. B., Couturier, L. I., Marshall, A. D., Richardson, A. J., Weeks, S. J., y Bennett, M. B. (2016). Manta birostris, predator of the deep? Insight into the diet of the giant manta ray through stable isotope analysis. *Royal Society open science*, 3(11), 160717.
- Burgess, K. B., Guerrero, M., Richardson, A. J., Bennett, M. B., y Marshall, A. D. Use of epidermal mucus in elasmobranch stable isotope studies: a pilot study using the giant manta ray (*Manta birostris*). *Marine and Freshwater Research*.
- Bustamante, C., Couturier, L. I., & Bennett, M. B. (2012). First record of *Mobula japonica* (Rajiformes: Myliobatidae) from the south-eastern Pacific Ocean. *Marine Biodiversity Records*, 5, 48.
- Carpenter, K. E., & Niem, V. H. (2001). FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 5. Bony fishes part 3 (Menidae to Pomacentridae). *FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific. Volume 5. Bony fishes part 3 (Menidae to Pomacentridae)*. CIIFEN. (2013). Boletín del Océano. Análisis del Pacífico Oriental – julio 2014. Recuperado el 23 de mayo del 2018 desde http://www.ciifen.org/index.php?option=com_content&view=article&id=818 CIIFEN.
- (2014). Boletín del Océano. Análisis del Pacífico Oriental – julio 2014. Recuperado el 23 de mayo del 2018 desde http://www.ciifen.org/index.php?option=com_content&view=article&id=998
- Cisneros-Heredia, D. (2005). La avifauna de la isla de La Plata, Parque Nacional Machailla, Ecuador, con notas sobre nuevos registros. *Cotinga* 24: 22-27
- Compagno L.J.V. (1999) Systematics and body form. In Hamlett W.C. (ed.) *Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes*. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, pp. 1–42
- Couturier, L. I. E., Marshall, A. D., Jaine, F. R. A., Kashiwagi, T., Pierce, S. J., Townsend, K. A. y Richardson, A. J. (2012). Biology, ecology and conservation of the Mobulidae. *Journal of Fish Biology*, 80(5), 1075-1119.
- Couturier, L. I., Dudgeon, C. L., Pollock, K. H., Jaine, F. R. A., Bennett, M. B., Townsend, K. A., y Richardson, A. J. (2014). Population dynamics of the reef manta ray *Manta alfredi* in eastern Australia. *Coral Reefs*, 33(2), 329-342
- Dewar, H., Mous, P., Domeier, M., Muljadi, A., Pet, J. y Whitty, J. (2008). Movements and site fidelity of the giant manta ray, *Manta birostris*, in the Komodo Marine Park, Indonesia. *Marine Biology*, 155(2), 121.

- Earl, D. A., y von Holdt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- 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.
- Félix, F. y Haase, B. (1998). La investigación de la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) alrededor de la isla de La Plata, Manabí, durante 1995. *Acta oceanográfica del Pacífico*, 9(1), 219-227.
- Germanov, E.S., y Marshall, A.D., (2014). Running the gauntlet: regional movement patterns of Manta alfredi through a complex of parks and fisheries. *PLoS One* 9, e110071.
- Girondot, M., Bédel, S., Delmoitié, L., Russo, M., Chevalier, J., Guéry, L., y Jribi, I. (2015). Spatio-temporal distribution of Manta birostris in French Guiana waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95(1), 153-160.
- Girondot, M., y Ponge, L. (2006). Survol aérien au large des côtes de Guyane française–Avril-Juillet 2006. *Museum National d’Histoire Naturelle de Paris, 25 rue Cuvier, 75005 Paris, France et Laboratoire d’Écologie, Systématique et Évolution, UMR 8079, CNRS, AgroParisTech et Université Paris-Sud, 75251 Paris cedex 05, France*, 45.
- González-Pérez, F., & Cubero-Pardo, P. Efecto de actividades turísticas sobre el comportamiento de fauna representativa de las Islas Galápagos, Ecuador. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 493.
- Goudet, J. y Jombart, T. (2015). Package ‘hierfstat’ (Versión 0.04-22) [Software]. Obtenido el 14 de mayo 2017 de <https://cran.r-project.org/web/packages/hierfstat/index.html>
- Goudet, J., Perrin, N., y Waser, P. (2002). Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. *Molecular Ecology*, 11(6), 1103-1114.
- Graham, R.T., Witt, M.J., Castellanos, D.W., Remolina, F., Maxwell, S., Godley, B.J. y Hawkes, L.A., 2012. Satellite tracking of manta rays highlights challenges to their conservation. *PLoS One* 7, 3–8.
- Guerrero, M y Hearn, A. (2017). Manta rayas gigantes (*Manta birostris*) como indicador de la salud del ecosistema marino en el Parque Nacional Machalilla, Ecuador. Fundación Megafauna Marina del Ecuador
- Hayward, A. C., Tollenaere, R., Dalton-Morgan, J., & Batley, J. (2015). Molecular marker applications in plants. In *Plant Genotyping* (pp. 13-27). Humana Press, New York, NY.
- Hearn, A. R., Acuna, D., Ketchum, J. T., Penaherrera, C., Green, J., Marshall, A., & Shillinger, G. (2014). Elasmobranchs of the Galapagos marine reserve. In *The Galapagos Marine Reserve* (pp. 23-59). Springer, Cham.
- Homma K., Maruyama T., Itoh T., Ishihara, H. y Uchida, S. (1999) Biology of the manta ray, *Manta birostris* Walbaum, in the Indo-Pacific. In Seret B. and Sire J.Y. (eds) Indo-Pacific fish biology: proceedings of the fifth international conference on Indo-Pacific fishes. Noumea: *Ichthyological Society of France*, pp. 209–216.
- Kashiwagi, T., Broderick, D., Lance, S. L., Bennett, M. B., y Ovenden, J. R. (2012). Development and characterization of ten microsatellite loci for the reef manta ray *Manta alfredi*. *Conservation Genetics Resources*, 4(4), 1055-1058.
- Kershaw, F., Carvalho, I., Loo, J., Pomilla, C., Best, P. B., Findlay, K. P. y Ersts, P. (2017). Multiple processes drive genetic structure of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) populations across spatial scales. *Molecular ecology*, 26(4), 977-994.
- Kitchen-Wheeler, A. M. (2010). Visual identification of individual manta ray (*Manta alfredi*) in the Maldives Islands, Western Indian Ocean. *Marine Biology Research*, 6(4), 351-363.
- Konstantinov, K., DRINIĆ, S. M., ŠIJACIĆ, M., Isajev, V., & Mataruga, M. (2005). Molecular markers application for genetic resources characterization of different plant species. In Book of proceedings of International workshop „The role of biotechnology for

- characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources (pp. 181-183).
- Lacy, R. C. (1987). Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation biology*, 1(2), 143-158.
- Marshall, A. D., Compagno, L. J., y Bennett, M. B. (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. y Kashiwagi, T. (2011). *Manta birostris*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Marshall, A., Ishihara H., Dudley S., Clark T., Jorgensen S., Smith W. y Bizzarro, J. (2006) *Manta birostris*. In: IUCN 2006. 2006 IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>
- Miranda, C. (2011). Fenología reproductiva y tamaño poblacional de cuatro especies de aves marinas (*Sula granti*, *S. nebouxii*, *S. sula* y *Fregata magnificens*) en Isla de la Plata, Parque Nacional Machalilla. (Tesis previa a la obtención del título de Pregrado en Biología y Ecología Marina). Universidad San Francisco de Quito
- 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.
- O'Malley, M. P., Lee-Brooks, K., y Medd, H. B. (2013). The global economic impact of manta ray watching tourism. *PloS one*, 8(5), e65051.
- Parker, P. G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C., & Fuerst, P. A. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79(2), 361-382.
- Peakall, R. y Smouse, P. (2012) GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*
- Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J. (2006). DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/>
- Pritchard, J. K., Stephens, M. y Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 – 959.
- Reed, D. H., & Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation biology*, 17(1), 230-237.
- Rosenberg, N. A., Pritchard, J. K., Weber, J. L., Cann, H. M., Kidd, K. K., Zhivotovsky, L. A. y Feldman, M. W. (2002). Genetic structure of human populations. *Science* 298: 2381 – 2385
- Scheidat, M., Castro, C., Denkinger, J., González, J., & Adelung, D. (2000). A breeding area for humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) off Ecuador. *Journal of Cetacean Research and Management*, 2(3), 165-172.
- Scheidat, M., Castro, C., Gonzalez, J., y Williams, R. (2004). Behavioural responses of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) to whalewatching boats near Isla de la Plata, Machalilla National Park, Ecuador. *Journal of Cetacean Research and Management*, 6(1), 63-68.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. *Nature reviews genetics*, 5(1), 63.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. *Nature reviews genetics*, 5(1), 63.
- Schmidt, J. V., Schmidt, C. L., Ozer, F., Ernst, R. E., Feldheim, K. A., Ashley, M. V., & Levine, M. (2009). Low genetic differentiation across three major ocean populations of the whale shark, *Rhincodon typus*. *PloS one*, 4(4), e4988.
- Schuler, G. D., Boguski, M. S., Stewart, E. A., Stein, L. D., Gyapay, G., Rice, K., & Bentolila, S. (1996). A gene map of the human genome. *Science*, 274(5287), 540-546.

- Sellas, A. B., Bassos-Hull, K., Pérez-Jiménez, J. C., Angulo-Valdés, J. A., Bernal, M. A., y Hueter, R. E. (2015). Population structure and seasonal migration of the spotted eagle ray, *Aetobatus narinari*. *Journal of Heredity*, 106(3), 266-275.
- Sheidat M., Castro C., Gonzalez J. y Williams R. (2004). Behavioural responses of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) to whale watching boats near Isla de la Plata, Machalilla National Park, Ecuador. *J. Cetacean Research Management*. 6 (1); 63-68.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., y Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America*, 87(6), 651-701.
- Spanopoulou, E., Cortes, P., Shih, C., Huang, C. M., Silver, D. P., Svec, P., y Baltimore, D. (1995). Localization, interaction, and RNA binding properties of the V (D) J recombination-activating proteins RAG1 and RAG2. *Immunity*, 3(6), 715-726.
- Stevens, G. (2006) Field Guide to the Identification of Mobulid Rays (Mobulidae): IndoWest Pacific. Manta Trust. 1-19.
- Stewart, J. D., Beale, C. S., Fernando, D., Sianipar, A. B., Burton, R. S., Semmens, B. X., y Aburto-Oropeza, O. (2016). Spatial ecology and conservation of *Manta birostris* in the Indo-Pacific. *Biological Conservation*, 200, 178-183.
- Stewart, J. D., Hoyos-Padilla, E. M., Kumli, K. R., y Rubin, R. D. (2016). Deep-water feeding and behavioral plasticity in *Manta birostris* revealed by archival tags and submersible observations. *Zoology*, 119(5), 406-413.
- Suárez, X. (2013). Caracterización de los atractivos naturales de los sitios de buceo más visitados en el islote el pelado y la elaboración de una guía de sus principales atractivos naturales. (Bachelor's thesis, Guayaquil, 2013).
- Walter, R. P., Kessel, S. T., Alhasan, N., Fisk, A. T., Heath, D. D., Chekchak, T. y Braun, C. D. (2013). First record of living *Manta alfredi* × *Manta birostris* hybrid. *Marine Biodiversity*, 44, 1-2.
- Wang, J. (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, 160(3), 1203-1215.
- Wang, J. (2011). COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular ecology resources*, 11(1), 141-145.
- Weir, B. S., y Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370
- Yano, K., Sato, F., & Takahashi, T. (1999). Observations of mating behavior of the manta ray, *Manta birostris*, at the Ogasawara Islands, Japan. *Ichthyological research*, 46(3), 289-296.
- Yumiceba, V. (2014). Estudio preliminar de diversidad genética de *Manta birostris* que visitaron la Isla de la Plata durante los años 2010, 2011 y 2012 (Tesis de pregrado, Quito, 2014).
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 11(1), 1-16.

12. TABLAS

Tabla 1. Información de los 8 loci microsatélites de los 24 individuos analizados de *M. birostris* de la Isla de la Plata, Ecuador del año 2013. En la tabla se muestra la información resumida de cada locus. La temperatura de annealing de cada par de primers fue estandarizada por Yumiceba (2013). A los loci MA09, MA15, MA30, MA34 y MA43 (Kashiwagi et al., 2012) se les agregó la cola universal A descrita por Blacket et al. (2010) con secuencia GCCTCCCTCGCGCCA.

Locus GenBank	Secuencia de Primers 5'->3'	Motivo Repetido	Temp. Annealing	Alelos Encontrados	Genotipos Encontrados	Índice Shannon	Tamaño Alelos (pb)
MA09 JX269144	F: GATGCGTGTTCCTCCTGTTG R: GCCAGCAATCTTCTTCCACATT	ACAT	65	3	4	0.833	372-388
MA15 JX269146	F: CATATAAAGGACCCCGGCAC R: TGGTGGAGTGAAGAGGCTG	AC	56	1	1	0	146
MA30 JX269148	F: CTCGTGCCCCTCTTCTTCTG R: GACTGTGGGAGGCATGGAA	AC	56	5	5	1.069	195-223
MA34 JX269149	F: CGTCCAAGGCAGGATTGATT R: TCGAGCACTCACCTATCCAC	GT	55	4	5	0.957	184-190
MA43 JX269151	F: GCAGCTCCCATATCTCTCTCCC R: CCACTTGACCCGAACATGAG	TCA	60	6	11	1.503	265-301
MA14 JX269145	F: CAACCCACGGACTGACTTTC R: TGCACGCTATGCACAAACAA	ATCT	57	8	10	1.705	186-222
MA21 JX269147	F: GTGGCGAAACCCAATTTCC R: GAGCAAATCTCAGCACATCCA	TCTA	61.8	4	5	0.642	187-211
MA49 JX269152	F: CCATGAACACAGCCTCAGATT R: TGAGTCCCTCCAGCATTTTGT	CTAT	61.8	8	13	1.754	219-259

Tabla 2. Concentraciones de ADN de *Manta birostris* extraído de muestras de tejido muscular y de moco y volúmenes obtenidos. La tabla muestra la identificación de las muestras de la temporada del 2013 con su concentración de ADN y el volumen aproximado disponible con el que se trabajó.

No	ID Muestra	Concentración (ng/uL)	Volumen aprox. (uL)
1	MB01	206,8	8
2	MB02	1097,5	11
3	MB03	1314,4	11
4	MB04	345,8	17
5	MB05	100	18
6	MB06	63	14
7	MB07	35,4	3
8	MB08	225,3	9
9	MB09	22,7	10
10	MB10	47,9	11
11	MB11	126,4	6
12	MB12	89	49
13	MB13	15,4	4
14	MB14	128,8	4
15	MB15	27,8	10
16	MB16	10	23
17	MB17	98,9	2
18	MB18	35,2	2
19	MB19	32,7	8
20	MB20	45,1	11
21	MB21	92,3	6
22	MB22	110,2	4
23	MB23	21	6
24	MB24	10	16

Tabla 3. Heterocigosidad esperada de individuos de *M. birostris* muestreados en el 2013 provenientes de la Isla de la Plata y de Bajo Copé. Las heterocigosidades esperadas de los individuos de la Isla de la Plata y Bajo Copé son estadísticamente iguales según la comparación realizada mediante simulación de datos aplicada con la función `hs.stest` del paquete `adegenet`.

Localidad	# Individuos	He
Isla de la Plata	15	0.591
Bajo Copé	9	0.601

Tabla 4. Distancia FST entre individuos de *M. birostris* muestreados en el 2013 provenientes de la Isla de la Plata y de Bajo Copé. La distancia FST es relativamente baja entre individuos muestreados en dos localidades dentro del mismo año.

	Isla de la Plata
Bajo Copé	0.019

Tabla 5. Alelos exclusivos entre individuos de la Isla de la Plata y de Bajo Copé. Se muestra el número de alelos exclusivos en cada locus para las dos localidades. Los alelos exclusivos se encuentran sólo en uno o dos individuos para cada localidad. Se muestran únicamente estos 4 loci donde existieron alelos exclusivos. El resto de loci no presentó alelos exclusivos entre localidades.

	MA30	MA34	MA43	MA49
Isla de la Plata	1	0	1	0
Bajo Copé	2	1	0	2

Tabla 6. Heterocigosidad esperada de poblaciones de *Manta birostris* de cada año. Las heterocigosidades esperadas de todos los años son estadísticamente iguales según la comparación realizada mediante simulación de datos aplicada con la función `hs.stest` del paquete `adegenet`.

Heterocigosidad Esperada		
Año	# Individuos	He
2010	4	0.636
2011	10	0.596
2012	43	0.638
2013	24	0.606

Tabla 7. Distancias F_{ST} entre individuos de Manta birostris de diferentes años muestreados en la Isla de la Plata. Se observa que las distancias entre individuos del 2013 y los demás años de muestreo son mayores.

	Distancias F_{ST}		
	2010	2011	2012
2011	0.037	-	-
2012	0.007	0.021	-
2013	0.051	0.092	0.071

Tabla 8. Resultados de valor p para las pruebas de dispersión sesgada por sexo utilizando diferentes estadísticos. Se obtiene que no existe dispersión sesgada por sexo significativa con ninguno de los 4 estadísticos probados. El rango del valor p de la prueba de cada estadístico va de 0 a 1. Un valor de p menor a 0.05 indica que existe una diferencia significativa entre los estadísticos calculados para los grupos de cada sexo.

Prueba de Dispersión Sesgada por Sexo	
Estadístico	Valor p
mAIC	0.58
vAIC	0.51
F_{IS}	0.65
F_{ST}	0.77

Tabla 9. Valores del Índice de parentesco de Wang comparando individuos de cada año por separado y comparando a todos los individuos de todos los años juntos. En el año 2010 no se muestreó ningún individuo hembra. El rango del índice de Wang va de 0 a 0.5 Los valores negativos indican que no existe parentesco entre los individuos.

	Índice de parentesco de Wang		
Años	Individuos totales	Hembras	Machos
2010	0.054	0	0.165
2011	0.194	0.0785	0.254
2012	0.055	0.036	0.077
2013	0.162	0.259	0.197
Global años	-0.033	-0.006	-0.021

Tabla 10. Valores del índice de parentesco de Wang comparando individuos pertenecientes a diferentes años. La pareja de años con mayor parentesco son el 2011 y el 2012, dado que presentan un valor del índice de Wang positivo. Los valores negativos indican que no existe parentesco entre los individuos pertenecientes a la pareja de años probada.

Comparaciones	Índice de parentesco de Wang		
	Individuos totales	Hembras	Machos
2011 vs 2012	0.048	0.017	0.097
2011 vs 2013	-0.186	-0.243	-0.188
2012 vs 2013	-0.181	-0.211	-0.184

13. FIGURAS

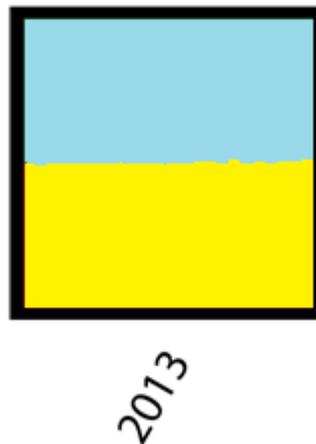


Figura 1. Resultado de Structure graficados con Distruct de individuos del año 2013. Se obtuvo un valor óptimo de K igual a 2. Sin embargo, no se observa estructura poblacional en los individuos del 2013 muestreados en la Isla de la Plata y Bajo Copé.

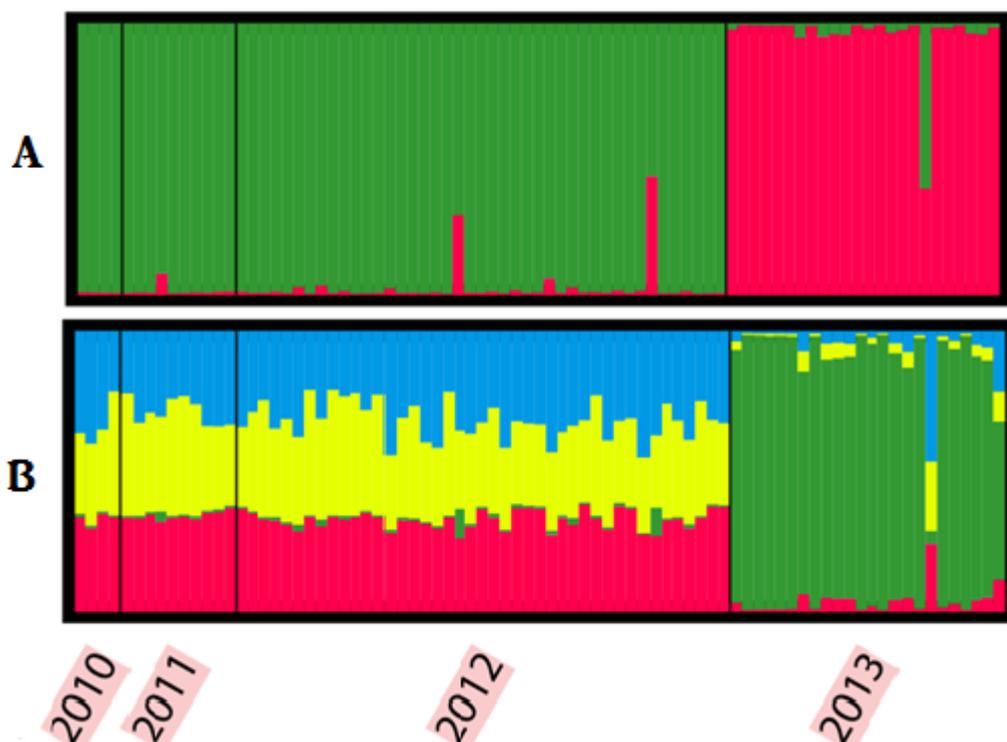


Figura 2. Resultados de Structure graficados con Distruct de individuos del periodo 2010-2013. El panel A muestra el resultado obtenido de los individuos muestreados en los años 2010-2013 tomando un K óptimo 2. El panel B muestra el resultado utilizando un K óptimo de 4. Se observa claramente cómo se separan en dos grupos los individuos del periodo 2010-2012 de los del año 2013.

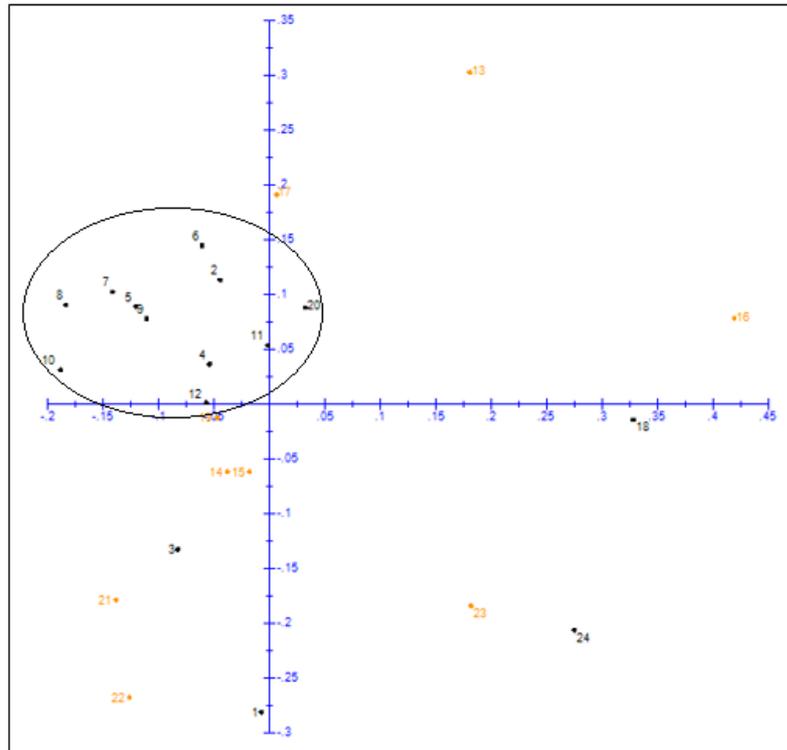


Figura 3. PCoA de individuos de *M. birostris* del año 2013. Los individuos de la Isla de la Plata (color negro) se agrupan entre sí, como se observa en el círculo de color negro. Los individuos de Bajo Copé (color amarillo) se distribuyen ampliamente en varios cuadrantes.

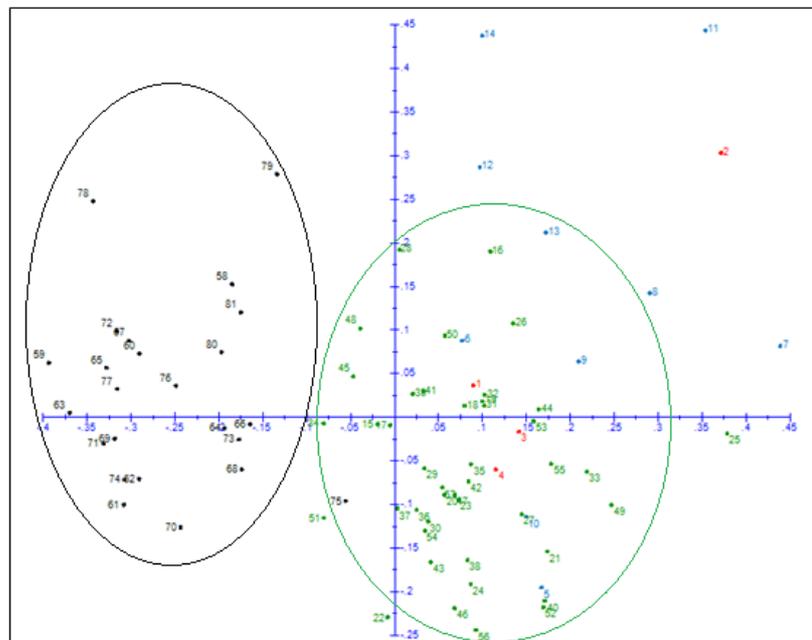
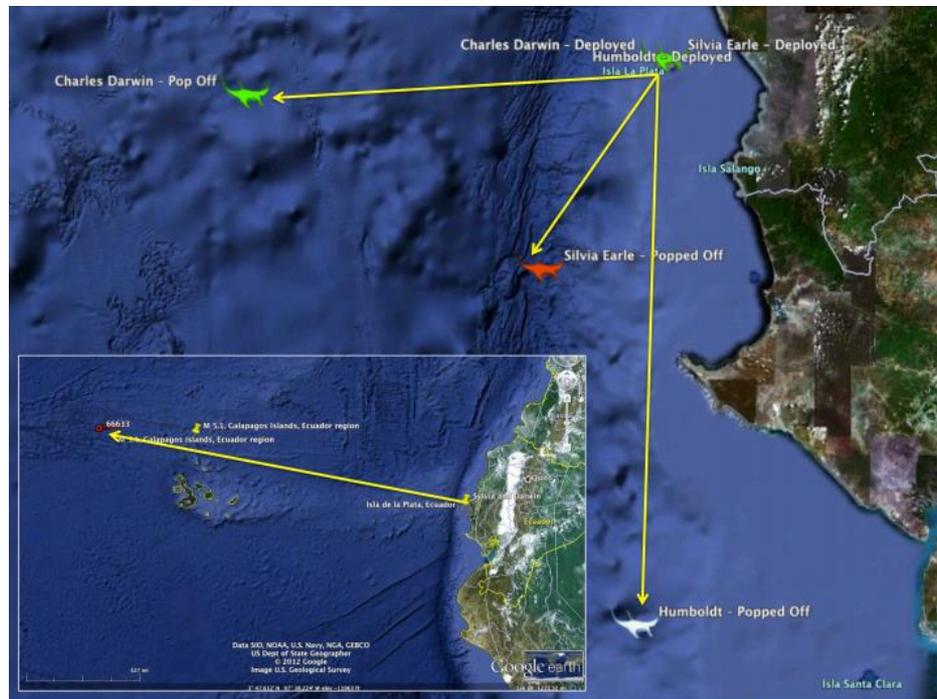


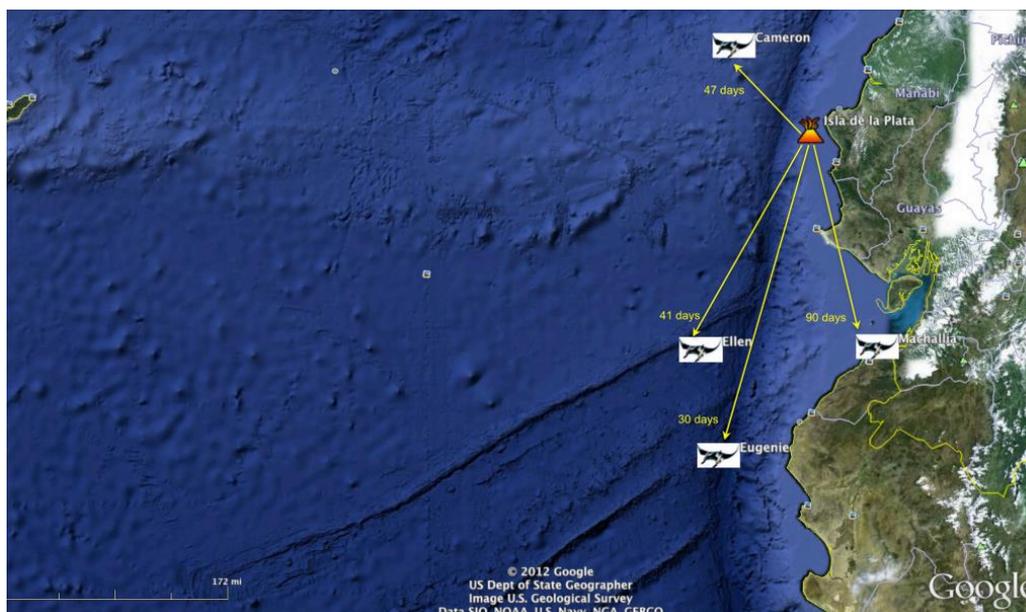
Figura 4. PCoA de individuos de *M. birostris* de años 2010-2013. Los individuos del 2010 están representados por puntos de color rojo; los del 2011, de azul; 2012, verde y 2013, negro. Se observa que existen dos agrupaciones claras representadas por el círculo negro (individuos del 2013) y el círculo verde (individuos del periodo 2010-2012). Esto indica que los individuos del 2013 forman un grupo genéticamente diferente a los individuos del periodo 2010-2012.

14. ANEXOS

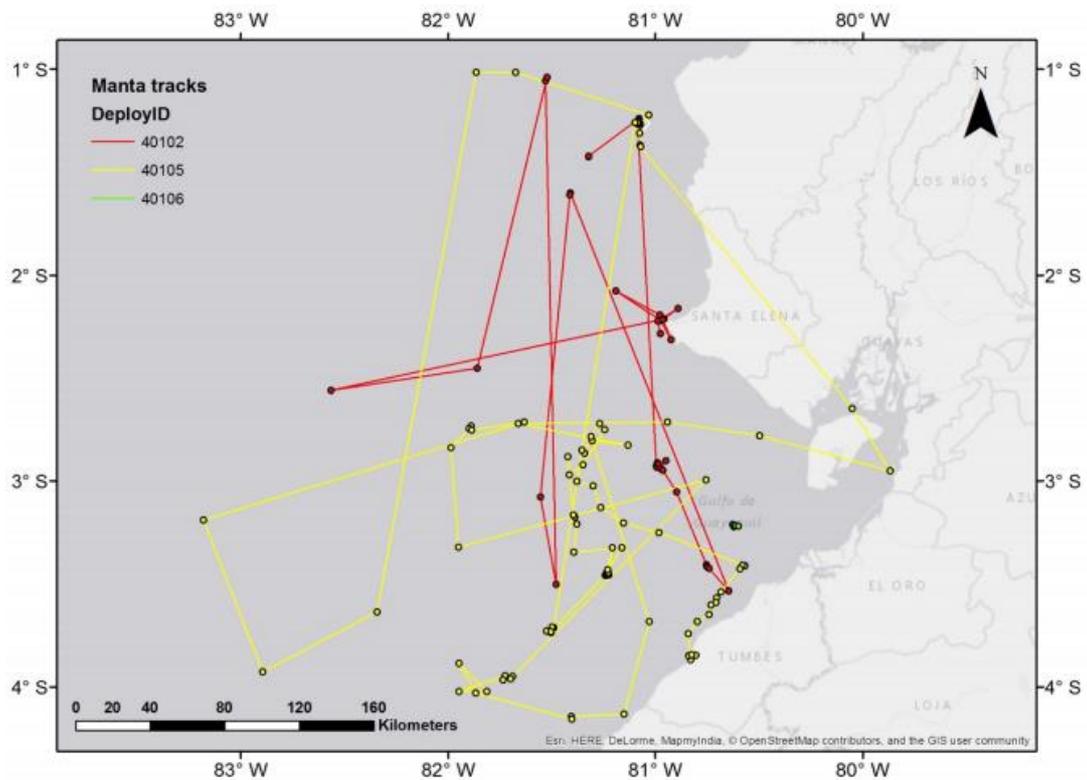
Anexo A. Trayectoria de migración de individuos de *M. birostris* rastreados desde septiembre hasta diciembre del año 2010. (Cedido por Michel Guerrero, Proyecto Mantas Ecuador)



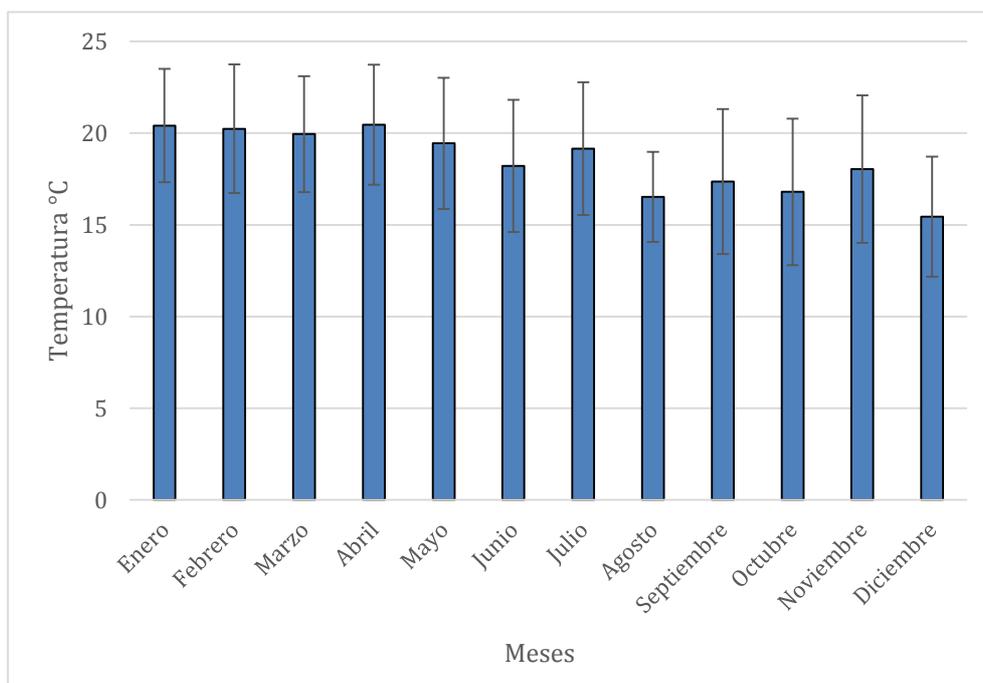
Anexo B. Trayectoria de migración de individuos de *M. birostris* rastreados desde septiembre hasta diciembre del año 2012. (Cedido por Michel Guerrero, Proyecto Mantas Ecuador)



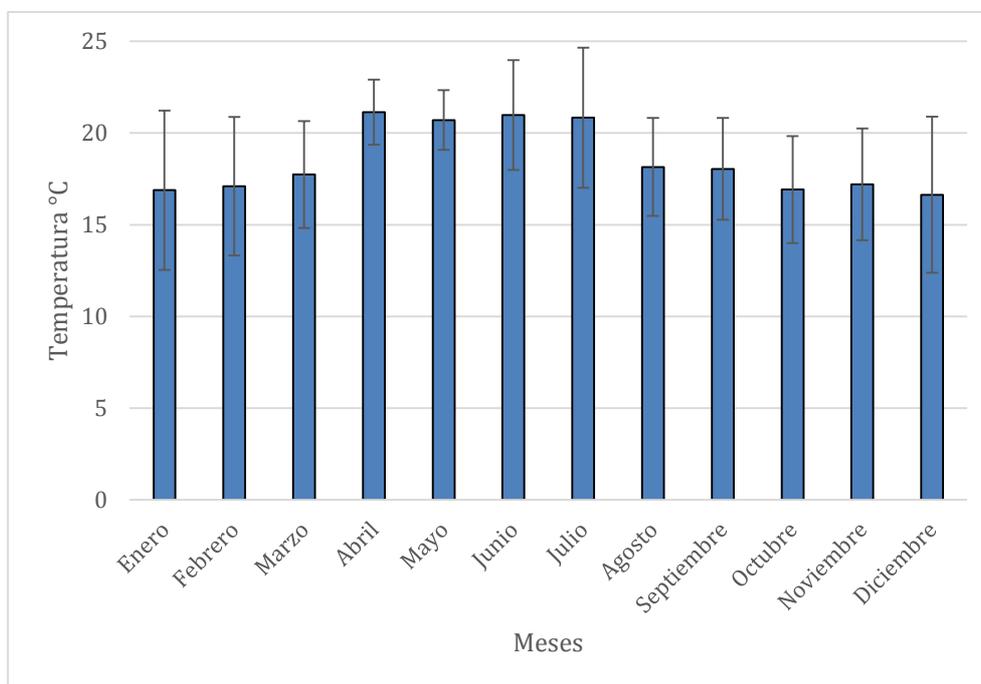
Anexo C. Trayectoria de migración de individuos de *M. birostris* rastreados desde septiembre hasta diciembre del año 2017. (Cedido por Michel Guerrero, Proyecto Mantas Ecuador)



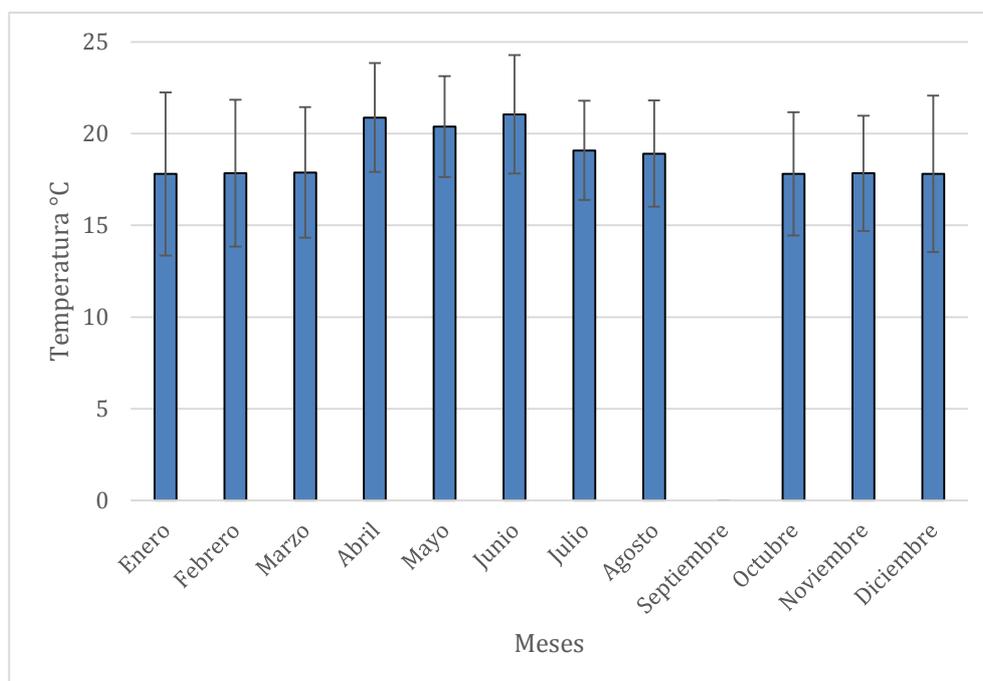
Anexo D. Datos mensuales de temperatura superficial del agua en el año 2010. Cada barra representa el promedio de la temperatura medida en los dos puntos de muestreo, Manta y La Libertad. (Fuente: INOCAR)



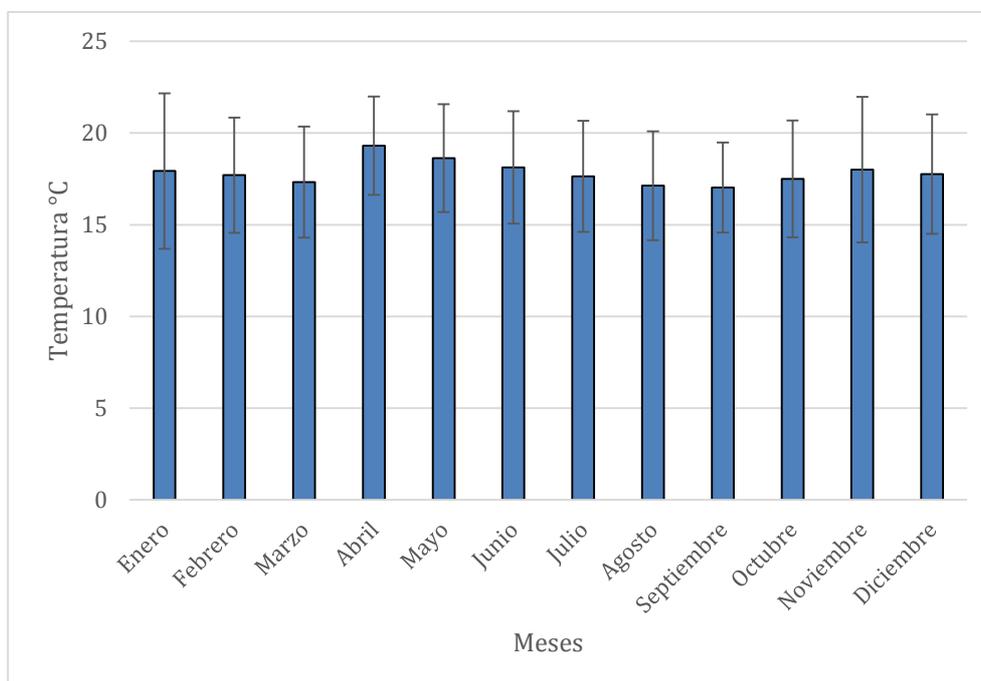
Anexo E. Datos mensuales de temperatura superficial del agua en el año 2011. Cada barra representa el promedio de la temperatura medida en los dos puntos de muestreo, Manta y La Libertad. (Fuente: INOCAR)



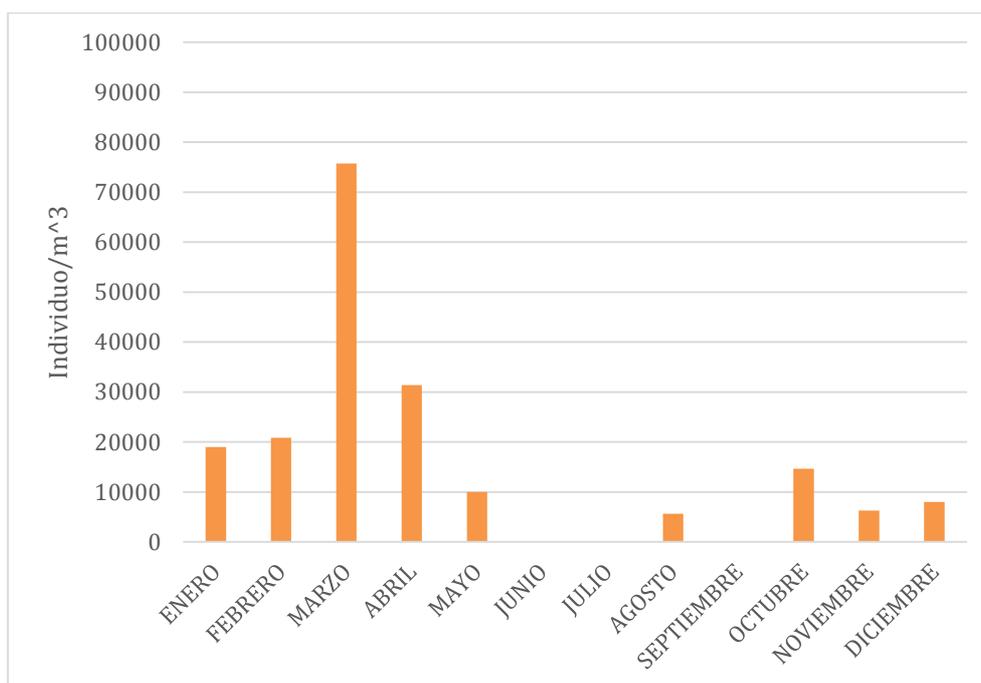
Anexo F. Datos mensuales de temperatura superficial del agua en el año 2012. Cada barra representa el promedio de la temperatura medida en los dos puntos de muestreo, Manta y La Libertad. (Fuente: INOCAR)



Anexo G. Datos mensuales de temperatura superficial del agua en el año 2013. Cada barra representa el promedio de la temperatura medida en los dos puntos de muestreo, Manta y La Libertad. (Fuente: INOCAR)



Anexo H. Concentración de copépodos muestreados por arrastre vertical en el punto de muestreo de Manta en el año 2012. (Fuente: INOCAR)



Anexo I. Concentración de copéodos muestreados por arrastre vertical en el punto de muestreo de Manta en el año 2013. (Fuente: INOCAR)

