

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio preliminar de la diversidad genética de *Mobula birostris*
en Galápagos – Muestras 2019**

Pedro Andrés Córdova Jaramillo

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Estudio preliminar de la diversidad genética de *Mobula birostris* en
Galápagos – Muestras 2019**

Pedro Andrés Córdova Jaramillo

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Quito, 4 de mayo de 2020

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.

Nombres y apellidos: Pedro Andrés Córdova Jaramillo

Código: 00134389

Cédula de identidad: 0104419676

Lugar y fecha: Quito, 4 de mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

La especie *Mobula birostris* o mantarraya gigante pertenece a la familia Mobulidae y se encuentra distribuida a nivel mundial en aguas tropicales y subtropicales. Se caracteriza por ser pelágica y altamente migratoria. Se ha determinado en diversos estudios que también presenta patrones de residencia en estaciones de alimentación y limpieza. La mantarraya gigante está clasificada como una especie vulnerable por la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y el crecimiento de su población tiene una tendencia decreciente. La pesca accidental o dirigida representa la principal amenaza para esta especie. Su tamaño, velocidad de nado y agregación en grandes grupos son características que facilitan su captura. Ecuador cuenta con una de las poblaciones más grandes de *M. birostris*, distribuidas en el Parque Nacional Machalilla y en la Reserva Marina de Galápagos. Los estudios de la diversidad genética permiten analizar la diversidad intraespecífica, para conocer la adaptabilidad de las poblaciones, y su estructura poblacional. Hasta la actualidad, los estudios de la diversidad genética de la mantarraya gigante en Galápagos son escasos. En este estudio, se analizaron regiones microsátélites en 21 individuos de Galápagos que fueron muestreados en el año 2019 en 4 localidades diferentes. Se utilizaron 7 marcadores SSR heterólogos empleados para estudios previos de la especie en el continente. Se identificó un promedio de 5.14 alelos por locus y una heterocigosidad esperada global de 0.65, que sugiere una diversidad genética moderada. Los análisis de estructura poblacional mediante métodos de ordenamiento y enfoques bayesianos no demostraron una estructura poblacional definida, pero sugirieron el aporte de 3 linajes diferentes. Este estudio contribuye con información sobre el estado de conservación de las mantas gigantes en la Reserva Marina de Galápagos y podría contribuir para el desarrollo de estrategias de conservación en esta especie.

Palabras clave: *Mobula birostris*, mantarraya gigante, microsátélites, diversidad genética, Galápagos.

ABSTRACT

The species *Mobula birostris* or giant manta ray belongs to the Mobulidae family and is distributed worldwide in tropical and subtropical waters. It is characterized by being pelagic and highly migratory. It has been determined in various studies that it also shows residence patterns in feeding and cleaning stations. The giant manta ray is classified as a vulnerable species by the Red List of the International Union for Conservation of Nature and its population growth is decreasing. Accidental or directed fishing represents the main threat to this species. Its size, swimming speed and aggregation in large groups are characteristics that facilitate its capture. Ecuador has one of the largest populations of *M. birostris*, distributed in the Machalilla National Park and in the Galápagos Marine Reserve. Genetic diversity studies permit analysis of intraspecific diversity, which allows to know the adaptability of populations and population structure. To date, studies of the genetic diversity of the giant manta ray in the Galapagos are scarce. In this research, microsatellite regions were analyzed in 21 Galapagos individuals which were sampled in 2019 at 4 different locations. Seven heterologous SSR markers used in previous studies of the species in the continent were used. An average of 5.14 alleles per locus was identified and overall expected heterozygosity of 0.65, suggesting a moderate genetic diversity. Population structure analyzes using ordering methods and Bayesian approaches did not demonstrate a defined population structure but suggested the contribution of 3 different lineages. This study contributes with information on the conservation status of the giant mantas in the Galápagos Marine Reserve and could support the development of conservation strategies for this species.

Key words: *Mobula birostris*, giant manta ray, microsatellites, genetic diversity, Galápagos.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	11
1.1	Taxonomía de <i>Mobula birostris</i>	11
1.2	Distribución y patrones de migración	12
1.3	Alimentación.....	12
1.4	Reproducción	13
1.5	Estado de conservación de la especie	14
1.6	Distribución de <i>M. birostris</i> en Ecuador continental y las Islas Galápagos	15
1.7	Estudios moleculares para la conservación de especies marinas migratorias.....	15
1.8	Microsatélites o secuencias simples repetidas	16
1.9	Estudios previos de diversidad genética de <i>M. birostris</i>	18
2	MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1	Obtención de muestras de tejido de <i>M. birostris</i>	19
2.2	Extracción y cuantificación de ADN a partir de tejidos de <i>M. birostris</i>	19
2.3	Amplificación de regiones de microsatélites	20
2.4	Genotipado y elaboración de matrices alélicas	21
2.5	Análisis de la diversidad genética y estimación de la estructura poblacional de <i>M. birostris</i> en Galápagos	22
3	RESULTADOS.....	24
3.1	Extracción y cuantificación de las muestras de tejido de <i>M. birostris</i>	24
3.2	Amplificación y Genotipado.....	24
3.3	Diversidad genética.....	25
3.4	Diferenciación poblacional	26
3.5	Estructura poblacional	26
4	DISCUSIÓN	27
4.1	Diversidad genética.....	27
4.2	Estructura poblacional	28
5	CONCLUSIONES	32
6	REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS	33
7	TABLAS.....	40
8	FIGURAS	42
9	ANEXOS	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diversidad genética y estimaciones de relación para los loci analizados en los 21 individuos de <i>M. birostris</i> de la Isla Isabela. Se incluyen el número de alelos (N_a), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), contenido de información polimórfica (PIC), frecuencia de alelos nulo (N_o), F_{ST_A} sin corregir y F_{ST_B} alelo nulo <i>corregido</i> , desviación del valor p de Hardy-Weinberg (HWD).	40
Tabla 2. Índices de diversidad genética estimados dentro de las localidades en donde se tomaron las muestras de los individuos de <i>M. birostris</i>	40
Tabla 3. Primera generación de migrantes detectada con GENECLASS 2 (GC).....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultados de Structure graficados con CLUMPAK. Se obtuvo un valor óptimo de 3 para K.....	42
Figura 2. Resultados de Structure graficados con CLUMPAK. Se obtuvo un valor óptimo de 7 para K.....	42
Figura 3. PCoA de las muestras de individuos de <i>M. birostris</i> de Galápagos del año 2019. Los colores representan diferentes localidades.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Información de los 7 loci SSR de las 21 muestras analizadas de Galápagos - Ecuador, del año 2019. En esta tabla se resume la información para cada locus.	43
Anexo B. Datos de extracción y cuantificación de muestras de individuos de <i>M. birostris</i> de Galápagos - 2019.	44
Anexo C. Resultados del agrupamiento genético poblacional basados en el método de modelado bayesiano de Structure.	45

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Taxonomía de *Mobula birostris*

La manta o mantarraya *Mobula birostris*, también conocida como manta gigante, pertenece a la clase de los Condrictios, subclase Elasmobranquios, orden Rajiformes, dentro de la familia Mobulidae y género *Mobula* (ITS, 2020). Hasta hace poco se dividía a la familia Mobulidae en dos géneros, *Mobula* y *Manta*. El género *Manta* contaba con dos especies, *Manta birostris* o manta gigante y *Manta alfredi*, también conocida como manta de arrecife (CMS Sharks, 2016). *M. birostris* es la especie más ampliamente distribuida del género, encontrándose en aguas templadas y tropicales y llegando a tener un gran tamaño en su madurez, hasta los 7 metros de ancho de disco (Clark, 2010). Por otro lado, *M. alfredi* se caracteriza por ser una especie más pequeña, que no supera los 5 metros de ancho de disco, y limitada a aguas tropicales (Marshall et al., 2009). Ambas especies se pueden distinguir por diferencias visuales en su coloración, *M. birostris* se caracteriza por tener una superficie ventral blanca con manchas en el abdomen, posterior a las hendiduras branquiales y anterior a la cloaca. Además, cuenta con una coloración oscura alrededor de la boca y el borde posterior de las aletas pectorales. Por otro lado, *M. alfredi* tiene una superficie ventral blanca con parches oscuros en el abdomen, entre las hendiduras branquiales y la cloaca, en las aletas pectorales (Clark, 2010). En base a estudios recientes de filogenia molecular sobre la familia Mobulidae, junto con información morfológica, se descubrió que los miembros del género *Manta* se agrupan en el género *Mobula*. Se encontró una coincidencia de las topologías de los árboles mitocondriales y nucleares, por lo que ahora se reconoce al género *Manta* en la sinonimia de *Mobula* y a ocho especies nominales en donde antes había once (White et al., 2018).

1.2 Distribución y patrones de migración

M. birostris se encuentra distribuida a nivel mundial en áreas tropicales y subtropicales; encontrándose principalmente en zonas que presentan surgencias de aguas marinas, montañas submarinas e islas. En general, *M. birostris* es una especie pelágica que se encuentra en aguas costeras y abiertas. Esta especie es considerada altamente migratoria y puede llegar a realizar recorridos de hasta 1000 km de distancia. Se ha observado que suelen tener sitios de congregación que sirven como fuente de alimento y limpieza, pero no se ha determinado fidelidad a los mismos. Tampoco se ha logrado definir las áreas de crianza de esta especie de mantas. Estas características presentan barreras a la hora de estudiar a esta especie (González, 2018). Se ha observado que *M. birostris* tiene patrones de residencia basadas en sitios específicos, como sitios de alimentación o limpieza. En lugares como Hawái, Bora Bora o Yap se ha observado a grupos de individuos durante largos periodos repetitivamente. Mientras que, en otros lugares como México, África, Ecuador o Japón se les ha observado por temporadas (Dewar et al., 2008). Se ha sugerido que los patrones de migración pueden estar correlacionados con la temperatura superficial del mar, corrientes superficiales y la producción primaria neta. La temperatura que se ha reportado óptima para la presencia de esta especie se encuentra entre los 25 °C y 30 °C (Graham et al., 2012).

1.3 Alimentación

Las mantarrayas gigantes se alimentan principalmente de organismos planctónicos como los eufáusidos, copépodos, misidáceos, decápodos y camarones. También se ha logrado identificar que consumen peces de tamaño pequeño y moderado (NOAA Fisheries, 2020). Se ha determinado que tienen una gran plasticidad en lo que se refiere al uso de las diferentes profundidades a lo largo del año. Se ha observado que, durante la alimentación, las mantarrayas gigantes suelen estar en

aguas poco profundas a menos de 10 metros de la superficie (Stewart et al., 2016). Sin embargo, se ha demostrado que *M. birostris*, por cambios de la ubicación de la fuente de alimento, temporada o termoclina, puede realizar inmersiones de hasta 200 a 450 metros y es capaz de bucear a profundidades superiores a 1,000 metros (NOAA Fisheries, 2020). Burgess et al. (2018), realizó una caracterización de los ácidos grasos (FA) del tejido muscular de individuos de dos sitios de agregación de la parte continental de Ecuador y encontró que el perfil de FA sugiere que tienen una dieta de origen mesopelágico. Compuesta principalmente por organismo de aguas profundas y compuesta por una pequeña cantidad de zooplancton que se encuentra en la superficie en el día.

1.4 Reproducción

En el comportamiento sexual de *Mobula birostris* se puede distinguir cinco etapas claves: persecución, mordida, copulación, post-copulación y separación. En la primera etapa varios machos persiguen a la hembra hasta que uno de los machos gana a los demás. Este macho persigue a la hembra durante unos 20 minutos hasta que logra morder la aleta pectoral izquierda de la hembra. Esto permite sostenerla para realizar la cópula, en donde se junta el abdomen del macho con el de la hembra hasta que el macho inserta un clasper en la cloaca de la hembra por 90 segundos (Stevens et al., 2018). Todos los elasmobranquios tienen fertilización interna y pueden ser divididos en vivíparos y ovovivíparos. Los mobúlidos son vivíparos y se ha reportado que se reproducen por histotrofia, un tipo de matrotrofia en donde la hembra produce histotrofos ricos en lípidos para que los embriones los consuman. Esta especie tiene una tasa de embarazo de 0.56 crías por año. La hembra alcanza la madurez sexual entre los 8 a 10 años y por lo general da a luz a una cría cada dos o tres años. Se ha estimado que la gestación dura alrededor de un año. Por otro lado, el macho alcanza la madurez sexual cuando el ancho del disco alcanza los 3.8 metros

aproximadamente y tiene los claspers totalmente calcificados, esto ocurre entre los 5 y 6 años (NOAA Fisheries, 2020).

1.5 Estado de conservación de la especie

Mobula birostris se encuentra clasificada como vulnerable por la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2020). La población de esta especie tiene una tendencia decreciente; la principal amenaza es la pesca, ya sea accidental o dirigida. Existen otras amenazas importantes, como el desarrollo residencial de los asentamientos humanos y consecuentemente el comercial, los corredores de transporte y servicio, el uso de recursos biológicos, las intrusiones humanas y la contaminación. Estas especies son fácilmente capturadas por su tamaño, velocidad de nado y agregación. La pesca dirigida se da por su gran demanda en mercados locales e internacionales. Se ha estimado que en algunas áreas se pescan hasta 1000 mantarrayas gigantes por año. Por otro lado, la pesca accidental también representa un gran problema. Muchas son capturadas accidentalmente por grandes pesquerías o se atrapan en redes utilizadas para el control de tiburones en área de bañistas. Se ha determinado en poblaciones como las de la Isla de la Plata en Ecuador, Laje de Santos en Brasil y las islas Similan en Tailandia evidencia de enredos o arrastre de líneas en un gran número de individuos (Marshall et al., 2016). Además, al tener características como reproducción matrotrófica, fecundidad extremadamente baja y edad tardía de la primera reproducción son mucho más susceptibles a la sobreexplotación (Croll et al., 2016).

Para especies migratorias, se realizan esfuerzos de conservación que involucran la realización de acuerdos internacionales con el fin de limitar incentivos que promuevan la pesca de mantas y reducir la captura dirigida. Entre estos acuerdos se encuentra la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas (CITES) y la Convención sobre la Conservación

de las Especies Migratorias (CMS). Conocer la estructura poblacional de esta especie y sus patrones migratorios permite implementar estrategias de conservación local mediante la creación de áreas marinas protegidas o santuarios enfocados en mantas (Stewart et al., 2016).

1.6 Distribución de *M. birostris* en Ecuador continental y las Islas Galápagos

Ecuador cuenta con algunas de las poblaciones más grandes de mantas gigantes. Se ha observado grandes agregaciones en el Parque Nacional Machalilla y en la Reserva Marina de Galápagos. Se ha determinado que *Mobula birostris* realiza migraciones a través de la Reserva Marina de Galápagos o GMR; sin embargo, su nivel de residencia en esta reserva no es muy conocido. Se ha logrado identificar sitios de reproducción a lo largo de la masa continental y en las Galápagos; principalmente en las Isla Isabela, Floreana, Pinzón, Santa Cruz y Santiago. Las agregaciones más grandes vistas de especies se han realizado en área como el Cabo Marshall, Cuatro Hermanos y Roca Sin Nombre (Hearn et al., 2014). Anteriores investigaciones indicaban que las poblaciones de mantarrayas gigantes eran principalmente insulares con una conectividad muy limitada; sin embargo, rastreos satelitales han permitido observar movimientos regulares entre aguas protegidas ecuatorianas y aguas no protegidas peruanas. La ecología espacial y la conectividad de estas poblaciones son poco conocidas, lo que dificulta un manejo correcto de la especie y el desarrollo de estrategias de conservación (CMS SHARKS MOU, 2015).

1.7 Estudios moleculares para la conservación de especies marinas migratorias

Los estudios moleculares permiten entender la estructura poblacional de un cierto grupo de individuos y de su diversidad intraespecífica. La diversidad intraespecífica representa el rango de información genética presente en los individuos de una especie y puede influir en la estructura

de la comunidad y la función del ecosistema. Esta medida representa el potencial adaptativo de la especie, teniendo como base que cuantas más variantes genéticas estén presentes en una población, más posibilidades tiene la misma de sobrevivir en caso de presentarse cambios en el entorno (Des Roches et al., 2018). Esta información permite proteger a los individuos teniendo en cuenta las interacciones reproductivas entre individuos y su historia evolutiva y no solamente la coocurrencia y demografía de estos. Los análisis moleculares nos pueden ayudar a entender el flujo génico entre los individuos, lo que permite distinguir entre poblaciones (Raffard et al., 2019); algo muy importante al estudiar poblaciones de especies migratorias que se ven afectadas por varios factores a parte de las zonas geográficas que habitan (Stewart et al., 2016).

También es importante tener en cuenta la importancia de analizar la diversidad genética de las poblaciones de una determinada especie. Cuando una población de individuos cuenta con una mayor diversidad genética, esta permite que ocurra una adaptación a cambios más fácilmente (Booy et al., 2000). La heterocigosidad ha sido una medida muy utilizada para ver la diversidad genética. Esta determina la cantidad de individuos de una población que tienen dos alelos diferentes para un mismo locus. Un valor alto de esta medida se relaciona con una mejor adaptabilidad; mientras que, un valor bajo está relacionado con una mayor endogamia que a su vez se relaciona con una menor adaptabilidad de los individuos. Al entender las poblaciones desde un punto de vista ecológico y molecular se podrían desarrollar estrategias de conservación mucho más eficientes (Hansson y Westerberg, 2002).

1.8 Microsatélites o secuencias simples repetidas

Los individuos de una población cuentan con un cierto grado de variación genómica hereditaria causada por mutaciones, inserciones, deleciones, inversiones, duplicaciones o

translocaciones. Estas variaciones genéticas pueden ser detectadas con marcadores moleculares, que son loci genéticos fácilmente rastreados y cuantificados en una población (Hayward et al., 2015). Las secuencias simples repetidas, microsatélites o SSR por sus siglas, son motivos cortos de ADN que se repiten en tándem en forma de di-, tri-, tetra- o penta- nucleótidos y pueden ser utilizados como marcadores moleculares (Gebhardt, 2007). Estos tienen entre 1 a 10 nucleótidos y son relevantes evolutivamente debido a su inestabilidad. Se ha reportado que su tasa de mutación es de 10^3 a 10^6 por generación celular, teniendo hasta 10 órdenes de magnitud más que las mutaciones puntuales (Vieira et al., 2016). Los microsatélites se encuentran en procariotas y eucariotas, encontrándose en regiones codificantes y no codificantes; sin embargo, se ha demostrado que en los exones son menos abundantes que en las regiones no codificantes. La cantidad de microsatélites está correlacionada con el tamaño del genoma de los organismos (Tóth et al., 2000). Los SSR se encuentran rodeados generalmente por secuencias conservadas, lo que permite que se puedan diseñar primers para aislar y amplificar esas secuencias (Rocha, 2003).

Los polimorfismos presentados en los microsatélites, que son las diferencias en el número de repeticiones del motivo, resultan del deslizamiento de la polimerasa en la replicación del ADN o por errores de recombinación (Vieira et al., 2016). Estos marcadores SSR permiten realizar estudios de la estructura genética poblacional, procesos evolutivos, estimaciones del tamaño efectivo de la población y relaciones de paternidad y hermandad (Kashiwagi et al., 2012). Este tipo de marcador es una buena opción para estudios moleculares ya que es altamente polimórfico entre líneas muy relacionadas, requiere poca cantidad de ADN, es fácilmente automatizable y reproducible. Los SSR al ser marcadores codominantes, son excelentes para el estudio de genética poblacional. Las limitaciones de este método son el costo y esfuerzo en el diseño de los primers ya que se requiere información previa del genoma (Semagn et al., 2006). Varios estudios han

reportado y desarrollado marcadores microsatélites específicos para estudios en mantarrayas gigantes (Armstrong et al., 2019).

1.9 Estudios previos de diversidad genética de *M. birostris*

Los estudios de *Mobula birostris* son sumamente limitados, siendo la mayoría reportes de avistamientos en regiones específicas (Marshall et al., 2009). Se han realizado dos estudios sobre la diversidad genética de la manta gigante en la Isla de la Plata - Ecuador. Uno de estos analizó muestras de individuos del 2010, 2011 y 2012 para la determinación de la diversidad genética y la estructura poblacional mediante la utilización de marcadores microsatélites. En este estudio se analizaron 57 muestras y se utilizaron ocho pares de primers heterólogos (Vinueza, 2018; Yumiceba, 2014), realizó un estudio sobre la diversidad genética y la estructura poblacional de muestras de individuos de *M. birostris* recolectadas en el 2013 en la Isla de la Plata y Bajo Copé utilizando marcadores microsatélites para realizar los análisis.

No se ha reportado estudios de diversidad genética y estructura poblacional en las Islas Galápagos. Debido a esto, esta investigación tiene como objetivo realizar un estudio preliminar de la diversidad genética de *Mobula birostris* por medio del análisis de regiones microsatélites en muestras recolectadas en Galápagos en el año 2019. Los resultados de esta investigación podrían ser utilizados para el desarrollo de estrategias de conservación de esta especie.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

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

Se recolectaron 21 muestras de tejido muscular de individuos de *M. Birostris* del Archipiélago de Galápagos en el año 2019 durante los meses de marzo y mayo. La recolección de estas muestras se realizó en cuatro localidades: Isla Tortuga, Los Túneles, La Unión y Punta Negra, que se encuentra ubicada cerca de La Unión; ubicadas en la Isla Isabela. Las muestras fueron transportadas hacia el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito y conservadas en etanol al 96% a -20°C hasta su extracción. La recolección fue realizada bajo el permiso de investigación MAE-DNB-CM-2016-0041-M-0003 otorgado por el Ministerio del Ambiente Ecuatoriano.

2.2 Extracción y cuantificación de ADN a partir de tejidos de *M. birostris*

El ADN genómico se extrajo a partir de las 21 muestras de tejido de individuos de *M. Birostris* siguiendo el protocolo reportado por Kashiwagi et al. (2012) y estandarizado por Vinueza (2018) en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Para esto, se colocaron aproximadamente 0.01 g de tejido muscular en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A este se le añadieron 495 µL de buffer de lisis, compuesto por 10mM NaCl, 10mM Tris y 1mM de EDTA, con un pH de 8, y 5 µL de proteinasa K. Se mezcló utilizando un vortex y se incubó por 16 horas a 56 °C con agitación, con el fin de generar lisis en el tejido. Después, se agregaron 250 µL de acetato de amonio frío y se realizó una centrifugación de los tubos por 20 minutos a 13200 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue colocado en nuevos tubos Eppendorf de 1.5 mL, en los que se añadió 750 µL de etanol frío al 100% y se mezcló. Se realizó una centrifugación por 20 minutos a 13200 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se agregó 500 µL de etanol frío al 100%. El

precipitado fue resuspendido en el etanol y se realizó una centrifugación con las condiciones antes mencionadas. Se descartó el etanol y se dejó secar el pellet en la cámara de flujo laminar. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 30-50 μ l de TE 1X y fue almacenado a -20°C .

Para la cuantificación del ADN se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 2000 de Thermo Scientific, utilizando como blanco el TE 1X en el que se resuspendió el ADN. La calidad del ADN extraído fue evaluada en base a las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. Por otro lado, la integridad fue determinada mediante la visualización de bandas de alto peso molecular en geles de agarosa al 1%. Para esto se preparó el gel de agarosa con 0.5 g de Agarosa SeaKem LE. y 50 ml de 1X TBE. Se mezcló y se calentó la solución en un microondas hasta disolver la agarosa completamente. Se esperó a que se baje la temperatura de la solución y se agregó 1.5 μ l de SYBR Safe ADN Gel Stain de Invitrogen. Esto fue colocado en el recipiente correspondiente con la peinilla para la generación de los pocillos. Se dejó enfriar y se colocó el gel en una cámara de electroforesis BIORAD con una fuente de poder EPS-300 II (C.B.S Científica) con 1X TBE. Se mezcló 5 μ l de cada muestra resultante de la PCR con cada uno de los primers con 3 μ l de Blue Juice 10X de Invitrogen. En el primer pocillo del gel se colocó 1 μ l de Ladder 10bp de invitrogen y cada una de las muestras con Blue Juice fue colocada en un pocillo diferente.

2.3 Amplificación de regiones de microsatélites

Se utilizaron los primers heterólogos de regiones microsatélites utilizados por Vinueza (2018), que fueron originalmente diseñados y estandarizados por Kashiwagi et al. (2012) para la especie *M. alfredi*. En este estudio se utilizaron 8 primers (MA09, MA14, MA15, MA21, MA30, MA34, MA43 y MA49). Los primers *forward* fueron sintetizados con una cola universal de 15 pares de bases en el extremo 5', con el fin de aplicar la metodología de amplificación por

fluoróforos descrita por Blacket et al. (2010). Esta metodología se basa en usar un solo primer universal como cola para cada primer complementario específico para un locus y un primer universal marcado con un fluoróforo. Los loci individuales con rangos alélicos similares se diferencian al usar diferentes fluoróforos. En esta investigación se usaron los fluoróforos 6FAM, VIC, NED y PET. Los loci fueron amplificados utilizando una PCR singleplex.

Las reacciones de PCR se realizaron con un volumen final de 25 μ l, en donde se utilizó una concentración de 1X de Buffer de PCR (Invitrogen), 2.5mM de MgCl₂, 0.1 mg/ml de BSA, 0.4mM de dNTPs (Invitrogen), 0.2 mM de primer Forward modificado con la cola universal, 0.4 mM de primer reverse, 0.2 μ M de los primers marcados con fluoróforo (6FAM, VIC, NED y PET), 1 U de Taq Polimerasa y 20 ng de ADN genómico.

El programa del termociclador se programó con una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, se realizan 37 ciclos de tres fases de cada uno de: 30 segundos a 94°C, 45 segundos a la temperatura de annealing de cada primer, entre un rango de 55 a 65°C, (Anexo A) y 90 segundos a 72°C de extensión. Finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 10 minutos (Vinueza, 2018).

Los productos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Se corrió la cámara por 30 minutos a 100V. Finalmente se utilizó un fotodocumentador Biorad Gel Doc XR para ver las bandas.

2.4 Genotipado y elaboración de matrices alélicas

Los productos de la amplificación se colocaron en los pocillos de placas MicroAmp Optical. En cada pocillo se colocó 15 μ l del producto de PCR de tres primers con distinto fluoróforo de un mismo individuo. Las placas fueron enviadas a Macrogen en Seúl-Corea para genotipar los

fragmentos, a través de una electroforesis capilar, por medio de un secuenciador Applied Biosystems ABI 3130xl. Los datos resultantes permitieron determinar el tamaño de los amplicones mediante la identificación de los picos de fluorescencia de la muestra y el primer correspondiente. Estos picos de fluorescencia fueron identificados mediante la utilización del programa GeneMarker de SoftGenetics LLC (2012). Para el reconocimiento de los picos se eligió a los de mayor intensidad, teniendo en cuenta de que no se trate de un artefacto, y comprobando que exista concordancia entre el tamaño y el número de pares del motivo de cada locus. Cuando dentro del tamaño esperado de cada primer se presentaban dos picos claros, (dos alelos) se determinaba que se trataba de un individuo heterocigoto; cuando solamente se presentaba un solo pico claro (un alelo) dentro del tamaño del primer esperado, se asumía que era un individuo homocigoto.

Se elaboró la matriz alélica utilizando Microsoft Excel 2020. Se elaboró una tabla con el nombre de los 7 loci analizados en diferentes columnas. En donde cada loci abarcaba dos columnas. El código de las muestras, pertenecientes a diferentes a diferentes individuos, fueron colocados en diferentes filas. En las celdas se colocaron el número de pares de bases para cada alelo. Esta matriz fue utilizada para realizar los análisis de diversidad genética y los de estructura poblacional. Dependiendo del programa utilizado, se modificó el formato de la matriz a .csv o al requerido por el programa.

2.5 Análisis de la diversidad genética y estimación de la estructura poblacional de *M. birostris* en Galápagos

Se utilizó RStudio con el paquete adegenet (Jombart, 2008), hierfstat (Goudet y Jombart, 2015) y ggord (Beck, 2017) para determinar la diversidad genética de las muestras de mantarrayas gigantes recolectadas en Galápagos en el 2019. Parámetros como el número de alelos por locus, el

contenido de información polimórfica (PIC), la heterocigosidad esperada (H_e) y la observada (H_o), y la distancia F_{st} fueron calculados. La riqueza alélica se calculó con el paquete PopGenReport v3.0.4. Se utilizó FreeNa (Chapuis y Estoup, 2007) y el algoritmo de maximización de expectativas (EM) para determinar las frecuencias alélicas nulas para cada locus. Los valores corregidos de F_{ST} se compararon con los valores no corregidos utilizando el método excluyente de alelos nulos (ENA) con una prueba T pareada para evitar un sesgo en el análisis de la estructura de la población por los alelos nulos.

Por otro lado, el análisis de componentes principales (PCoA) y el análisis discriminante de componentes principales (DAPC) se realizaron con el paquete de Rstudio ggord (Beck, 2017) y el paquete adgenet (Jombart, 2008). Se utilizó el programa GENEPOP v.4.2 (Raymond y Rousset 1995) para determinar las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). Con la prueba estadística de probabilidad de Lhome de GENECLASS 2.0 (Piry et al. 2004) se identificó a los migrantes de primera generación. Se corrieron 100000 simulaciones con un $\alpha = 0.05$ utilizando el criterio bayesiano de Rannala y Mountain (1997), y el método de remuestreo de Paetkau et al. (2004).

Para definir la estructura poblacional se realizó un análisis bayesiano con el programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Se estimó el número de linajes que explican de mejor manera la estructura poblacional. En base a lo utilizado por Vinueza (2018), los valores de K evaluados fueron entre 1 y 8 con 10 réplicas para cada K. Se usó 100000 pasos de burn-in y 1000000 de MCMC o Markov Chain Monte Carlo. Con la herramienta Structure Harvester (Earl, 2012), se calculó el valor K óptimo, un valor que nos define el número de linajes de los individuos muestreados en base a inferencia bayesiana. La información fue compilada y graficada utilizando el programa CLUMPAK (Kopelman et al., 2020).

3 RESULTADOS

3.1 Extracción y cuantificación de las muestras de tejido de *M. birostris*

Las concentraciones de ADN de las 21 muestras de individuos se encontraron entre 8.2 y 6209 ng/ μ L, teniendo una concentración promedio de 2124 ng/ μ L. Por otro lado, el índice de calidad 260/280 se encontró entre 0.87 y 2.11, con un promedio de 1.83 y el de 260/230 entre 0.69 y 2.14 con un promedio de 1.79. El promedio de la relación 260/280 nos indica que el tipo de ácido nucleico presente y su pureza es aceptable, al encontrarse entre el rango de 1.85–1.88 que es indicativo de la presencia de dsADN (Anexo B). Por otro lado, la relación 260/230 indica la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm, se espera que esté dentro del rango de 2.3 y 2.4; si la relación es más baja, podría deberse a la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm, como es en este caso, que se tiene una relación 260/230 promedio de 1.79. Sin embargo, para prácticas de laboratorio, muestras de ADN con una relación A_{260} / A_{280} y $A_{260} / A_{230} > 1.8$ se consideran adecuadas para su uso (Koetsier y Cantor, 2019).

3.2 Amplificación y Genotipado

Se amplificaron ocho loci de las muestras de los individuos recolectados en Galápagos en el año 2019. Se comprobó con electroforesis en el gel de agarosa que los fragmentos de interés se encontraban dentro del rango del tamaño esperado. Para todas las muestras se obtuvo una amplificación positiva con todos los primers. Los picos resultantes del genotipado se analizaron con GeneMarker (2012). De los ocho primers utilizados, uno (MA14) presentó *missing data* del 100% por lo que no fue considerado para los análisis posteriores. El porcentaje de *missing data* del genotipado, con siete primers, fue del 6.12%.

3.3 Diversidad genética

Se encontró un total de 36 alelos, para los 7 loci de las 21 muestras analizadas. El número de alelos por locus estuvo entre 4 para MA21 y 7 para MA30, con un promedio de 5.14 alelos por locus (Tabla 1). El contenido de información polimórfica (PIC) indicó que MA30 fue el marcador más polimórfico, con un valor PIC de 0.74, y MA21 el menos polimórfico, con un valor PIC de 0.40 (Tabla 1). La heterocigosidad esperada (H_e) promedio para los loci estudiados fue de 0.65, indicando una diversidad genética moderadamente alta para *M. birostris* en la Isla Isabela (Galápagos). El rango de esta estuvo entre 0.46 para MA21 y 0.78 para MA30. Para la heterocigosidad observada (H_o), se tuvo un promedio de 0.67 con un rango entre 0.2 para MA15 y 1.0 para MA34. Se obtuvieron las frecuencias de alelos nulos (N_o) siendo mayores en los loci MA15 (0.34) y MA30 (0.29). Se realizó una prueba T pareada con el fin de determinar si los alelos nulos estaban sesgando el análisis de la estructura de la población, el resultado no indicó diferencias significativas (valor $p > 0.05$) entre los valores F_{st} no corregidos y corregidos, lo que sugiere que los alelos nulos no tendrían efecto en los análisis de estructuración genética posteriores. Cuatro loci (MA15, MA21, MA30 y MA34) se desviaron significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg ($HWD < 0.05$).

Los índices de diversidad genética se calcularon también para cada localidad del muestreo. Los Túneles y La Unión presentaron el mayor número de alelos, con 31 y 29 alelos respectivamente. En Punta Negra se encontraron 11 alelos y en Isla Tortuga 10. La heterocigosidad esperada (H_e) se encontró en un rango entre 0.29 (Punta Negra) y 0.66 (Los Túneles); mientras que, la heterocigosidad observada (H_o) se presentó en un rango entre 0.57 (Punta Negra) y 0.71 (Los Túneles). La heterocigosidad observada tuvo valores mayores que la heterocigosidad esperada en la mayoría de las localidades, excepto en Los Túneles (Tabla 2).

3.4 Diferenciación poblacional

Con los resultados del programa GENECLASS se identificaron seis individuos como primera generación de migrantes (Tabla 4), con un $p \leq 0.05$. De los seis migrantes identificados, tres tuvieron como origen Los Túneles y tres La Unión. En lo que respecta a la localidad asignada, cuatro tuvieron Punta Negra, uno Isla Tortuga y otro La Unión. Esto nos sugiere la existencia de flujo génico entre las localidades, siendo Punta Negra la localidad de la cual más individuos migraron.

3.5 Estructura poblacional

El análisis de la estructura poblacional realizado mediante inferencia bayesiana con el programa STRUCTURE sugiere que este se explica mejor cuando se consideran tres linajes ($K=3$), obteniendo un valor delta K de 0.828 (Anexo C). El segundo K más alto fue igual 7, con un delta K igual a 0.71 (Anexo C). La Figuras 1 muestra que los tres linajes sugeridos, aportan de igual manera en las cuatro localidades analizadas. De la misma manera, en la Figura 2 se observa que los siete linajes sugeridos contribuyen de igual manera en los individuos de las cuatro localidades, lo que sugiere la ausencia de una estructura poblacional definida.

Esto concuerda con el análisis de coordenadas principales (PCoA), que demuestra que los individuos están distribuidos en los dos componentes que explican el 49.48% de la variabilidad genética. Se presentan dos agrupaciones separadas por el componente PC2; sin embargo, ambos grupos cuentan con individuos de las cuatro localidades analizadas (Figura 3). Esto sugiere nuevamente que los 21 individuos de las cuatro localidades diferentes no presentan una estructura poblacional definida.

4 DISCUSIÓN

4.1 Diversidad genética

En esta investigación, se determinó con el contenido de información polimórfica que el marcador más informativo es el MA30, seguido del MA43 y el MA15. Con 7, 5 y 5 alelos correspondientemente. En la investigación realizada por Vinueza (2018), en muestras de individuos de la Isla de la Plata, se encontró que los loci más informativos fueron el MA43, con 6 alelos, el MA14 con 8 y el MA49 con 8. Es importante tener en cuenta que en esta investigación el marcador MA14 no fue utilizado por el *missing data* que presentó.

Se encontró una diversidad genética moderadamente alta ($H_e = 0.65$) para las muestras analizadas de *M. birostris* de Galápagos del año 2019, mostrando ser mayor a la encontrada por Vinueza (2018) para los individuos de la Isla de la Plata (0.61). Estos resultados se encuentran en el rango de otros estudios de varias especies de elasmobranchios, en los que se ha reportado valores de H_e entre 0.05 y 0.88 (Maduna et al., 2014). Estos datos sugieren que entre las poblaciones de mantarrayas en Galápagos podría existir un flujo génico que contribuye a explicar la heterocigosidad esperada moderadamente alta encontrada. Esto es muy posible si se tiene en cuenta la capacidad migratoria de esta especie, lo que podría facilitar el flujo génico entre individuos de diferentes poblaciones (Stewart et al., 2016).

En las cuatro localidades se encontró una heterocigosidad esperada promedio de 0.50 y una observada promedio de 0.64 (Tabla 2). Las localidades de La Unión y Los Túneles contaron con la mayor heterocigosidad esperada. Por otro lado, Punta Negra cuenta con la menor. Es importante tener en cuenta la cantidad de muestras tomada en cada localidad. En los túneles, en donde se encontraron 31 alelos, se tomaron muestras de 10 individuos y en Punta Negra o Isla Tortuga, en donde solo se tomó una muestra, se encontró 10 y 11 alelos respectivamente. Esto nos indica que,

a pesar del bajo número de individuos muestreados en esas localidades, el número de alelos encontrados fue considerablemente grande. Para especies oceánicas migratorias, como es el caso de la mantarraya gigante, se han reportado bajos niveles de diferenciación genética (Veríssimo et al., 2017). La genética de una población se ve influenciada por cuatro fuerzas evolutivas: flujo genético, deriva genética, selección y mutación. Cuando se utilizan marcadores neutros, solamente el flujo y la deriva génica son considerados. En sí el flujo genético tiende a homogenizar la variación genética que podría existir entre poblaciones. Por otro lado, la deriva genética provoca un aumento de la diferenciación genética entre poblaciones. Los peces se caracterizan por tener un gran potencial de dispersión por tener un nado activo de adulto y grandes poblaciones, estos factores contribuyen a que el flujo de genes sea alto y los efectos de la deriva genética sean bajos (Chevolot, 2006). Teniendo en cuenta esto, es probable que exista un flujo génico entre las diferentes poblaciones, lo que contribuye a una homogenización de la variación genética entre poblaciones y consecuentemente a disminución de la diferenciación genética entre poblaciones. Es posible que los valores analizados, como los de heterocigosidad, se normalicen al realizar un muestreo más equitativo entre localidades.

4.2 Estructura poblacional

No se encontró una estructura poblacional clara en las poblaciones; además, Esto también puede apreciarse en la Figura 3 del PCoA, en donde se ve que la distribución de los individuos no sigue una estructura definida. Los individuos de Los Túneles y La Unión, que representan 19 de las 21 muestras analizadas, se encuentran dispersas sin seguir un patrón claro. Además de esto, este PCoA solamente explica un 49% de la variabilidad encontrada. En este estudio se realizó el análisis de muestras recolectadas cerca de la isla Isabela, por lo que es posible que exista un flujo

génico ocasional o regular que evite que se acumule una diferencia genética significativa entre localidades. Al analizar estas relaciones, se tiene que considerar que, de las 21 muestras analizadas, 10 fueron tomadas en Los Túneles, 9 en La Unión, 1 en Isla Tortuga y otra en Punta Negra. Esto claramente va a sesgar los resultados obtenidos. Se recomienda que para evitar errores de muestreo y para maximizar la robustez estadística de los resultados en una caracterización base, se tome un número de muestras similar de individuos por localidad (Chevolot, 2006). Hay varios estudios en donde se sugiere que la diferenciación genética en los elasmobranchios se da más por factores relacionados a comportamientos que por barreras geográficas físicas (Hunter et al., 2005). Hearn (2014) reporta que encuestas sobre el avistamiento de varias especies, la mantarraya gigante ha sido observada principalmente en la zona Frío Oeste, Elizabeth y Central, que se encuentran rodeando a la isla Isabela. Las cuatro localidades analizadas en este estudio se encuentran en la zona Central y Elizabeth, en donde se han observado varias mantarrayas gigantes. Esto podría explicar la falta de una estructura poblacional definida entre las cuatro localidades analizadas. Además, se sabe *M. birostris* se mueve a lugares en donde se dan explosiones de productividad, a la vez que realizan distintas interacciones sociales. Al migrar a estos lugares podría darse un intercambio génico, lo que respaldaría los resultados encontrados en este estudio. En la Reserva Marina de Galápagos se han avistado en diversas islas, como Isabela, Floreana, Pinzón, Santa Cruz y Santiago. Las mayores agregaciones de esta especie se han reportado en Roca Sin Nombre, Cabo Marshall y Cuatro Hermanos, localidades que se encuentran en la bioregión Central, al igual que las localidades analizadas en esta investigación, según el mapa propuesto por Edgar et al. (2014). Se sabe que migran a través de esta Reserva; sin embargo, su nivel de residencia no ha sido establecido. Además, en un estudio con marcas de localización en individuos de *M. birostris* de la Isla de la Plata, se encontró que algunos realizaron migraciones hacia el Perú y otras hacia las Islas

Galápagos. Probando la existencia de una conectividad entre el continente y las Islas Galápagos (Hearn, 2014). Al probar la existencia de esta conectividad, se sabe que puede existir un flujo génico entre los individuos de diversas poblaciones, lo que podría explicar la heterocigosidad moderadamente alta esperada encontrada en este estudio.

Las agregaciones y movimientos de esta especie se han visto que están relacionados con la disponibilidad de alimento, temperatura del agua, comportamientos de apareamiento y visitas a estaciones de limpieza (Burgess et al., 2018). Además, se ha determinado que durante las horas del día suelen estar presentes en estaciones de limpieza de arrecifes poco profundas y zonas de alimentación costeras, y que durante la noche se trasladan a aguas más profundas mar adentro (Burgess et al., 2018). Vinuesa (2018), discute que las fluctuaciones de estos individuos pueden estar influenciado por cambios en la temperatura del agua y cambios en los patrones de alimentación. Se ha mostrado que muchas especies de rayas y tiburones se mueven de su distribución doméstica para explotar condiciones ambientales favorables en otras áreas. Lo más probable es que los movimientos de esta especie y otras relacionadas sean el resultado de un conjunto de factores abióticos y bióticos, basados en la necesidad de los individuos de optimizar su función metabólica y mantener un acceso seguro a recursos necesarios como alimentos, refugio y otros más. En un estudio a largo plazo, realizado en Australia, se determinó que las agregaciones se debían principalmente a cambios estacionales en el uso del hábitat y no por migraciones a gran escala como se pensaba anteriormente (Schlaff et al., 2014). Establecer la estructura poblacional de estos individuos es complicado por su naturaleza de movimiento, sería interesante realizar investigaciones sobre cómo estos factores afectan a los patrones de movilización de los individuos que se encuentran en la Reserva Marina de Galápagos con el fin de poder entender mejor la estructura de estas poblaciones.

Los elasmobranquios son un grupo muy amenazado, por características como su tardía madurez sexual, tiempo de embarazo, baja fertilidad y lento crecimiento, son muy susceptibles a presiones como la sobrepesca, cambios ambientales y polución (Marandel et al., 2018). En la última década han aumentado los estudios genéticos en los elasmobranquios; sin embargo, solo un 10% de las especies de rayas y tiburones han sido investigadas en términos de estructura genética de población, diversidad genética e historia demográfica (Domingues et al., 2018). La fidelidad a largo plazo a ciertas localidades nos permite saber que el desarrollo de áreas marinas protegidas centradas en sitios de agregación podría ayudar a proteger a esta especie de la sobreexplotación (Dewar et al., 2008). Este estudio, al contribuir con información preliminar sobre la diversidad genética de los individuos de las cuatro localidades analizadas, representa una buena base para el desarrollo de futuras investigaciones que podrían ser utilizadas para el desarrollo de estrategias de conservación de *M. birostris* en la Reserva Marina de Galápagos.

5 CONCLUSIONES

- La diversidad genética de las muestras de *M. birostris* de las Islas Galápagos del 2019 es moderadamente alta.
- Los resultados de Structure sugieren el aporte de tres linajes. Sin embargo, no se observó una estructura poblacional definida para los individuos analizados, lo que puede ser explicado por la capacidad de migración de la mantarraya gigante.
- Al interpretar estos resultados, se debe tener en cuenta la cantidad reducida de muestras utilizadas para los análisis. Es necesario realizar el análisis de más individuos por localidad para obtener resultados significativamente robustos.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armstrong, A. J., Dudgeon, C. L., Bustamante, C., Bennett, M. B., & Ovenden, J. R. (2019). Development and characterization of 17 polymorphic microsatellite markers for the reef manta ray (*Mobula alfredi*). *BMC research notes*, 12(1), 233.
- Beck, M. W. (2017). ggord: ordination plots with ggplot2. R package version 1.0. 0.
- Blacket, M. J., Robin, C., Good, R. T., Lee, S. F., & 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.
- Booy, G., Hendriks, R. J. J., Smulders, M. J. M., Van Groenendael, J. M., & Vosman, B. (2000). Genetic diversity and the survival of populations. *Plant biology*, 2(04), 379-395.
- Burgess, K. B., Guerrero, M., Marshall, A. D., Richardson, A. J., Bennett, M. B., & Couturier, L. I. (2018). Novel signature fatty acid profile of the giant manta ray suggests reliance on an uncharacterised mesopelagic food source low in polyunsaturated fatty acids. *PLoS one*, 13(1).
- Chapuis, M. P., & Estoup, A. (2006). FreeNA: microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* (submitted). chapuimp@ensam.inra.fr.
- Chevolut, M. S. C. O. M. (2006). *Assessing genetic structure of thornback ray, Raja clavata: A thorny situation?*.
- Clark, T. B. (2010). *Abundance, home range, and movement patterns of manta rays (Manta alfredi, M. birostris) in Hawai'i* (Doctoral dissertation, [Honolulu]:[University of Hawaii at Manoa],[December 2010]).
- CMS SHARKS MOU. (2015). Connectivity between the populations of the Giant Manta Ray in the Galapagos Islands and coastal Ecuador and Peru. Recuperado el 10 de marzo del 2020,

- de: <https://www.cms.int/sharks/en/project/connectivity-between-populations-giant-manta-ray-galapagos-islands-and-coastal-ecuador-and>
- CMS Sharks. (2016). Propuesta de inclusión de la manta gigante en el Anexo 1 del memorando de entendimiento sobre la conservación de tiburones migratorios de la CMS. Recuperado el 28 de febrero del 2020, de: https://www.cms.int/sharks/sites/default/files/document/CMS_Sharks_MOS2_Doc_8_2_4_Rev.1.pdf
 - Croll, D. A., Dewar, H., Dulvy, N. K., Fernando, D., Francis, M. P., Galván-Magaña, F., ... & Newton, K. M. (2016). Vulnerabilities and fisheries impacts: the uncertain future of manta and devil rays. *Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems*, 26(3), 562-575.
 - Des Roches, S., Post, D. M., Turley, N. E., Bailey, J. K., Hendry, A. P., Kinnison, M. T., ... & Palkovacs, E. P. (2018). The ecological importance of intraspecific variation. *Nature Ecology & Evolution*, 2(1), 57-64.
 - Dewar, H., Mous, P., Domeier, M., Muljadi, A., Pet, J., & Whitty, J. (2008). Movements and site fidelity of the giant manta ray, *Manta birostris*, in the Komodo Marine Park, Indonesia. *Marine Biology*, 155(2), 121-133.
 - Domingues, R. R., Hilsdorf, A. W. S., & Gadig, O. B. F. (2018). The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. *Conservation Genetics*, 19(3), 501-525.
 - 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>

- Edgar, G. J., Banks, S., Fariña, J. M., Calvopiña, M., & Martínez, C. (2004). Regional biogeography of shallow reef fish and macro-invertebrate communities in the Galapagos archipelago. *Journal of Biogeography*, 31(7), 1107-1124.- Vinueza, S. (2018). 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 (Bachelor's thesis, Quito).

- Gebhardt, C. (2007). Molecular markers, maps and population genetics. In *Potato Biology and Biotechnology* (pp. 77-89). Elsevier Science BV.

- Gonzáles, P. A. P. (2018). Distribución y abundancia de *Manta birostris* (Walbaum, 1792) En el archipiélago de Revillagigedo durante el año 2016 (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Baja California Sur).

- Graham, R. T., Witt, M. J., Castellanos, D. W., Remolina, F., Maxwell, S., Godley, B. J., & Hawkes, L. A. (2012). Satellite tracking of manta rays highlights challenges to their conservation. *PloS one*, 7(5).

- Hansson, B., & Westerberg, L. (2002). On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular ecology*, 11(12), 2467-2474.

- 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.

- Hunter, E., Buckley, A. A., Stewart, C., & Metcalfe, J. D. (2005). Migratory behaviour of the thornback ray, *Raja clavata*, in the southern North Sea. *Marine Biological Association of*

- the United Kingdom. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85(5), 1095.
- IUCN. (2020). Giant Manta Ray. *Mobula birostris*. Recuperado el 10 de marzo del 2020, de: <https://www.iucnredlist.org/species/198921/126669349#conservation-actions>
 - Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405.
 - Kashiwagi, T., Broderick, D., Lance, S. L., Bennett, M. B., & 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.
 - Koetsier, G. y Cantor, E. (2019). A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity. Recuperado el 17 de abril del 2020, de: https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?la=en&rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc
 - Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, 15(5), 1179-1191.
 - Maduna, S. N., Rossouw, C., Roodt-Wilding, R., & Bester-van der Merwe, A. E. (2014). Microsatellite cross-species amplification and utility in southern African elasmobranchs: a valuable resource for fisheries management and conservation. *BMC research notes*, 7(1), 352.

- Marandel, F., Lorance, P., Andrello, M., Charrier, G., Le Cam, S., Lehuta, S., & Trenkel, V. M. (2018). Insights from genetic and demographic connectivity for the management of rays and skates. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 75(8), 1291-1302.
- Marshall, A. D., Bennett, M. B., Kodja, G., Hinojosa-Alvarez, S., Galvan-Magana, F., Harding, M., ... & Kashiwagi, T. (2016). *Manta birostris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e. T198921A9108067.
- Marshall, A. D., Compagno, L. J., & Bennett, M. B. (2009). Redescription of the genus *Manta* with resurrection of *Manta alfredi* (Krefft, 1868) (Chondrichthyes; Myliobatoidei; Mobulidae). *Zootaxa*, 2301(2301), 1-28.
- NOAA Fisheries. (2020). Giant Manta Ray. Recuperado el 10 de marzo del 2020, de: <https://www.fisheries.noaa.gov/species/giant-manta-ray>
- Paetkau, D., Slade, R., Burden, M., & Estoup, A. (2004). Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular ecology*, 13(1), 55-65.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L., & Estoup, A. (2004). GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of heredity*, 95(6), 536-539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Raffard, A., Santoul, F., Cucherousset, J., & Blanchet, S. (2019). The community and ecosystem consequences of intraspecific diversity: A meta-analysis. *Biological Reviews*, 94(2), 648-661.

- Rannala, B., & Mountain, J. L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9197-9201.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP on the web. *Montpellier, FR: Lab. Genet. Environ.*
- Rocha, S. (2003). Molecular markers, and useful tool for genetic selection in oil palm.
- Schlaff, A. M., Heupel, M. R., & Simpfendorfer, C. A. (2014). Influence of environmental factors on shark and ray movement, behaviour and habitat use: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 24(4), 1089-1103.
- SoftGenetics. (2012). GeneMarker. Recuperado el 15 de marzo del 2020, de: <https://softgenetics.com/GeneMarker.php>
- Stevens, G. M., Hawkins, J. P., & Roberts, C. M. (2018). Courtship and mating behaviour of manta rays *Mobula alfredi* and *M. birostris* in the Maldives. *Journal of fish biology*, 93(2), 344-359.
- Stewart, J. D., Beale, C. S., Fernando, D., Sianipar, A. B., Burton, R. S., Semmens, B. X., & 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., & 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.
- Tóth, G., Gáspári, Z., & Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research*, 10(7), 967-981.
- Veríssimo, A., Sampaio, Í., McDowell, J. R., Alexandrino, P., Mucientes, G., Queiroz, N., ... & Noble, L. R. (2017). World without borders—genetic population structure of a highly

- migratory marine predator, the blue shark (*Prionace glauca*). *Ecology and Evolution*, 7(13), 4768-4781.
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. D. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and molecular biology*, 39(3), 312-328.
 - Vinueza, S. (2018). 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 (Bachelor's thesis, Quito).
 - White, W. T., Corrigan, S., Yang, L., Henderson, A. C., Bazinet, A. L., Swofford, D. L., & Naylor, G. J. (2018). Phylogeny of the manta and devilrays (Chondrichthyes: mobulidae), with an updated taxonomic arrangement for the family. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 182(1), 50-75.
 - Yumiceba Corral, V. P. (2014). Estudio preliminar de diversidad genética de *Manta birostris* que visitaron la Isla de la Plata durante los años 2010, 2011 y 2012 (Bachelor's thesis, Quito: USFQ, 2014).

7 TABLAS

Tabla 1. Diversidad genética y estimaciones de relación para los loci analizados en los 21 individuos de *M. birostris* de la Isla Isabela. Se incluyen el número de alelos (Na), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), contenido de información polimórfica (PIC), frecuencia de alelos nulo (No), F_{ST_A} sin corregir y F_{ST_B} alelo nulo *corregido*, desviación del valor p de Hardy-Weinberg (HWD).

Locus	Na	Ho	He	PIC	No	F_{ST_A}	F_{ST_B}	HWD
MA09	4	0.57	0.62	0.57	0.02675	0.041622	0.064508	0.130621
MA15	5	0.2	0.71	0.66	0.34794	-0.034553	0.078538	2.85E-07
MA21	4	0.3	0.46	0.40	0.2022	-0.118997	-0.017485	0.012038
MA30	7	0.81	0.78	0.74	0.29456	-0.067924	-0.008324	1.00E-06
MA34	6	1.0	0.65	0.56	0.04762	-0.005185	-0.018281	0.001229
MA43	5	0.86	0.72	0.67	0.0	-0.019777	-0.019777	0.893593
MA49	5	0.95	0.63	0.58	0.05173	-0.040702	-0.039567	0.065939

Tabla 2. Índices de diversidad genética estimados dentro de las localidades en donde se tomaron las muestras de los individuos de *M. birostris*.

Localidad	N	Na	He	Ho
Isla Tortuga	1	10	0.4285714	0.6666667
La Unión	9	29	0.6373140	0.6210286
Los Túneles	10	31	0.6485561	0.7163286
Punta Negra	1	11	0.2857143	0.5714286

Se muestra el número de individuos (N), número de alelos (Na), heterocigosidad esperada (He) y heterocigosidad observada (Ho).

Tabla 3. Primera generación de migrantes detectada con GENECLASS 2 (GC)

ID individuo	Origen	GC_Lhome	P-val	GC-Localidad asignada
37	2	12.265	0.002	4
41	2	9.821	0.04405	3
125	2	10.767	0.01822	4
108	3	13.19	0.0004	1
111	3	11.209	0.01494	4
119	3	10.899	0.02118	4

Descripción de la tabla: en esta tabla se muestra a los probables migrantes utilizando el estadístico

Lhome; se muestra el valor p, que en caso de ser menor a 0.05 muestra los migrantes potenciales.

Además, se especifica la localidad de origen y en la que se muestreo al individuo.

8 FIGURAS



Figura 1. Resultados de Structure graficados con CLUMPAK. Se obtuvo un valor óptimo de 3 para K.



Figura 2. Resultados de Structure graficados con CLUMPAK. Se obtuvo un valor óptimo de 7 para K.

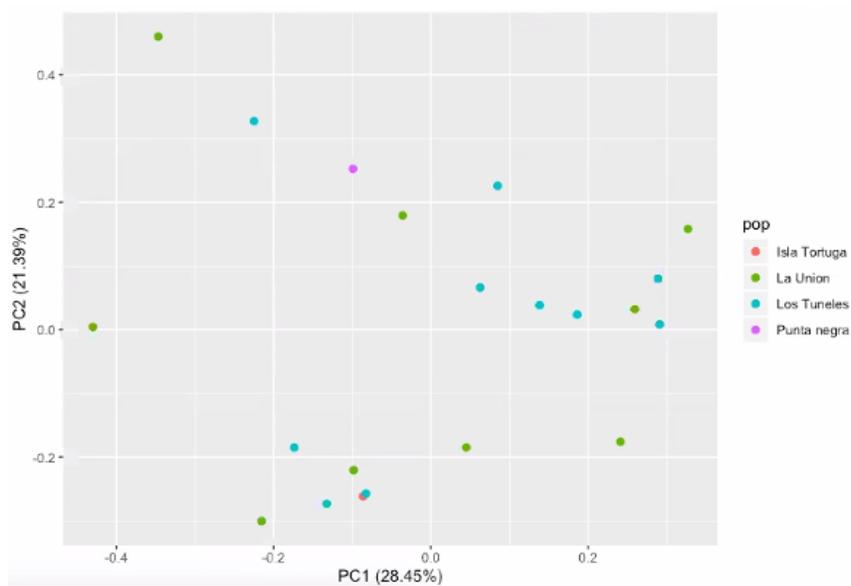


Figura 3. PCoA de las muestras de individuos de *M. birostris* de Galápagos del año 2019. Los colores representan diferentes localidades

9 ANEXOS

Anexo A. Información de los 7 loci SSR de las 21 muestras analizadas de Galápagos - Ecuador, del año 2019. En esta tabla se resume la información para cada locus.

Locus GenBank	Secuencia de Primers 5'->3'	Motivo Repetido	Temp. Annealing (°C)	Fluoróforo	Tamaño Alelos (pb)
MA09 JX269144	F: GATGCGTGTTCCTCCTGTTG R: GCCAGCAATCTTCTTCCACATT	ACAT	65	VIC	372-388
MA15 JX269146	F:CATATAAAGGACCCCGGCAC R:TGGTGGAGTGAAGAGGCTG	AC	56	PET	146-180
MA21 JX269147	F:GTGGCGAAACCCAATTTCC R:GAGCAAATCTCAGCACATCCA	TCTA	61.8	6FAM	187-211
MA30 JX269148	F:CTCGTGCCCCTCTTCTTCTG R:GACTGTGGGAGGCATGGAA	AC	56	NED	195-223
MA34 JX269149	F:CGTCCAAGGCAGGATTGATT R:TCGAGCACTCACCTATCCAC	GT	55	NED	184-190
MA43 JX269151	F:GCAGCTCCCATATCTCTCTCCC R:CCACTTGACCCGAACATGAG	TCA	60	6FAM	265-301
MA49 JX269152	F:CCATGAACACAGCCTCAGATT R:TGAGTCCCTCCAGCATTTTGT	CTAT	61.8	VIC	219-259

Anexo B. Datos de extracción y cuantificación de muestras de individuos de *M. birostris* de Galápagos - 2019.

Fecha	Muestra	Concentración (ng/ul)	260/280	260/230
8/14/14	Sc30	1645.4	1.89	1.89
8/16/14	Sc37	2178.1	1.83	1.48
8/21/14	Sc38	1988.8	1.86	1.90
8/23/14	Sc41	29.1	0.87	0.69
8/23/14	Sc48	2307.1	1.84	2.00
8/24/14	Sc105	5554.9	1.86	2.04
8/24/14	Sc108	1436.6	1.87	2.01
8/25/14	Sc111	714.5	1.84	1.83
8/25/14	Sc112	4014.0	1.89	1.71
8/25/14	Sc113	2165.6	1.86	2.02
8/25/14	Sc118	3499.0	1.89	1.86
8/25/14	Sc119	1799.3	1.87	1.80
8/26/14	Sc120	1626.6	1.87	2.05
8/26/14	Sc121	458.4	1.84	2.02
8/26/14	Sc122	693.6	1.86	1.89
8/28/14	Sc123	2884.1	1.87	1.61
8/28/14	Sc124	8.2	2.11	1.11
8/28/14	Sc125	1175.1	1.90	1.68
8/28/14	Sc126	3460.4	1.89	1.87
8/27/14	Sc127	6209.6	1.86	1.89
8/27/14	Sc129	1933.7	1.87	1.91
8/30/14	Sc130	956.7	1.85	2.14

Anexo C. Resultados del agrupamiento genético poblacional basados en el método de modelado bayesiano de Structure.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	10	-360.670000	0.231181	—	—	—
2	10	-361.520000	0.524510	-0.850000	0.080000	0.152523
3	10	-362.290000	0.929098	-0.770000	0.770000	0.828761
4	10	-362.290000	0.932678	0.000000	0.420000	0.450316
5	10	-361.870000	0.798679	0.420000	0.460000	0.575951
6	10	-361.910000	1.203190	-0.040000	0.750000	0.623343
7	10	-361.200000	1.169045	0.710000	0.820000	0.701427
8	10	-361.310000	1.040780	-0.110000	—	—