



**Caracterización genética y aspectos biológicos de la manta gigante del Mar Caribe (*Manta sp.*)**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Doctora en Ciencias

Biología Marina

p r e s e n t a

SILVIA ALEJANDRA HINOJOSA ALVAREZ

Directores de Tesis: Dr. Píndaro Díaz Jaimes  
Dr. Felipe Galván Magaña

Comité Tutorial: Dr. Xavier Chiappa Carrara  
Dr. Alberto Abreu Grobois  
Dr. Daniel Piñero Dalmau



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Tabla de contenido

<b>Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>8</b>
<b>Identificación morfológica de las especies</b> .....	<b>8</b>
<b>Identificación de especies mediante ADNmt y ADNn</b> .....	<b>14</b>
<b>Objetivo General</b> .....	<b>16</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>16</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>17</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>17</b>
<b>Área de estudio</b> .....	<b>18</b>
<b>Material y Métodos</b> .....	<b>19</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>23</b>
<b>1. Ecología y biología de la manta gigante del Caribe Mexicano</b> .....	<b>23</b>
<b>2. Diferenciación morfológica</b> .....	<b>31</b>
<b>3. Análisis filogenético</b> .....	<b>33</b>
<b>4. Mitogenoma de la manta gigante (<i>M. birostris</i>) y manta de Holbox (<i>Manta sp.</i>)</b> .....	<b>41</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>45</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>53</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>55</b>

## Introducción

### 1. Especiación en ambientes marinos

La especiación es el proceso que resulta del aislamiento genético de las poblaciones. El aislamiento de las poblaciones puede ocurrir por una barrera tanto ecológica como a escala de tiempo geológico (Simpson 1944; Jab-Lonski 2008; Reznick y Ricklefs 2009). Mayr (1954) reconoció que la evolución en el ambiente marino puede operar bajo diferentes reglas dada la carencia de barreras geográficas y por ende la dificultad de aplicar modelos de especiación alopátrica. Por tanto los mecanismos de especiación en estos ecosistemas al parecer no se sujetan a la presencia de barreras geográficas. Para poder entender como opera la especiación en el ambiente marino se tiene que considerar que existen pocas oportunidades de aislamiento geográfico y que la mayoría de los organismos marinos, ya sea peces o invertebrados, tienen fases larvarias que a su vez están sujetas a las corrientes oceánicas lo cual les permite una mayor capacidad de dispersión y por tanto colonizar nuevos ambientes. Sin embargo persiste la duda en los mecanismos que operan en especies que no tienen un ciclo de vida que involucre una fase larvaria y que además tienen la capacidad de migrar grandes distancias donde las barreras geográficas no significan un impedimento para la reproducción. Por tanto, quizás los mecanismos mediante los cuales las poblaciones quedan aisladas en ambientes marinos podrían ser tan sutiles como un cambio en la salinidad ó la temperatura (Palumbi 2004, Mallet et al 2009).

Mientras que la especiación alopátrica ha sido considerada como el modelo dominante de la especiación en tierra firme, debido al alto potencial de dispersión de las especies marinas existe un creciente apoyo teórico y empírico hacia la especiación simpátrica como el modelo dominante en el medio marino (Dieckmann y Doebeli 1999; Gavrillets et al 2001; Kinlan y Gaines 2003; Palumbi 2004, Mallet et al 2009;. Crow et al 2010;. Elmer et al.,2010).

Sin embargo, otro modelo que permite explicar los procesos de formación de especies en ambiente marino es la especiación ecológica (Schluter, 2009). Este proceso ocurre cuando existe selección divergente entre las poblaciones ó subpoblaciones en ambientes contrastantes lo que eventualmente puede conducir directa ó indirectamente al aislamiento reproductivo (Schluter, 2001).

Mayr (1954) reconoció que muchas de las diferencias genéticas acumuladas entre poblaciones, en particular los que afectan genes funcionales relacionados con aspectos fisiológicos y ecológicos, son los posibles mecanismos de aislamiento. La especiación ecológica es un proceso que no ha sido fácil demostrar debido a la la complejidad en el monitoreo de las diferentes variables ambientales y biológicas que pueden operar para que este proceso se lleve acabo. Hasta hace poco tiempo no existían trabajos científicos que sustentaran este modelo, sin embargo, existen actualmente algunos estudios en poblaciones naturales que discuten ya sobre el mismo como respuesta a los procesos que suceden en el ambiente marino. Este podría ser el caso de la reciente revisión taxonómica de la única especie de manta reconocida (*Manta sp.*) el cual se basó en datos morfológicos y merísticos (Marshall et al., 2009) en el cual se concluye acerca de la posible existencia de dos ecotipos que exhiben segregación de hábitat; uno costero y otro en mar abierto, y que podrían representar dos especies distintas (Kashiwagi et al., 2012). Los intervalos de tiempo de divergencia sugieren que la especiación y la posterior dispersión pudo haber ocurrido durante los ciclos glaciales del Pleistoceno hace 1 Ma (Hewitt, 1996, 2000; Hofreiter y Stewart, 2009; Jansson y Dynesius, 2002).

Las especies marinas incipientes pueden haber experimentado fluctuaciones ecológicas importantes en algunas características del hábitat (por ejemplo, cambios en la temperatura, salinidad, nivel del mar) contracción y expansión de los ambientes marinos, cambios en la circulación oceánica y como consecuencia en la intensidad de las surgencias (Lambeck et al, 2002; Peeters et al., 2004) lo que promovió la selección de hábitats distintos.

## 2. Ecología y biología

Las mantas son organismos pertenecientes a la familia Mobulidae, se caracterizan por tener una distribución tropical y sub-tropical tanto en el Pacífico como en el Atlántico. Es común observarlas en áreas de alta productividad, así como en islas oceánicas y montañas marinas (Compagno, 1999, Rubin, 2002). Su distribución comprende, en el Hemisferio Norte, las aguas de California en el Pacífico Nororiental y las de Rhode Island en los Estados Unidos, de la Península de Sinaí en Egipto, de Aomori en Japón, de las Islas Azores y en las de México. En el Hemisferio Sur su distribución ocurre en las aguas de Perú, Uruguay, Brasil, Sudáfrica y Nueva Zelanda (Marshall et al.2009).

Los adultos se reconocen fácilmente por sus características aletas pectorales largas y triangulares y por su cabeza que no rebasa el 17% de la amplitud del disco. Son filtradoras aunque consumen también peces pequeños como presas ocasionales (Fischer et al., 1995). Son organismos vivíparos, conciben una sola cría después de un periodo largo de gestación (1-2 años) (Fischer et al., 1995). Tienen gran atractivo turístico. No obstante la información biológica básica relacionada con alimentación, reproducción, distribución, migración, genética etc., es muy escasa y hay reportes de disminución de sus avistamientos en Japón, en la Polinesia Francesa y en Baja California (Homma et al., 1997, Marshall et al., 2008). La IUCN (International Union for the Conservation of Nature), la CITES (Convention on International Trade in Endangered Species) y las Normas Oficiales Mexicanas no han podido determinar el verdadero estado de las poblaciones de mantas, por lo cual no se han podido ingresar en la lista roja de IUCN, aunque se les ha catalogado como vulnerables (Marshall et al., 2013). En México, *Manta birostris* está incluida en la NOM-029-PESC-2006, la cual prohíbe su captura comercial. La falta de información biológica dificulta la aplicación de medidas regulatorias y de monitoreo para el manejo y conservación de la especie,

como la delimitación de áreas naturales protegidas para su conservación (Dewar et al. 2008)

Su gran tamaño y su estatus de especie protegida, incrementan la dificultad para estudiarlas en su ambiente y por ello el conocimiento científico de las mantas es escaso (Notarbartolo di Sciara, 1987), incluso en lo relativo a su estatus taxonómico.

Recientemente se han encontrado en *Manta birostris* diferencias en sus patrones de coloración, morfología y distribución que permitieron una reevaluación de la composición del género. Originalmente, se había descrito a la manta gigante o manta diablo (*Manta birostris*) como especie única del género *Manta*. Sin embargo, recientemente Marshall et al., (2009) en una revisión del género propusieron la existencia de una segunda especie. Sus estudios basados en la descripción morfológica, morfométrica y caracterización genética, así como en algunos aspectos conductuales y ecológicos, les permitieron separar a esta especie en dos entidades: *M. birostris* y *M. alfredi*, e incluso presentaron argumentos para proponer la existencia de una tercera especie *Manta sp. cf. birostris*, de la cual aún no se cuenta con suficiente información (Marshall et al. 2009; Kashiwagi et al. 2012).

### 3. Filogenética

Por mucho tiempo el tipo de caracteres más utilizados para la determinación e identificación de especies han sido los morfológicos. Sin embargo, considerando que éstos no necesariamente tienen una base genética y son sujetos de la influencia del ambiente, existen casos en los que dicha aproximación no es suficiente de modo que surge la necesidad de corroborar el estatus de las especies mediante el uso de caracteres moleculares. La conjunción de ambas áreas del conocimiento (genética y morfología), en muchos casos ha permitido la correcta identificación de especies y la reconstrucción de su filogenia, lo cual ha contribuido a resolver diversas controversias taxonómicas y obtener mejor información para identificar procesos de divergencia genética y determinar la

existencia de poblaciones discretas para aplicar un manejo adecuado de las mismas (Gall y Loudenslager 1981, Carr et al. 2002; Cross et al. 2004).

Existen diversas técnicas basadas en marcadores moleculares para identificar especies: la más utilizada es la secuenciación del ADN (Giassudin, 1995; Nelson y Cox, 2001) ya sea de regiones específicas de ADN mitocondrial (ADNmt) o de genes de ADN nuclear (ADNn) (Avise, 1994; Parker et al. 1998; Sunnucks; 2000; Hallerman, 2003). Una de las ventajas de la utilización de caracteres moleculares es que ha mostrado su eficacia para resolver controversias taxonómicas en el análisis filogenéticos (Avise, 1994). Actualmente varios autores han enfatizado acerca de la conveniencia de aumentar el número de marcadores usados para diferenciar especies, sobre todo en grupos en los cuales se presentan bajas tasas de mutación y un reloj molecular lento como es el caso de elasmobranchios y mamíferos marinos. Incluso dada la posibilidad de obtener actualmentemediante métodos de secuenciación masiva el genoma mitocondrial ó genomas completos, se ha visto que la resolución de los árboles filogenéticos aumenta y en especial en grupos con bajas tasas mutacionales, permiten la resolución de controversias evolutivas (Morin et al., 2010).

## **Antecedentes**

### **Identificación morfológica de las especies**

Los estudios de la morfología externa en la familia Mobulidae son escasos. Entre los más importantes se encuentran los estudios realizados por Notarbartolo di Sciara (1987), los cuales incluyen una revisión de todas las especies pertenecientes al género *Mobula*. Este fue el primer estudio formal, en el cual se utilizó la morfología externa incluyendo coloración, dentición y dentículos

dérmicos, permitiendo la descripción de nuevas especies como fue *Mobula munkiana*. Asimismo, el estudio presenta las claves más completas que se siguen utilizando hasta ahora para la identificación de las especies del género *Mobula*.

Montes-Domínguez y González-Isaís (2007), realizaron una extensa descripción de la anatomía comparada de cuatro especies de móbulas (*M. japonica*, *M. munkiana*, *M. thurstoni* y *M. tarapacana*) en el Golfo de California. Dichos autores encontraron diferencias morfológicas en el cráneo de las cuatro especies, de las cuales *M. tarapacana* presenta los caracteres más plesiomórficos y *M. japonica* los caracteres con mayor diversidad. Entre las cuatro especies, la estructura con mayor variación fue el músculo coracoarcual y el corahioideus.

En lo referente al género *Manta*, Marshall et al. (2009) revisaron especímenes de colecciones provenientes de Bimini en las Bahamas y de Florida, al igual que de especímenes capturados en campos pesqueros de Indonesia y Japón. Mediante un registro minucioso de las diferencias en morfología externa e interna de especímenes de Mozambique, Sudáfrica, Japón, México, Micronesia y Australia, los autores llegaron a la conclusión de que a nivel global el género *Manta* no está constituido únicamente por la especie *M. birostris*, y reportan la existencia de un nuevo morfotipo caracterizado por su morfología externa y por características genéticas que ha sido considerado una nueva especie e identificada como *Manta alfredi*.

Las dos especies (*Manta birostris* y *Manta alfredi*), y posiblemente una tercer especie (*Manta sp. cf. birostris*), presentan diferencias en morfología que son clave para su identificación. Estas consisten en el patrón de coloración ventral, la presencia o ausencia de espina caudal, coloración de la boca y la presencia y forma de marcas blancas en la parte anteroposterior del dorso (Marshall et al. 2009). *Manta birostris*, la especie mayor de la familia Mobulidae, alcanza hasta 6.7 m de ancho de disco, y su tamaño al nacer es de 1.2 m ([http://www.elasmobranch-research.org/education/topics/lh\\_manta\\_faq.htm](http://www.elasmobranch-research.org/education/topics/lh_manta_faq.htm)). La coloración dorsal es negra con manchas blancas en la región suprabranquial, que presentan una forma triangular y se presentan a ambos lados del disco. La boca es negra, coloración

que generalmente se extiende hasta la superficie ventral y los lóbulos cefálicos (Fig. 1). La superficie ventral es blanca y en algunas ocasiones color crema, con la presencia de marcas en forma de puntos en la región abdominal y en medio de las branquias, mas no en las branquias y en la parte anterior a la cloaca. Presentan manchas en forma de puntos por debajo de la quinta branquia (Fig.2) y un borde gris en forma de V en la parte caudal (Fig.2) que se extiende hasta las aletas pectorales (Marshall et al. 2009). Se caracteriza por presentar una espina caudal que se encuentra en el dorso de la cola inmediatamente después de la aleta dorsal (Fig.3)



Figura 1. Vista dorsal de *M. birostris* (Foto: Rafael de la Parra)



Figura 2. Vista ventral de *M. birostris* (Foto: Rafael de la Parra)

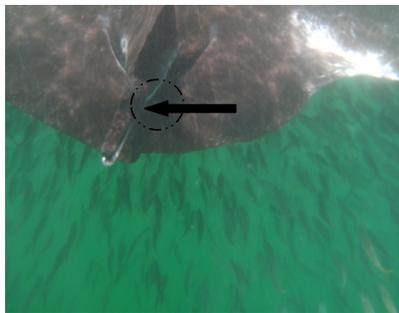


Figura 3. Espina caudal de *M. birostris* (Foto: Rafael de la Parra)

*Manta alfredi* (Kreft, 1869) presenta un disco no mayor a 5.5 m y, a diferencia de *M. birostris*, no presenta una espina caudal. La coloración en la parte dorsal es negra con manchas blancuzcas. El borde anterior de estas manchas inicia en el espiráculo y hace una curva hacia la parte media formando algo similar a una cola de ballena (Fig. 4a). Puede llegar a presentar marcas de color blanco o pálidas cerca de las aletas pectorales. La superficie ventral es blanca o color crema. La boca varía de color blanco a un gris pálido. Presenta en la parte ventral manchas redondas, las cuales se encuentran en la parte posterior y alrededor o en la quinta branquia (Fig 4b). A diferencia de *M. birostris* que en la parte ventral tienen una mancha en forma de V de color oscuro a lo largo de las pectorales y hacia la cloaca, *M. alfredi* presenta solo coloración oscura en la parte distal de las aletas pectorales (Marshall et al., 2009).



Figura 4 .

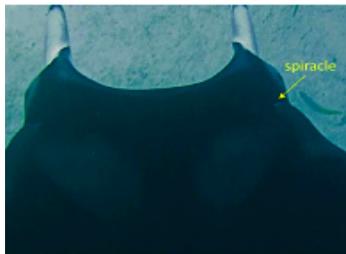
a) Manchas blancas de *M. alfredi*  
(Foto: Rafael de la Parra)

b) Marcas circulares en  
los bordes posteriores y en la  
quinta agalla (Foto: A. Marshall)

El morfotipo *Manta sp. cf. birostris*, uno de los motivos del presente estudio, que podría constituir una tercer especie, se distribuye en el Océano Atlántico principalmente en el Caribe; y pudiera estar compartiendo hábitat con *M. birostris*. De este morfotipo se han encontrado especímenes de 4.6 m a 6 m de disco. La

coloración dorsal es completamente negra con algunas manchas ocasionales de color café. Puede presentar manchas blancas similares a las descritas para *M. birostris*, manchas que no continúan hasta la parte media del disco, sino que terminan en el área de la cabeza (Fig.5). La superficie ventral tiende a ser blanca o de color crema (Fig.6), coloración que se extiende hasta la boca. Presentan puntos negros o grises que sólo se encuentran en la parte posterior de las aletas pectorales y generalmente se encuentran centralizadas en la región abdominal (Fig.7). Presentan una coloración oscura en el borde posterior de las aletas pectorales que puede o no terminar en forma de V, como en el caso de *M. birostris* (Marshall et al. 2009). Estas diferencias en morfología externa pueden ser indicativas de diferencias específicas al ser producto de características que aparecieron y se conservaron en diferentes linajes

a)



b)



Figura 5. Vista dorsal y manchas blancas de a) *Manta sp.cf birostris* y b) *M. birostris* (Foto: A. Marshall)

a)



b)

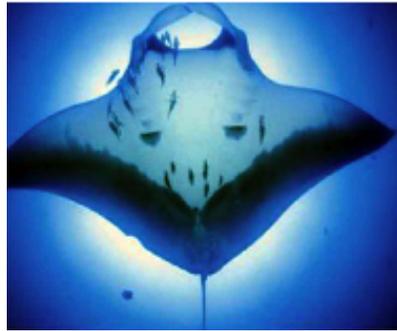
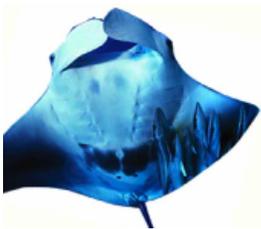


Figura 6. Coloración ventral de a) *Manta sp.cf birostris* b) *M. birostris* (Foto: A. Marshall)

a)



b)

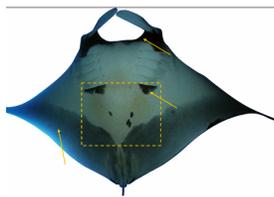


Figura 7. Manchas en la región abdominal y aletas pélvicas de a) *Manta sp.cf birostris* y b) *M. birostris* (Foto: A. Marshall)

Las dos especies reconocidas y la posible tercer especie comparten hábitat aunque parece que está ultima esta limitada al área del Caribe (Península de Yucatán y Cuba ) y el Golfo de México hasta los cayos de Florida (Fig.8)

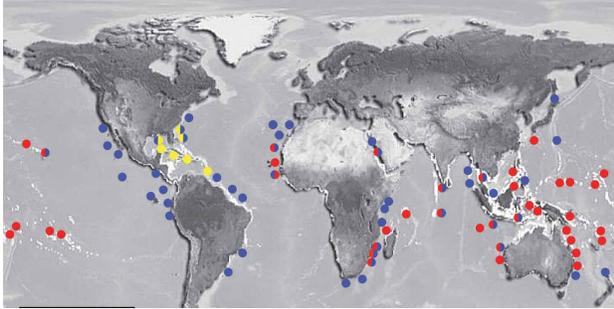


Figura 8. Distribución mundial del género *Manta* : rojo = *M. alfredi* , azul = *M. birostris* y amarillo = *Manta sp cf. birostris* (Marshall et al., 2009)

### Identificación de especies mediante ADNmt y ADNn

De manera general, las especies de tiburones son morfológicamente parecidas, tal es el caso de las especies de la familia Carcharhinidae. Estos tiburones presentan pocas diferencias en su morfología externa. Aunado a este problema la familia Carcharhinidae es una de las más expuestas a la sobre explotación por lo cual es necesario implementar medidas regulatorias. Para establecer estas medidas se requiere saber que especies son las que se están capturando.

Martin (1999) secuenció el D-Loop del ADNmt de especies morfológicamente similares del género *Carcharhinus* y llegó a la conclusión de que la ausencia de datos sobre el tiburón de aletas negras (*C. brevipina*) se debía a una errónea identificación que resultó en una confusión con el tiburón puntas negras (*C. limbatus*).

Resalta igualmente el estudio realizado por Heist y Gold (1999), en el cual pudieron diferenciar tres especies de tiburones pertenecientes a esta familia con la ayuda de un análisis de las secuencias del gen mitocondrial citocromo b.

Plank et al. (2001) lograron distinguir entre el tiburón prieto (*C. obscurus*) ó el tiburón de arena (*C. plumbeus*) utilizando secuencias del ADN ribosomal (ADNr) . Shivji et al. (2002) realizaron un estudio sobre la identificación de tiburones pelágicos con base en muestras de tejido de especímenes capturados en pesquerías del Océano Atlántico y Océano Pacífico mediante el uso de cebadores específicos del gen coenzima I (COI) y reacción en cadena de la polimerasa . Los análisis de las secuencias lograron distinguir las especies principalmente de las familias Laminidae y Carcharhinidae .

Como se mencionó anteriormente el ADNmt ha sido una herramienta útil para confirmar procesos de especiación. Corigan y Bechehgaray (2009) encontraron que la divergencia entre los organismos de la familia Orectolobidae sucedió en el Mioceno cuando chocaron las placas de Indo- Australia y Eurasia, dando como resultado que las especies de esta familia que habitan en Australia quedaran separadas debido a una especiación de tipo alopátrica.

Gardner y Ward (1998) mediante el análisis genético de muestras de tiburones de dos localidades utilizando ADNmt, aloenzimas y medidas morfométricas, encontraron que no solo había diferencias morfológicas como el tamaño promedio de los animales y el número de vértebras precaudales, sino también había diferencias en las secuencias de su ADNmt. Sus resultados indicaron que había por lo menos dos stocks, uno en el sur y otro en el sudoeste de EE.UU. Posteriormente Garner y Ward (2002) utilizaron ADNmt para verificar la presencia de *M. lenticulatus* y de dos nuevas especies de este género en esa zona de Australia.

## Objetivo General

Verificar si las diferencias en morfología externa corresponden a diferencias genéticas a tal grado que sea pertinente considerar a las mantas del Caribe como una especie diferente.

## Objetivos particulares

Caracterizar los morfotipos presentes en el noreste de la Península de Yucatán mediante patrones de pigmentación (ventral, dorsal y boca) y mediante la presencia, o ausencia; de espina caudal.

Estimar el grado de divergencia entre *M. birostris* y *M. alfredi* mediante la estimación del número de diferencias en las secuencias de las regiones estudiadas y el genoma mitocondrial .

Relacionar la presencia y/o permanencia de las mantas en el área de estudio mediante marcaje satelital, observaciones *in situ* y patrones ambientales (temperatura, salinidad y clorofila A)

## Hipótesis

La evidencia morfológica y genética recientemente presentada ha servido para separar al género *Manta* en dos especies las cuales comparten una misma distribución. Las diferencias en patrones de pigmentación junto con la presencia o ausencia de espina caudal vestigial entre los individuos presentes durante la temporada de arribo de mantas en el Caribe sugieren que la posibilidad de la existencia de una tercera especie es factible tal y como lo han sugerido Marshall y colaboradores (2009) en el Caribe . De ser así esta nueva especie presentara no solo diferencias en morfología externa sino que presentará también diferencias a nivel genético que permitan separarla de las dos especies que existen actualmente.

## Justificación

En la Isla Holbox localizada en el Caribe Mexicano se ha observado una agregación estacional de mantas, catalogadas como *M.birostris*, que no había sido estudiada exhaustivamente a pesar de estar catalogada como especie amenazada por la IUCN y habitar dentro de un área natural protegida (ANP). No fue hasta el 2008 que se realizaron los primeros estudios en esta parte del Caribe que mostraron algunas diferencias morfológicas externas entre los individuos (Hinojosa-Alvarez, 2008). Los recientes estudios realizados por Marshall et al. (2009) sobre morfología y taxonomía del género han sustentado la existencia de una segunda especie del género *Manta* y que parece encontrarse en el Golfo de México , principalmente en Caribe. Por tanto, las diferencias morfológicas observadas entre los individuos de mantas del Caribe permiten suponer que éstas se deben a la presencia de dos especies que comparten el hábitat al menos

durante cierta época del año. De ser así, las labores de conservación y monitoreo que se están llevando a cabo por parte de la ANP deberán considerar la posibilidad de la existencia de diferentes unidades de conservación al tratarse de entidades resultantes de una historia evolutiva independiente. Si bien la morfología puede llegar a mostrar diferencias que definan estas especies, los estudios de caracterización genética aportarían elementos para enriquecer el conocimiento del estado taxonómico de las mantas caribeñas.

#### Área de estudio

Los muestreos se realizaron en el área natural protegida de Yum Balam, en la recién constituida Reserva de la Biosfera del Tiburón Ballena e Isla Contoy pertenecientes a la región de Yalahau. Esta zona se encuentra en los municipios de Lázaro Cárdenas e Isla Mujeres en el Estado de Quintana Roo, e incluye la Laguna de Yalahau, Isla Holbox, Isla Arena, la Laguna de Chacmochuk y las selvas bajas y humedales.

Las mayores precipitaciones ocurren en el norte del municipio en donde alcanzan los 1500 mm anuales. Registra un promedio de temperatura anual de 24.7 °C y el clima es cálido húmedo con lluvias en verano y vientos predominantes del suroeste. El municipio se localiza entre los 21° 36' y 20° 34' Latitud norte y 87° 06' y 87° 25' Longitud oeste (Lazcano, 1999). La Isla Holbox se encuentra en la punta norte de la Península de Yucatán, en el Estado de Quintana Roo, la cual está dentro de los límites de la reserva de la biosfera del tiburón ballena (Fig.9). Al este colinda con Cabo Catoche y la Laguna Yalahau (Sedetur, 2007).

Isla Contoy, la cual se localiza entre los 21°27' y 21°32' N y entre los 86°46' y 86°47' O. Pertenece al estado de Quintana Roo, en el municipio de Isla Mujeres (Fig.9). Es el punto terminal del sistema de arrecifes de la costa oriental de la Península de Yucatán. Predomina la corriente de Yucatán sobre la del Caribe y se presentan surgencias estacionales (Diario Oficial,2004). El aumento de la productividad primaria, como consecuencia de estas surgencias estacionales, trae

consigo una aglomeración de especies marinas filtradoras en el área, las cuales se benefician de este fenómeno.

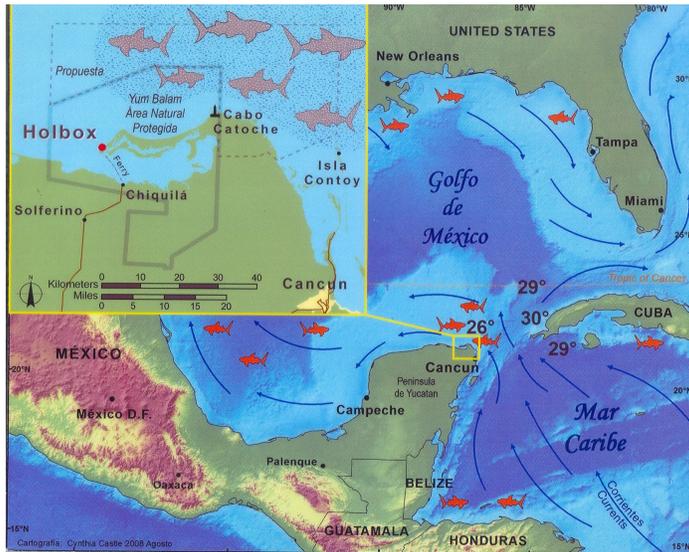


Figura 9. Área de estudio, las flechas en azul reflejan la dirección de la corriente del Caribe y el Golfo. Mientras que los tiburones en rojo representan los lugares donde se encuentran en gran concentración organismos filtradores.

## Material y Métodos

### *Colecta de muestras*

Las muestras para ADN se obtuvieron con un árpon tipo hawaina modificado con una punta de acero inoxidable. Las colectas se llevaron a cabo durante la temporada de manta (mayo a septiembre) del 2010 y 2011. Cada individuo muestreado fue sexado en medida de lo posible y de lo contrario se le asignó la etiqueta NR (no registrado). A su vez, los individuos fueron fotografiados ventral y dorsalmente para su correcta identificación. Cada individuo de manta posee un patrón de pigmentación ventral único lo cual asegura que no hubiera re muestreo.

Las muestras de ADN se almacenaron en tubos Eppendorf con 10 ml de DMSO (sulfóxido de dimetilo) saturado con sal (NaCl).

### *Genética*

El ADN total fue extraído utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Se secuenciaron las siguientes regiones de ADN mitocondrial : (ADNmt) ND5 usando los cebadores reportados por Kashiwagi et al. (2012), COI (Ward et al., 2008, CytB (comunicación personal Dra Jan R McDowell) y el gen nuclear RAG1 (Kashiwagi et al., 2012. Para el D-loop (región de control) se diseñaron dos juegos de cebadores para secuenciar la región completa de aproximadamente 3000 pb; el primero de 1453 pb se amplificó con cebadores Thr-15851-15871F 5'-TCGGTCTTGTAACCGAAGG-3' y CR1-MBR 5'-AAGTCGACTCGAACGTAGGG-3', mientras que el segundo con una longitud total de 1540 pb se amplificó con cebadores CR2-17041\_Mb- F 5'-CCTGTGACGTCGTTTGTCC-3' y 12S-488\_Mb-R 5'-3'-CTGAGTTCCTTGTGGGTGT-3. Se amplificó y secuenció un total de 25 muestras de tejido Manta de Holbox y de 5 ejemplares de *M. birostris* provenientes de las Islas Revillagigedo durante el 2011 para comparación. Las secuencias de cada región de ADNmt, de las mantas de Holbox y *Manta birostris* de las Islas Revillagigedo, se compararon con secuencias de *Manta alfredi* obtenidas de GenBank.

Los mitogenomas de *M. birostris* y Manta de Holbox se secuenciaron a partir de tejido muscular al cual se le extrajo ADN con el kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification (Promega). La secuenciación se llevo a cabo en una plataforma Illumina My Seq . El resultado de la secuenciación fueron dos archivos para cada especie en ambos sentidos ( pair ended) en formato fastq.

Posteriormente estos archivos se sometieron a un programa de control de calidad FastQC, para determinar si los resultados obtenidos de la secuenciación eran óptimos para proceder al ensamblaje. El ensamblaje de los mitogenomas se realizó con el programa SOAP para *M. birostris* y con GENIOUS para la Manta de Holbox. Se utilizaron dos programas diferentes debido a la capacidad de cómputo que se requería para poder correr cada programa. Una vez ensamblados los genomas se anotaron con el programa DOGMA, para la obtención de cada gen y RNAs de transferencia.

### *Telemetría*

Se marcaron 3 mantas de Holbox con marcas satelitales (PAT) al final de la temporada de surgencia en septiembre de 2011 utilizando X-Tags (Microwave Telemetry, MD). Las marcas se programaron para registrar las mediciones de parámetros físicos: temperatura, salinidad, profundidad y geolocalización. Las marcas se fijaron en las mantas con un arpón tipo hawaina con una punta en forma de flecha de acero inoxidable. Las marcas se insertaron en la superficie dorsal cerca de la aleta caudal. La marca PAT permaneció adherida a las mantas de tres a seis meses al final de los cuales, la marca se programó para separarse del animal y flotar a la superficie. Una vez en la superficie, la marca emitió su ubicación a un satélite de Argos.

### *Parámetros ambientales*

Se descargaron los mapas de clorofila A correspondientes a la temporada de manta (mayo a septiembre) en 2010 y 2011 del sitio web de la NOAA. Se seleccionó el satélite Aqua –Modis ya que fue el que brindó mejor resolución. La temperatura, salinidad y concentración de oxígeno disuelto se tomaron con la ayuda de una sonda oceanográfica (CTD) en las áreas donde se observaba a las mantas alimentándose.

### *Censos aéreos*

Se realizaron dos censos aéreos durante la temporada del 2010. Cada viaje conto con dos observadores localizados a ambos lados de la avioneta . Cada observador anoto en una bitácora la localización de las mantas , así como el número de individuos. Durante los dos censos aéreos los observadores fueron los mismos.

### *Análisis de Datos*

Las fotografías de cada individuo de manta fueron analizadas con el software Individual Identification System (I3S) (Pierce, 2007). Cada fotografía permitió asignar un patron de coloración por individuo. Se realizó un conteo de machos y hembras durante la temporada de manta que se representaron en histogramas los cuales se obtuvieron con el programa Excel de Office Mac (2009).

Las secuencias de ADN fueron editados con el software 4Peaks y alineados con MUSCLE (Edgar, 2004). El modelo evolutivo fue seleccionada utilizando jModelTest 2.0 (Darriba et al. 2012) y los árboles filogenéticos se construyeron utilizando PhyML, bajo un modelo de máxima verosimilitud (Guidon et al., 2010).

La compañía Argos proporciono los mapas de las marcas satelitales los cuales fueron elaborados con base en la información recibida por los satélites cada vez que el individuo marcado salía a superficie. Una vez que esta señal es recibida por el satélite esta se transfiere a una estación terrestre y de ahí al centro de procesamiento de Argos donde calculan la posición de las marcas satelitales ([www.argos-systems.org](http://www.argos-systems.org))

## Resultados

### 1. Ecología y biología de la manta gigante del Caribe Mexicano

La abundancia de mantas en Isla Holbox registrada en los viajes de campo, al igual que el número de hembras y machos ( 17 ♂ y 64 ♀ ), está representado en la figura 10. Agosto fue el mes en el que se observó una mayor cantidad de mantas alimentándose en la zona. Durante este mes y en la temporada de 2010 la temperatura media del mar fue de 23,8 ° C, el oxígeno disuelto fue mayor que en otros meses 8.01mg / L y la salinidad de 35. Para el 2011 la media fue de 24.3 °C, 5.45 mg/L de oxígeno disuelto y una salinidad de 35. 9.

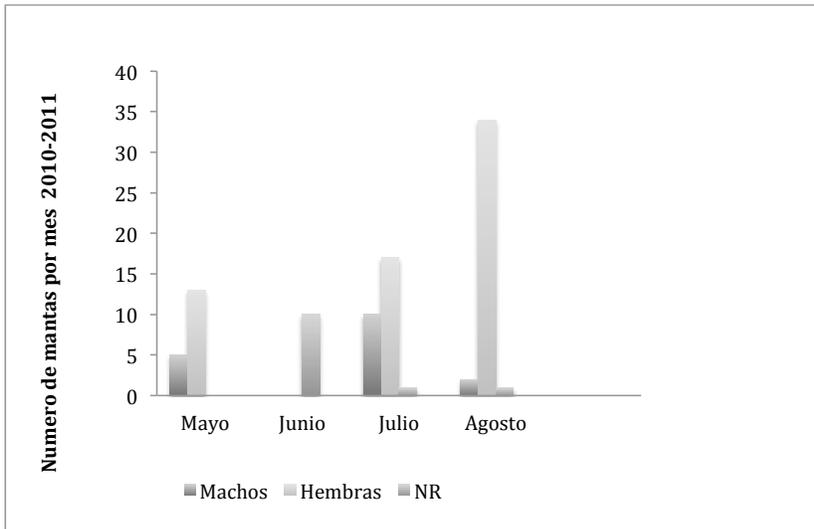


Figura 10, Abundancia de mantas durante la temporada de Manta en 2010 y 2011. NR= No registrado.

Las mantas se mueven alrededor de la reserva en busca de altas concentraciones de plancton. Este comportamiento de forrajeo se confirmó por reconocimientos aéreos y los mapas de concentración de clorofila A (Chl-A). En Figura 11 se muestra la agregación de las mantas durante la "temporada de manta". Durante los dos primeros meses (abril y mayo) están cerca de la costa mientras que

durante julio y agosto de 2010 debido a la alta concentración de nutrientes en alta mar las mantas se alejaron de la costa. Esto no se observó en el 2011 ya que las mantas se quedaron en NE de Isla Contoy siguiendo una vez más las altas concentraciones de Chl-A. A lo largo del estudio se comprobó la relación entre las concentraciones de Chl-A y la presencia de mantas (Figs.11 y 12).

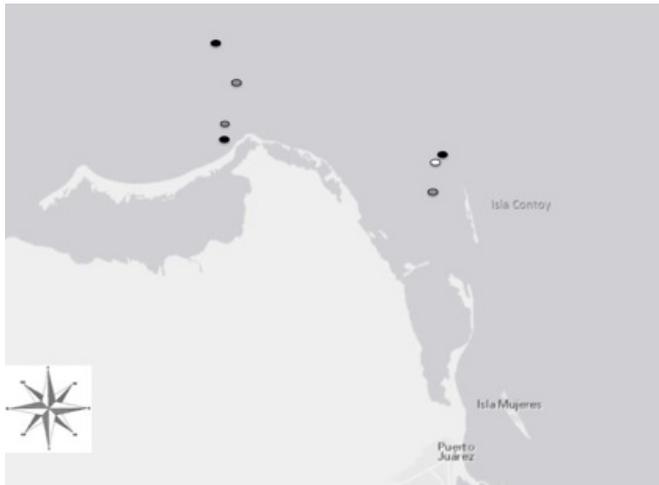
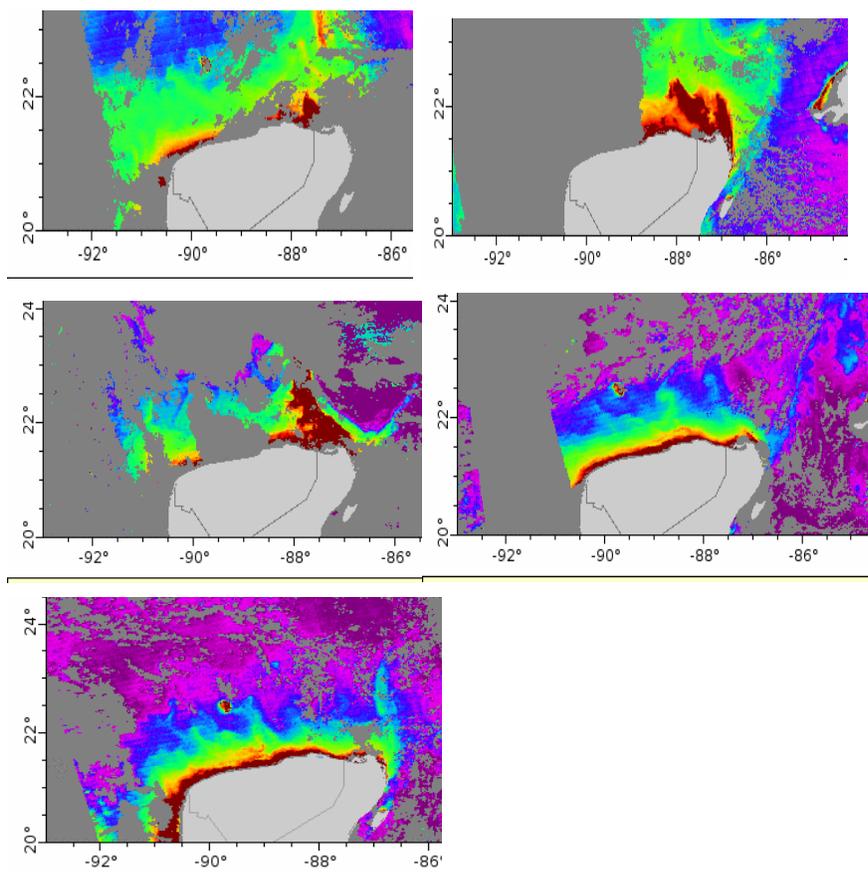
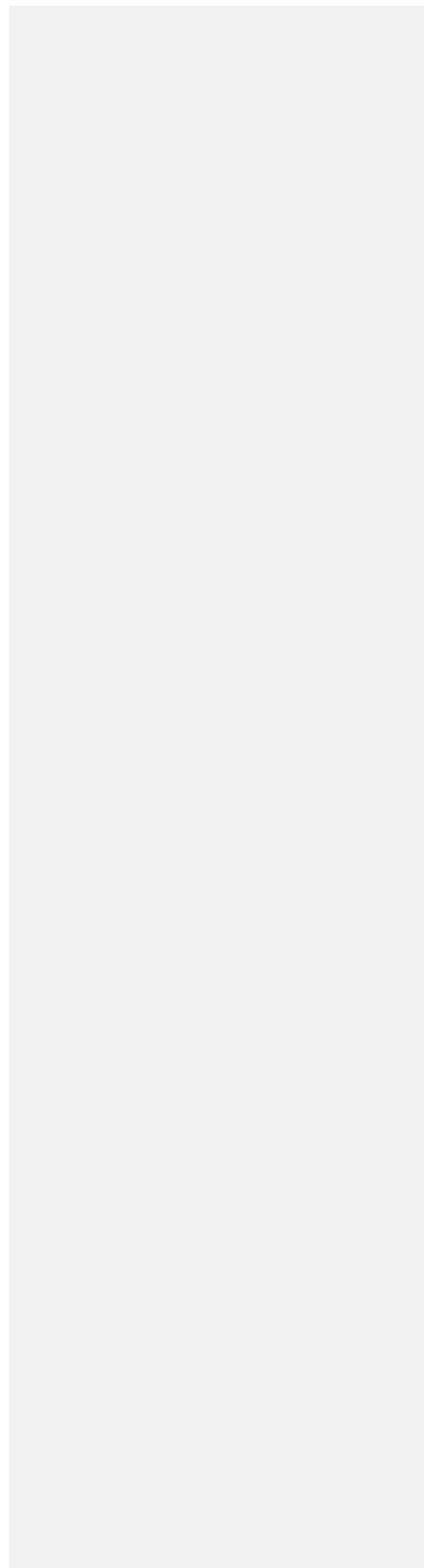


Figura 11 Sitios de agregación de Manta. Los puntos grises representan la ubicación de las mantas en 2011, puntos negros en el 2010 y los puntos blancos los censos aéreos en el 2010.

A)



B)



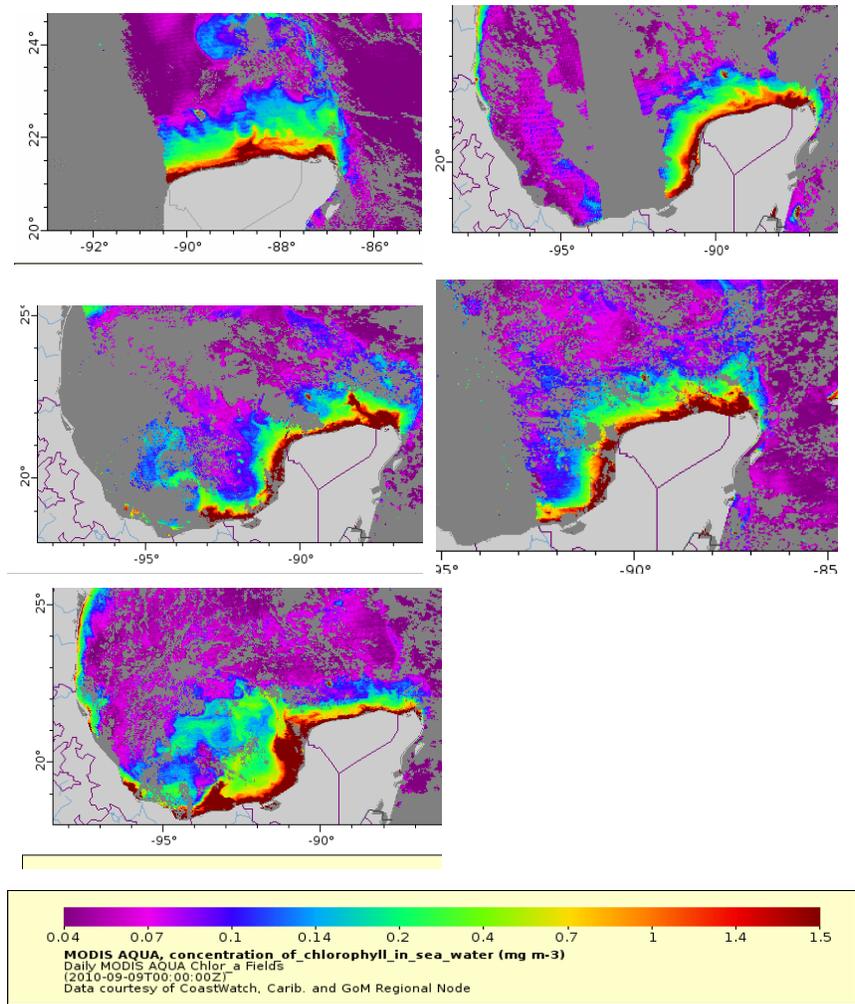


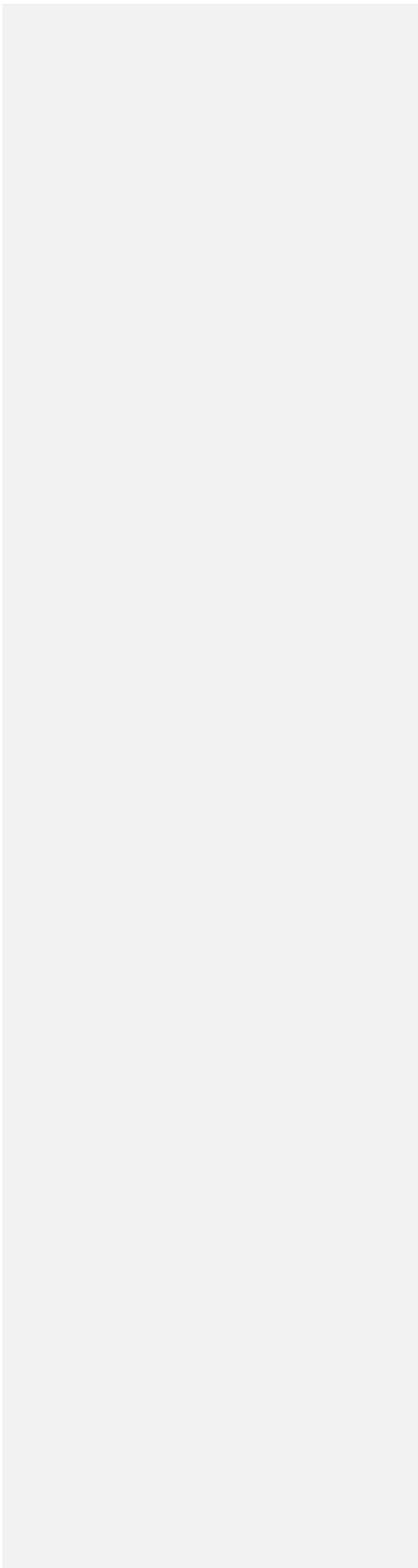
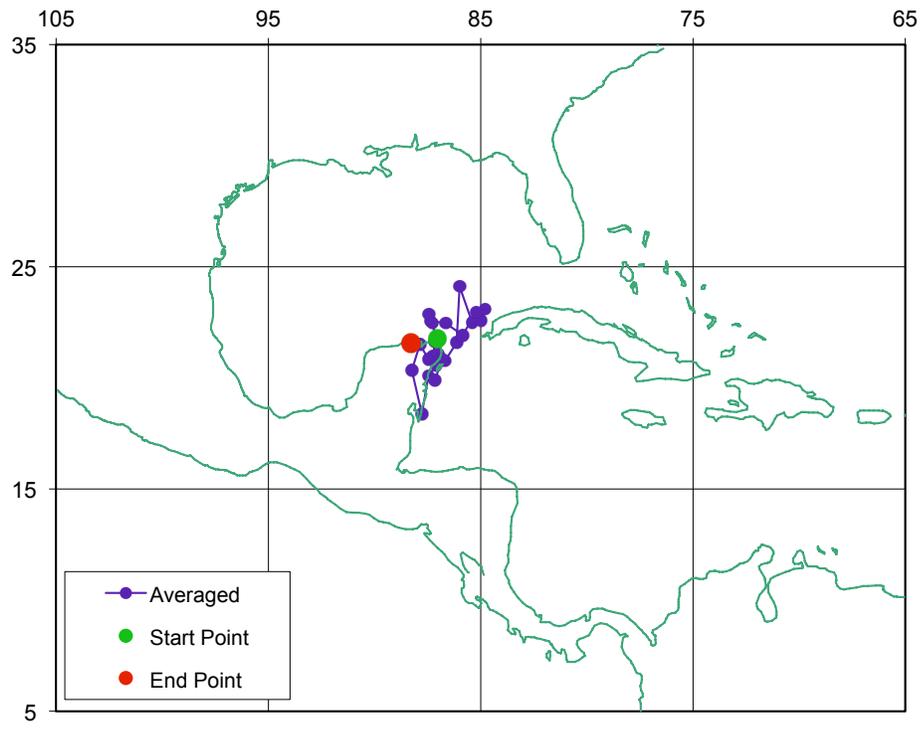
Figura 12. Distribución estacional mensual de Chl-a durante la “temporada de manta” 2010 (A) y 2011(B) Satélite: Modis-Aqua (NOAA).

## Telemetría

Las marcas satelitales que se utilizaron para realizar un seguimiento de los individuos mostraron que las mantas tienden a permanecer cerca de la zona de estudio. Las marcas a y b (figura 13) registraron un periodo de 25 días y 1 mes, respectivamente, y ambos llegaron hasta Isla Mujeres en Quintana Roo. La marca c (figura 13) permaneció 3 meses y se mantuvo la mayor parte del tiempo cerca de la zona de estudio y al final, nadó hasta la costa de EUA. Las marcas no pudieron ser recuperadas después de desprenderse de los individuos marcados.

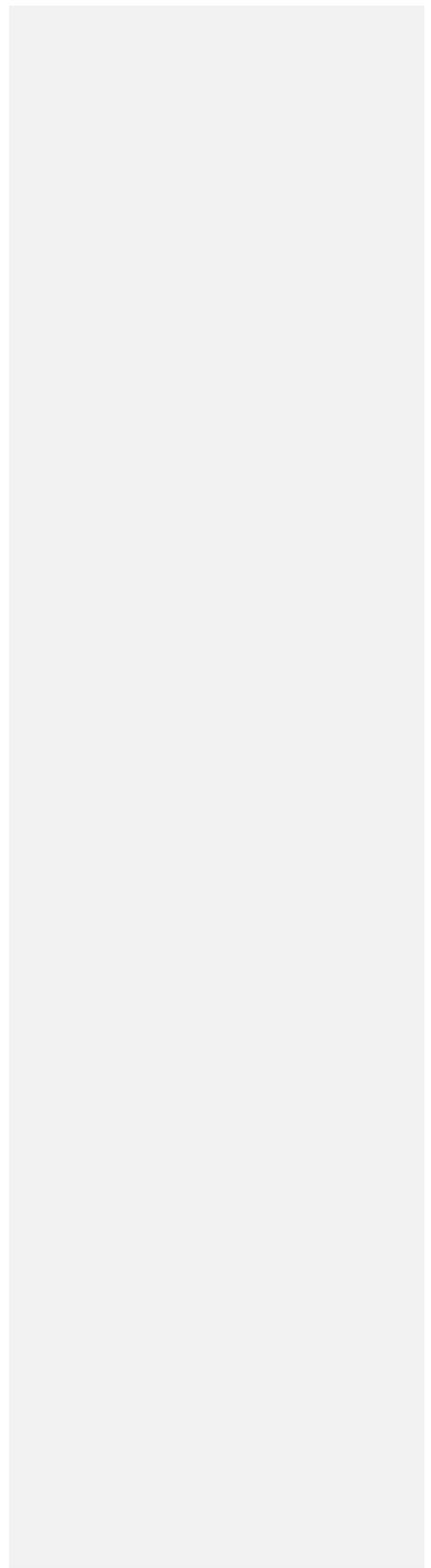
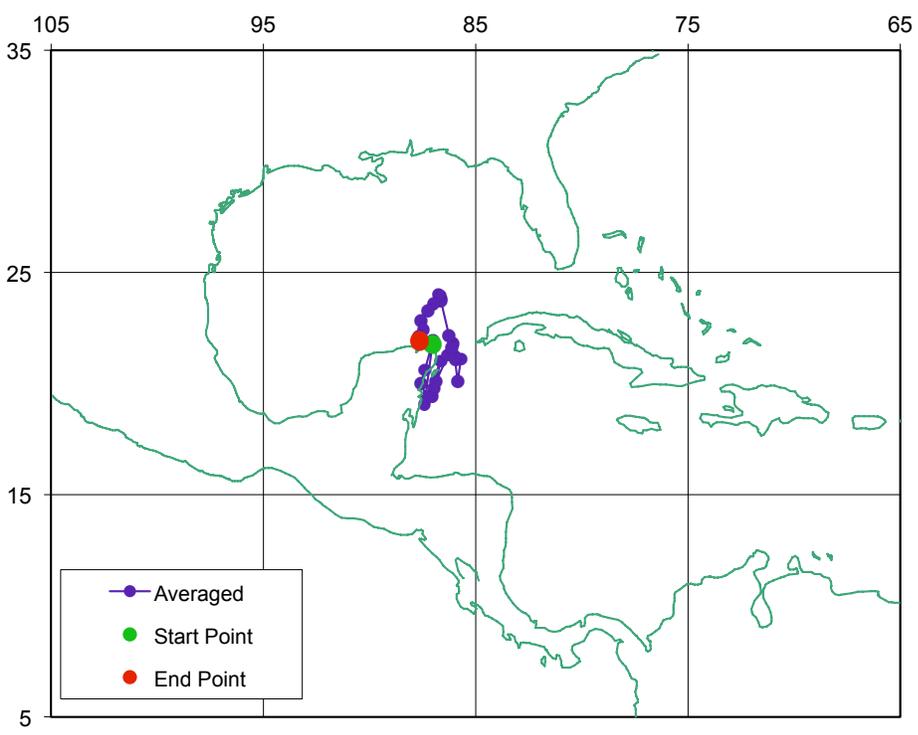
a)

**A1**



b)

**A2**



c)

**A3**

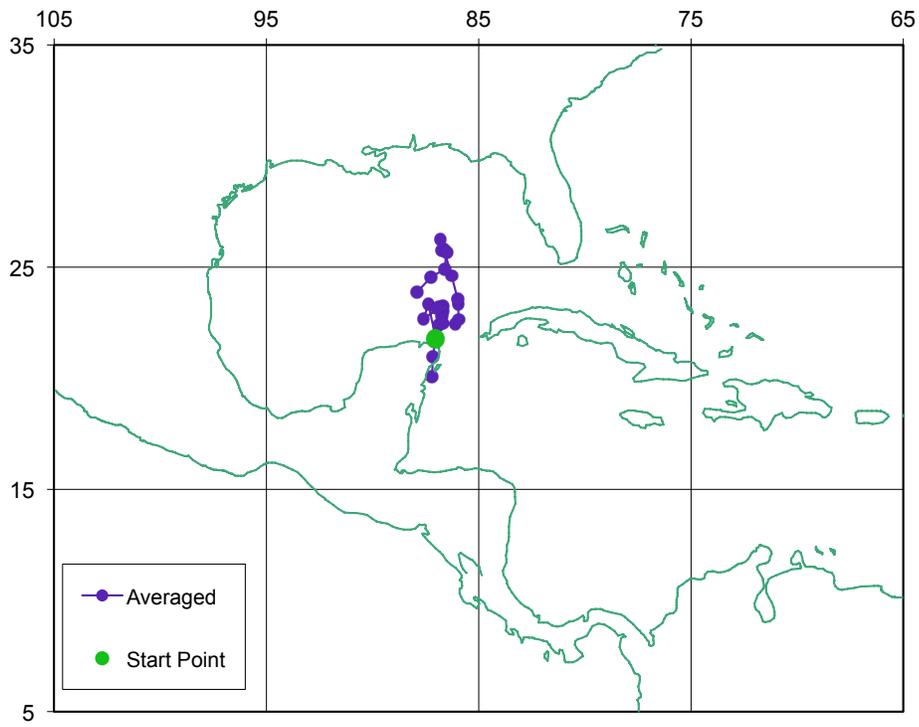


Figura 13 Movimientos de tres (A1,A2 y A3) individuos de manta gigante

## 2. Diferenciación morfológica

Se foto-identificó un total de 85 individuos y se encontraron dos morfotipos distintivos. El primero llamado "A" tiene boca negra y muestra, la presencia de una espina caudal coloración dorsal de color marrón oscuro y patrones triangulares de color crema. La superficie ventral es de color crema a blanco, sin manchas en la quinta hendidura branquial y la coloración ventral es casi negra. (Figura 14). El morfotipo "B" tiene boca blanca, superficie dorsal negra, la presencia de una espina caudal vestigial y los parches de hombro blancos eran triangulares en algunos individuos y en forma de "V". otros. La superficie ventral es de color crema a blanco, sin manchas en la quinta hendidura branquial y la coloración es clara a gris oscuro (Figura 15).

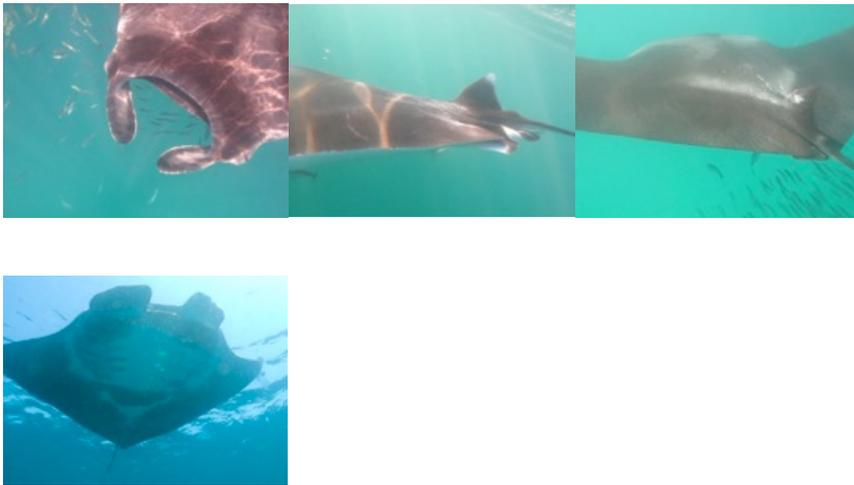


Figura 14. Morfotipo "A", vista de la boca, espina dorsal, vista trasera y ventral  
Fotografía: Andrea Marshall



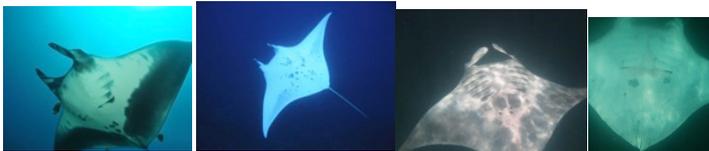
Figura 15 Morfotipo "B" vista dorsal, ventral y boca

En la figura 16 a se observa las diferencias entre las dos especies descritas actualmente y los dos morfotipos de Holbox. En la coloración ventral (Fig.16 b) el morfotipo "B" presenta dos patrones de coloración uno casi completamente blanco y otro con la distintiva marca de "V" en color gris palido. Mientras que el morfotipo "A" presenta una marca en "V" mucho mas ancha que casi cubre la totalidad de la superficie ventral y de color negro. Tanto los morfotipos de Holbox como de la especie *M. birostris* presentan espina caudal (Fig. 16 c)

a) *M.birostris*    *M.alfredi*    Morfotipos: A    B



b) *M.birostris*    *M.alfredi*    Morfotipos: A    B



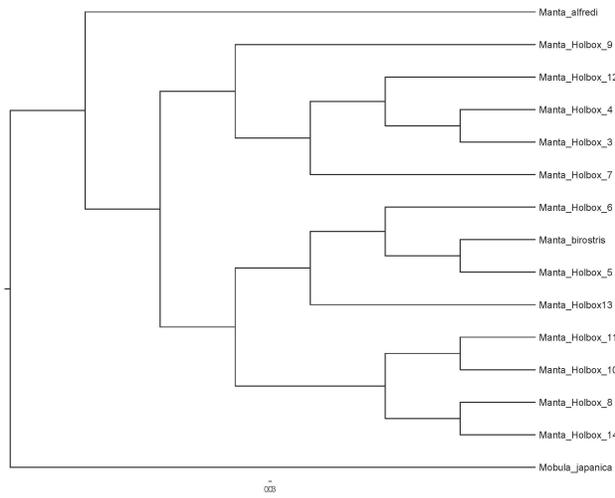
c) *M. birostris* y Morfotipos



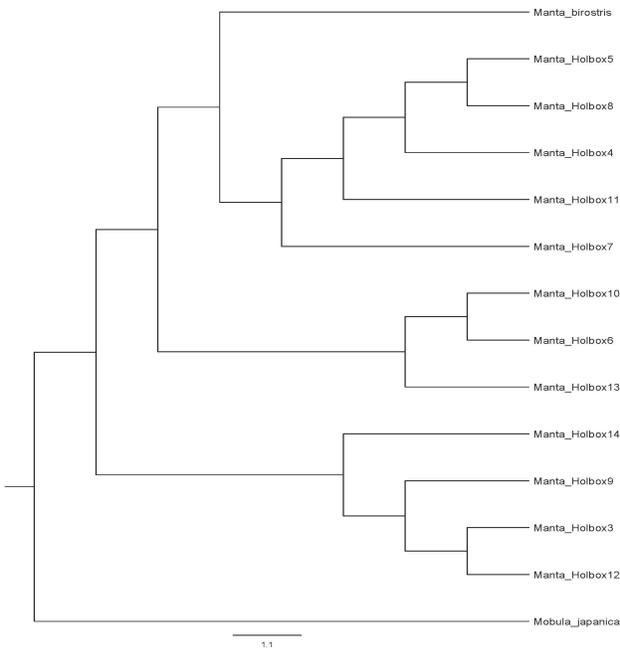
Figura 16. (a) Diferencias dorsales de *M. alfredi*, *M. birostris* y los morfotipos de manta de Holbox; (b) Diferencias ventrales de *M. alfredi*, *M. birostris* y los morfotipos de manta de Holbox y (c) espina caudal vestigial .Fotografías de *M. birostris* cortesía de M. Hoyos y fotografías de *M. alfredi* cortesía de M. Deakos.

### 3. Análisis filogenético

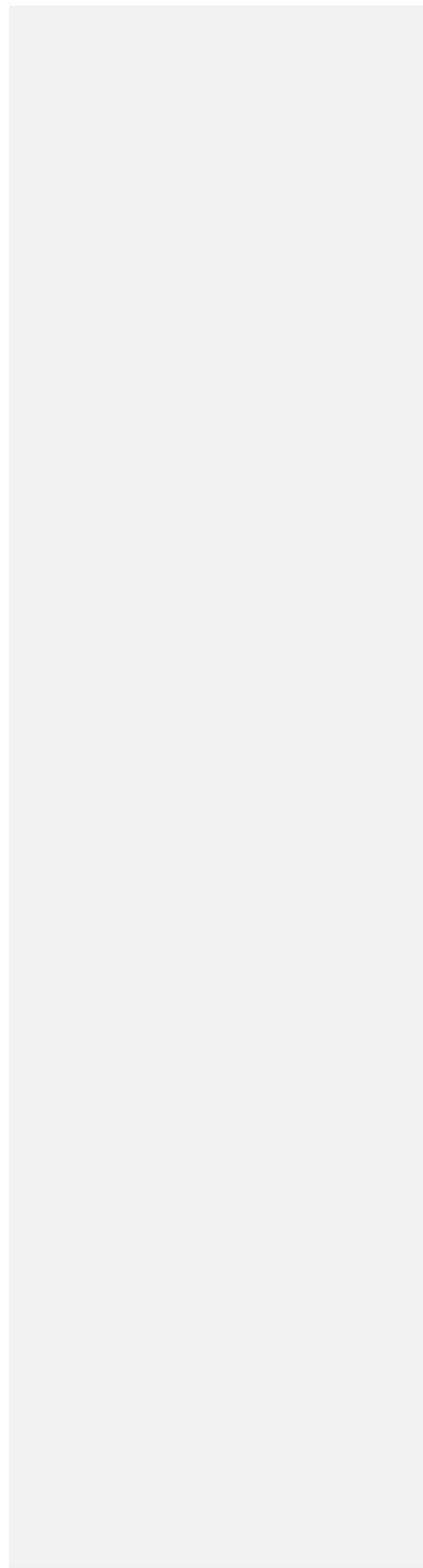
En la figura (17) se muestran los cladogramas resultantes del análisis de 4 genes mitocondriales comúnmente utilizados en inferencias filogenéticas y 1 gen nuclear que se ha utilizado previamente para separar las especies de *Manta* (Kashiwagi et al., 2012). Los 4 genes mitocondriales cuando se utilizan de manera independiente no permiten la definición de los árboles filogenéticos, aunque separaran las mantas de Holbox de *Manta alfredi* y del grupo externo *Mobula japonica*, pero no de *Manta birostris*. Por su parte el árbol con el gen nuclear RAG1 sí separa los morfotipos de Holbox tanto de *M. alfredi* como de *M. birostris*.

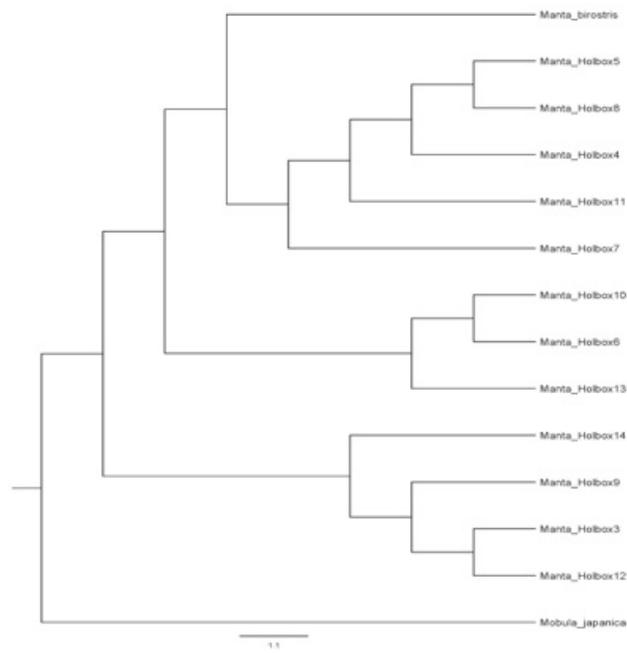


COI

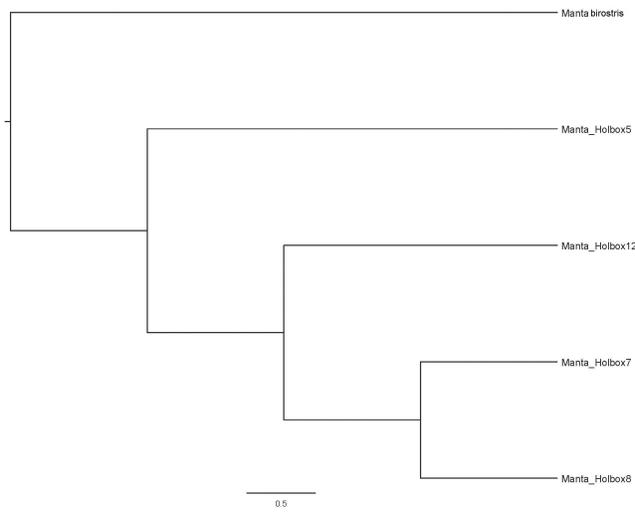


ND5





CYTB

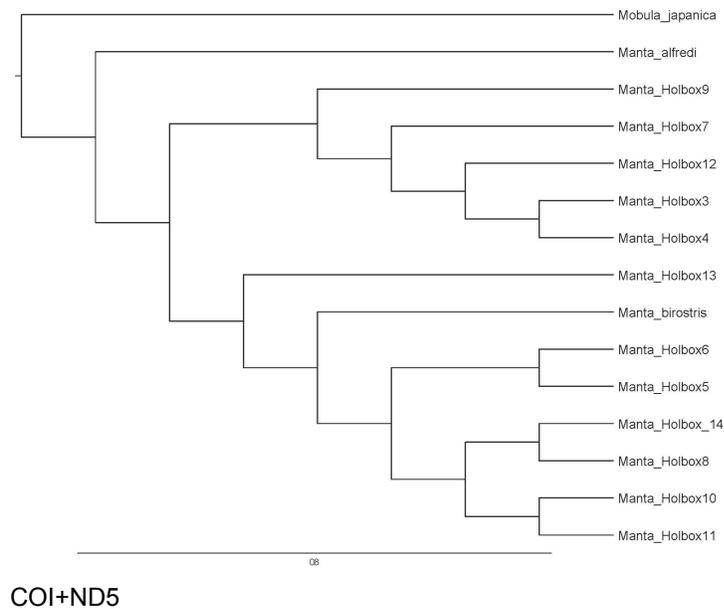


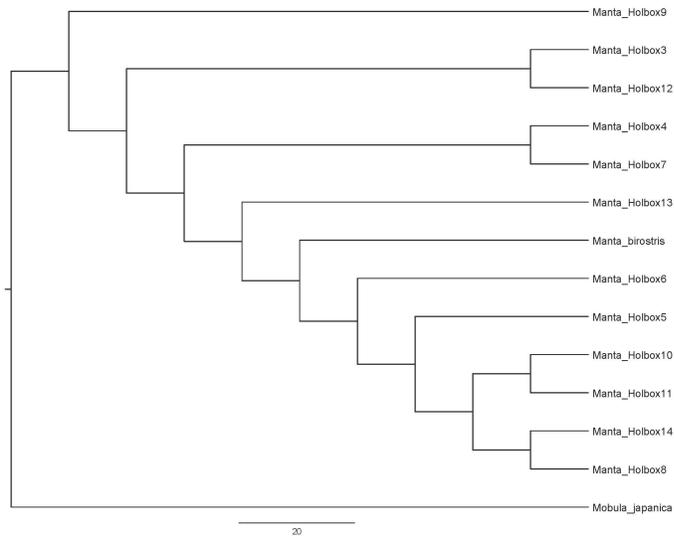
RAG1

Figura 17. Árboles filogenéticos de genes mitocondriales y nucleares.

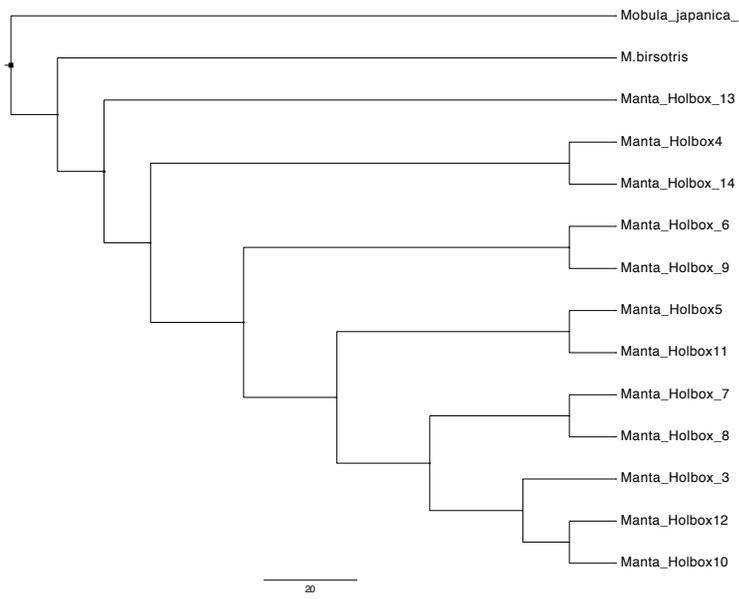
A pesar de que RAG1 separa a las mantas de Holbox de *M. birostris*, el fragmento reportado en Gen Bank para *M. alfredi* y *M. japanica* no es el mismo. De esta forma, se decidió incorporar más genes para corroborar esta separación como ha sido propuesto por varios autores (Arnason et al 2004, 2008; Xiong et al 2009, Morin et al, 2010). Cuando los genes mitocondriales se concatenaron se observó que los árboles filogenéticos tenían una mejor resolución, especialmente cuando se incorporan los genes **dloop**, con cytB, ND5 y COI (Fig19). Este último árbol separa el grupo externo, *M. birostris* y al resto de los individuos de manta Holbox (Fig.19).

Usuario 23/9/2014 11:21  
**Comentario [1]:** Porque no hay un árbol solo con Dloop, explícalo.

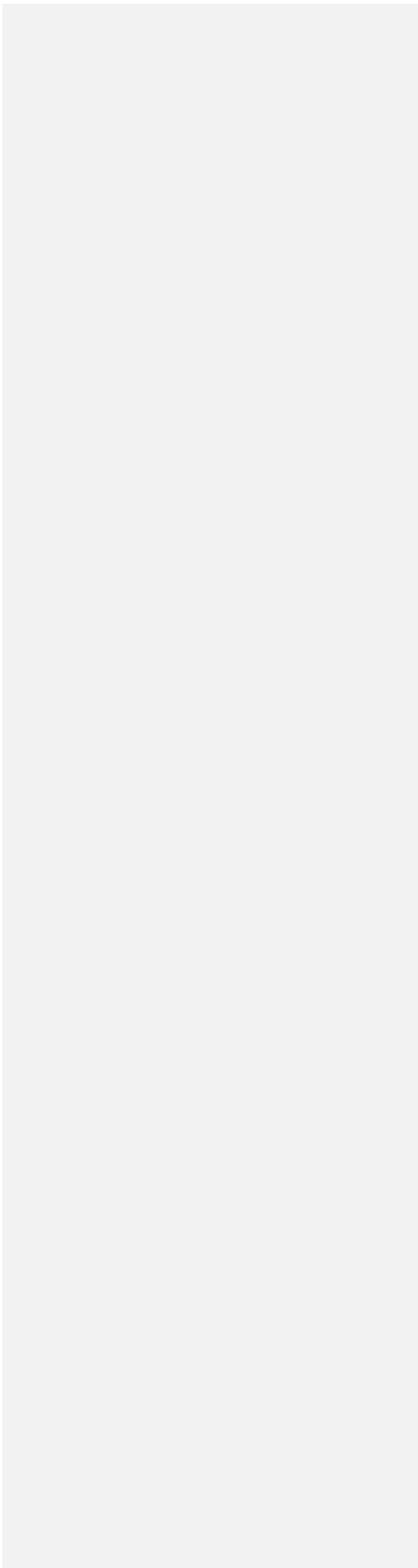


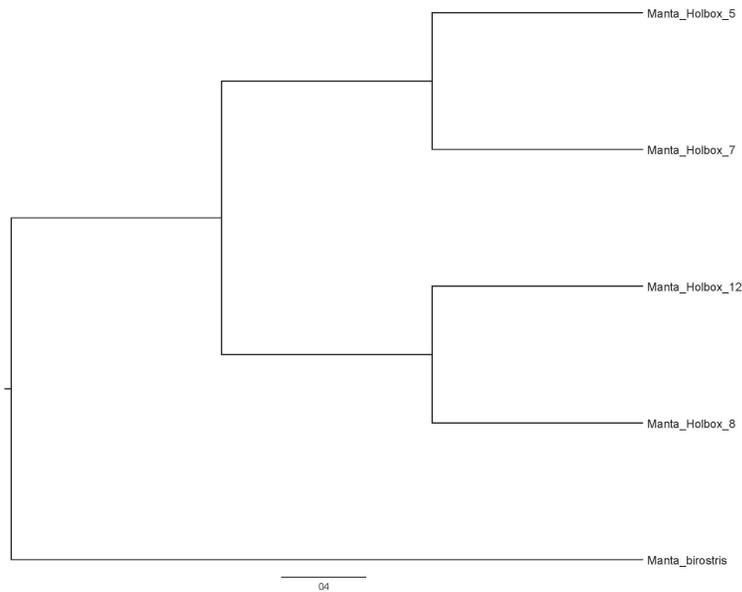


COI+ND5+CYTB



COI+ND5+CYTB+D-LOOP





COI+ND5+CYTB+D-LOOP+RAG1

Figura 18. Árboles filogenéticos concatenados de genes mitocondriales y nuclear

El número de diferencias nucleotídicas entre la manta de Holbox y *M. birostris* es bajo en comparación con las otras especies de tiburones y rayas principalmente en el gen ND5. Esta diferencias, sin embargo, son mayores en la región de control (d-loop), pero el análisis de CytB y COI muestra diferencias similares a la registrada para la región de control. Las diferencias de RAG1 son similares en promedio entre todos los grupos.

Tabla 1. Numero de diferencias nucleotídicas entre ADNmt y ADNn de varias especies de elasmobranquios

ND5/D-LOOP	<i>M. birostris</i>	<i>M. alfredi</i>	<i>Manta Holbox</i>	<i>M. japonica</i>	<i>C. leucas</i>
<i>M. birostris</i>	-				
<i>M. alfredi</i>	0.00708/ no	-			
<i>Holbox manta</i>	0.00089/ 0.61262	0.07877/no	-		
<i>M. japonica</i>	0.20106/0.5058	0.19841/no	0.74206/0.67907	-	
<i>C. leucas</i>	0.74286/0.69700	0.70179/no	0.74375/0.68574	0.70625/0.70075	-
<i>M. manazo</i>	0.734820/0.71482	0.71339/no	0.735710/0.70544	0.71339/0.73358	0.13304/0.69325
<b>Cytb/COI</b>					
<i>M. birostris</i>	-				
<i>M. alfredi</i>	NO/0.71298	-			
<i>Manta holbox.</i>	0.15595/0.60003	no/ 0.74679	-		
<i>M. japonica</i>	0.72784/0.71291	no/0.70520	0.72446/ 0.73796	-	
<i>C. leucas</i>	0.72174/0.71676	no/0.70328	0.71739/0.70135	0.23043/0.73603	-
<i>M. manazo</i>	0.73913/0.71291	no/0.71291	0.72174/0.70135	0.22391/0.18690	0.76087/0.11368
<b>RAG</b>					
<i>M. birostris</i>	-				
<i>M. alfredi</i>	no	-			
<i>Manta holbox</i>	0.7436	no	-		
<i>M. japonica</i>	0.721917	no	no	-	
<i>C. leucas</i>	0.24583	no	0.72361	0.74028	-
<i>M. manazo</i>	0.74444	no	0.725	0.72083	0.73056
<b>Mitochondrial and nuclear</b>					
<i>M. birostris</i>	-				
<i>M. alfredi</i>	no	-			
<i>Manta holbox</i>	0.35187	no	-		
<i>M. japonica</i>	0.7323	no	0.72098	-	
<i>C. leucas</i>	0.71892	no	0.71351	0.58533	-
<i>M. manazo</i>	0.7251	no	0.71918	0.59202	0.395511
<b>Mitochondrial</b>					
<i>M. birostris</i>	-				
<i>M. alfredi</i>	no	-			
<i>Manta holbox</i>	0.43191	no	-		
<i>M. japonica</i>	0.4563	no	0.4602	-	
<i>C. leucas</i>	0.72006	no	0.71343	0.54976	-
<i>M.manazo</i>	0.72512	no	0.71785	56272	0.3188
<b>ND5/D-LOOP</b>					
<i>M. birostris</i>	-				
<i>M. alfredi</i>	0.00708/ no	-			
<i>Manta holbox</i>	0.00089/ 0.61262	0.07877/no	-		
<i>M. japonica</i>	0.20106/0.5058	0.19841/no	0.74206/ 0.67907	-	

<i>C. leucas</i>	0.74286/0.69700	0.70179/no	0.74375/ 0.68574	0.70625/0.70075	-
<i>M. manazo</i>	0.734820/0.71482	0.71339/no	0.735710 /0.70544	0.71339/0.73358	0.13304/0.69325
<b>Cytb/COI</b>					
<i>M. birostris</i>	-				
<i>M. alfredi</i>	NO/0.71298	-			
<i>Manta holbox</i>	0.15595/0.60003	no/ 0.74679	-		
<i>M. japonica</i>	0.72784/0.71291	no/0.70520	0.72446/ 0.73796	-	
<i>C. leucas</i>	0.72174/0.71676	no/0.70328	0.71739/ 0.70135	0.23043/0.73603	-
<i>M. manazo</i>	0.73913/0.71291	no/0.71291	0.72174/ 0.70135	0.22391/0.18690	0.76087/0.11368
<b>RAG</b>					
<i>M. birostris</i>	-				
<i>M. alfredi</i>	no	-			
<i>Manta holbox</i>	0.7436	no	-		
<i>M. japonica</i>	0.721917	no	no	-	
<i>C. leucas</i>	0.24583	no	0.72361	0.74028	-
<i>M. manazo</i>	0.74444	no	0.725	0.72083	0.73056
<b>Mitochondrial y nuclear</b>					
<i>M. birostris</i>	-				
<i>M. alfredi</i>	no	-			
<i>Manta holbox</i>	0.35187	no	-		
<i>M. japonica</i>	0.7323	no	0.72098	-	
<i>C. leucas</i>	0.71892	no	0.71351	0.58533	-
<i>M. manazo</i>	0.7251	no	0.71918	0.59202	0.395511
<b>Mitochondrial</b>					
<i>M. birostris</i>	-				
<i>M. alfredi</i>	no	-			
<i>Manta holbox</i>	0.43191	no	-		
<i>M. japonica</i>	0.4563	no	0.4602	-	
<i>C. leucas</i>	0.72006	no	0.71343	0.54976	-
<i>M. manazo</i>	0.72512	no	0.71785	56272	0.3188

#### 4. Mitogenoma de la manta gigante (*M. birostris*) y manta de Holbox (*Manta sp.*).

El genoma mitocondrial de *M. birostris* tiene una longitud de 18,075 pares de bases (Tabla 2), mientras que el de la manta de Holbox tiene 18 383 pares de bases (Tabla 3). Ambos presentan una región rica de Adenina (A)+Timina(T) y bajo contenido de guanina (G). El orden de los genes y su longitud es similar a la mayoría de otros elasmobranquios y teleósteos. Tiene 13 genes codificantes para proteínas, 2 genes de RNA ribosomal (rRNAs) , 23 genes de RNA de transferencia (tRNAs) y una región no codificante (región control o d-loop). El mitogenoma presenta también una región AT en tándem, que se ha reportado también en *Mobula japonica*. El tamaño de los RNA de transferencia (tRNA) es de 70-72 bp (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Genoma mitocondrial de *Manta birostris*

Nombre del Gen	Inicio	Fin	Hebra	Longitud (bp)
tRNA-Phe	264	333	+	69
12srRNA	336	1290	+	954
tRNA-Val	1297	1368	+	71
16SrRNA	1441	3038	+	1597
tRNA-Gln	1755	1830	-	75
tRNA-Leu	3068	3142	+	74
ND1	3144	4115	+	971
tRNA-Ile	4120	4189	+	69
tRNA-Gln	4192	4263	-	71

tRNA-Met	4264	4332	+	68
ND2	4333	5373	+	1040
tRNA-Gly	4852	4921	-	69
tRNA-Ser	5377	5448	-	71
tRNA-Trp	5379	5448	+	69
tRNA-Ala	5450	5518	-	68
tRNA-Asn	5520	5592	-	72
tRNA-Cys	5627	5694	-	67
tRNA-Tyr	5699	5768	-	69
COX1	5770	7317	+	1547
tRNA-Lys	7331	7401	-	70
tRNA-Asp	7402	7471	+	69
COX2	7474	8163	+	689
tRNA-Thr	8165	8239	+	74
ATP8	8241	8402	+	161
ATP6	8399	9079	+	680
COX3	9082	9864	+	782
tRNALeu	9871	9944	-	73
tRNAGly	9873	9944	+	71
NAD3	9945	10292	+	347
tRNA-Arg	10294	10364	+	70
NAD4L	10365	10658	+	293
NAD4	10655	12031	+	1376
tRNA-Val	12035	12103	-	68
tRNA-His	12036	12104	+	68
tRNA-Ser	12106	12173	+	67
tRNALeu	12175	12246	+	71
NAD5	12248	14086	+	1838
NAD6	14089	14607	-	518
tRNA-Glu	14608	14676	-	68
cytB	14680	15819	+	1139
tRNAThr	15826	15898	+	72
tRNA-Pro	15903	15973	-	70
D-loop	15975	18075		2100

---

Tabla 3. Genoma mitocondrial de la manta de Holbox.

Nombre del Gen	Inicio	Fin	Hebra	Longitud (bp)
tRNA-Val	1026	1097	-	71
16SrRNA	1098	2674	-	1576
tRNA-Gln	2328	2403	+	75
tRNA-Leu	2697	2771	-	74
ND1	2772	3743	-	971
tRNA-Ile	3744	3815	+	71
tRNA-Gln	3816	3884	-	68
ND2	3885	4925	-	1040
tRNA-Gly	4337	4406	+	69
tRNA-Ser	4926	4997	+	71
tRNA-Trp	4998	5066	+	68
tRNA-Ala	5067	5139	+	72
tRNA-Asn	5140	5207	+	67
tRNA-Cys	5208	5277	+	69
COX1	5278	6825	-	1547
tRNA-Lys	6826	6896	+	70
tRNA-Asp	6897	6966	-	69
COX2	6967	7656	-	689
tRNA-Thr	7659	7733	-	74
ATP8	7731	7895	-	164
ATP6	7896	8576	-	680
COX3	8577	9359	-	782
tRNA <sup>Leu</sup>	9360	9433	+	73
NAD3	9434	9781	-	347
tRNA-Arg	9782	9852	-	70
NAD4L	9853	10146	-	293
NAD4	10147	11523	-	1376
tRNA-Val	11523	11595	+	72
tRNA-His	11524	11592	-	68
tRNA-Ser	11593	11660	-	67
tRNA <sup>Leu</sup>	11661	11732	-	71
NAD5	11733	13571	-	1838
NAD6	13572	14090	+	518
tRNA-Glu	14088	15230	-	1142
cytB	15231	15303	-	72
tRNA <sup>Thr</sup>	15304	15374	+	70
D-loop	15375	18388		3013

El uso de nuevas técnicas de secuenciación masiva permite obtener árboles filogenéticos con una mejor definición y que ayudan a resolver controversias filogenéticas. Como se observa en el árbol filogenético construido con base en los mitogenomas (Fig. 19) la separación entre nodos de la manta de Holbox y de la manta birostris presenta un valor similar al de las rayas del género *Dasyatis* y el resto de los elasmobranquios.

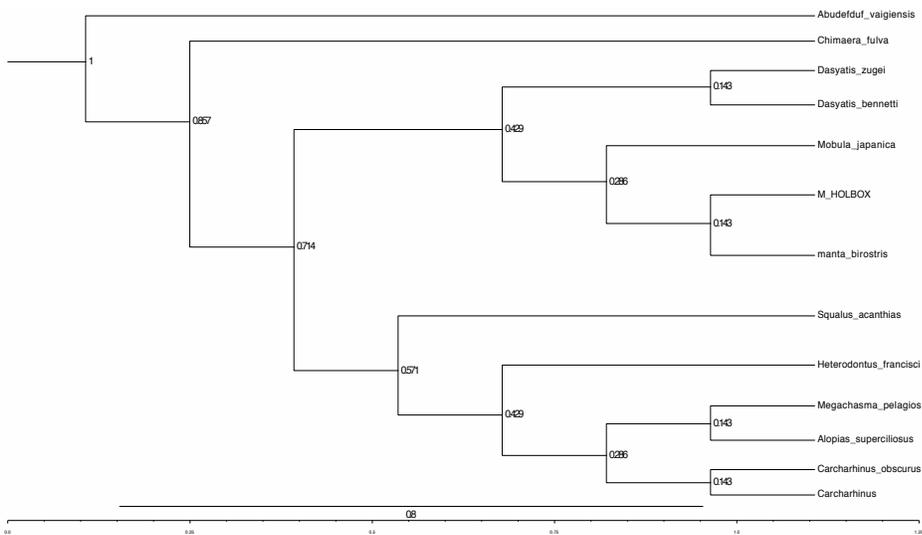


Figura 19. Árbol filogenético de mitogenomas de elasmobranquios

## Discusión

Se sabe que las aguas ricas en nutrientes son las zonas de alimentación principal para los organismos filtradores. Estas zonas suelen presentar altas concentraciones de clorofila-a (Chl-a) y temperaturas mayores a los 23°C. Este aumento en Chl-a, se traduce en una proliferación de productores primarios como el fitoplancton y en consecuencia una alta abundancia de consumidores secundarios tales como zooplancton. La Península de Yucatán es un claro ejemplo de estas condiciones; las concentraciones de Chl-a tienden a ser más altas entre mayo y septiembre que durante el resto del año. Como resultado, los animales filtradores como las mantarrayas tienden a reunirse en gran número en esta área para obtener su principal fuente de alimento, el zooplancton. Este comportamiento se reportó anteriormente en esta región para los tiburones ballena y mantarrayas (Dewar et al, 2008; de la Parra-Venegas et al, 2010 ; Luiz et al, 2009; Anderson et al., 2011; Couturier et al, 2011). En las Islas Maldivas en Indonesia, Anderson y colaboradores 2011 reportan agregaciones de *M. alfredi*, durante la temporada de altas concentraciones de Chl-a las que a su vez son coincidentes con la estación de monzones. En la figuras 11,12 y 13 se muestran los sitios en los que se encuentran las mantarrayas durante la temporada de alta productividad de plancton en Holbox. Esta posición coincide con los valores de temperatura y mapas de Cl-a (Fig.12) que muestran el mismo patrón que las mantas de las Maldivas. Con esta información podemos suponer que se trata de un área de alimentación para esta especie. Sin embargo dada la ausencia de re-avistamientos, no es posible afirmar que existe fidelidad de las mantas a las zonas de alimentación. No obstante, la fidelidad a los sitios de alimentación en otras

especies de manta ya se ha corroborada (Homma et al, 1999; Clark y Laros, 2008; Dewar et. al, 2008). Con las marcas satelitales (figura 13) se observó que los individuos marcados permanecen más tiempo del esperado en la zona de estudio, una vez que la concentración de Chl-a disminuye. Aparentemente lo que nuestras marcas parecen indicar es que, los avistamientos de mantas en la zona de Holbox durante todo el año (observación personal) junto con los estudios de marcaje (Graham et al., 2012), tenemos una población de mantas que permanece una gran parte del año en la Península de Yucatán y algunos individuos que migran siguiendo la corriente del Golfo de México (Graham et al ., 2012). De esta forma, la población de mantarrayas de Holbox podría tener un nicho específico que está siendo delimitado por la Corriente del Golfo y reforzada por las aguas ricas en nutrientes.

La Corriente del Golfo tiene muchas ventajas para los organismos filtradores, como las mantas, la más importante es la alimentación. Los cambios en los valores isotópicos de Carbono y Nitrógeno que se observan en las mantas de Holbox coincide con el afloramiento estacional ya que la señal antes de la surgencia es similar a la presentada en las aguas profundas, consistente con señal de la Corriente del Golfo (Hinojosa-Alvarez, 2008). Además, la señal isotópica de las zoeas de crustáceos y la señal isotópica de las mantas al término de la temporada es similar (Hinojosa-Alvarez, 2008). Con la información isotópica y la coincidencia de la presencia de las mantas con el aumento en la productividad primaria, podemos concluir que tanto Isla Holbox como Isla Contoy representan áreas de alimentación primaria de la manta de Holbox.

Existe información que muestra que las mantas no solo utilizarían estas áreas para alimentarse, sino podrían ser también sitios de reproducción. La proporción de sexos en las mantas de Holbox es (Fig.10) similar (mayor cantidad de hembras que machos 16:1) a la reportada en Mozambique; donde las hembras son más numerosas que los machos (Marshall et al., 2010) y donde han sido registrados eventos de apareamientos. Por otra parte Homma et al. (1999) registraron una proporción de sexos de 1:1 para *M. alfredi* en Japón. Se han encontrado estas

diferencias en muchas especies de elasmobranquios (Anderson y Pyle 2003). Los tiburones ballena (*Rhincodon typus*), mostraron una proporción sesgada hacia los machos en varios sitios de agregación (Meekan et al., 2006; Graham ,2007), mientras que los tiburones nodriza (*G. cirratum*) y tiburones nodriza gris (*C. taurus*) en contraste, mostraron un fuerte sesgo hacia las hembras (Castro y Rosa 2005; Bansemer y Bennett 2009).

Sin embargo, una proporción de sexos en la cual las hembras son más abundantes que los machos podría ser indicativo de un sitio de reproducción según Marshall y Bennett (2011). En soporte a esta hipótesis, en la península de Yucatán además de la proporción de sexos encontrada, se observaron conductas de apareamiento durante febrero y mayo, cerca de la costa. Por lo anterior , es muy posible que la zona de Isla Holbox e Isla Contoy formen parte del área de reproducción para las mantas.

### *Morfología*

Las mantas de Holbox presentan al igual que *M. birostris* una espina caudal reminiscente. Ambos morfotipos presentan coloración alrededor de la boca que puede variar entre blanco similar a la de *M. alfredi*, y negro similar a la de *M. birostris*. Asimismo, las mantas de Holbox comparten con ambas especies los patrones de coloración dorsal, es decir, presentan marcas blancas tanto triangulares como en forma de cola de ballena (Figuras 14, 15 y 16 a,b y c). Adicionalmente carecen de marcas en forma de puntos entre la quinta y sexta hendidura branquial, igual que *M. birostris*. A diferencia de *M. birostris* las mantas de Holbox no siempre presentan en la superficie ventral una coloración de gris a gris oscuro en forma de "V" (Fig.16b) y en su lugar pueden no presentarla y aparecer completamente blanca. Algo característico de las mantas de Holbox es que en el centro de la parte ventral por debajo de las hendiduras branquiales presentan dos puntos que van de negro a gris ó una gran mancha negra o gris (Figuras 14,15 y 16b). Anteriormente, la mayoría de los estudios determinaron

especies utilizando exclusivamente sus diferencias morfológicas (Marshall et al., 2009). Sin embargo, con la aparición y el uso generalizado de herramientas genéticas, en algunos casos se ha encontrado que las diferencias entre estas supuestas especies no son reales, si no que en realidad son poblaciones de la misma especie con cierto grado de plasticidad fenotípica.

Marshall et al., 2009 en su revisión del género *Manta* menciona una especie que queda aún por determinar y a la que se refiere como *Manta sp cf. birostris* y cuya sinonimia recibía el nombre de *Cephalopterus giorna*. A esta especie se le denominaba comúnmente como manta del Atlántico o manta del Caribe y es muy similar a la especie *M. birostris*. La superficie dorsal suele ser negra, aunque llega a tomar coloraciones rojizas como las que observamos en la figuras 14 y 16a.

Debido a la posible existencia de la tercera especie de manta postulada por Marshall en 2009, los dos morfotipos encontrados alrededor de Isla Holbox fundamentan la propuesta de los mobúlidos como un grupo que tiene que ser revisado de manera exhaustiva. Se podría estar viendo no sólo una, sino dos especies nuevas. Debido a que las mantas de Holbox comparten características de *Manta birostris* y *M. alfredi* al parecer podrían constituir una combinación de ambas .

### *Filogenia*

Existen hoy en día diferentes conceptos de especie y no hay alguno que esté cerca de ser universalmente aceptado; todos los conceptos coinciden en que las especies evolucionan por linajes separados y que se comportan como metapoblacionales y su delimitación se realiza principalmente por la acumulación de evidencia biológica y evolutiva (de Queiroz 2007). Estudios recientes (Bowen et al, 2013; Morin et al., 2010) han utilizado criterios que combinan características genéticas, morfológicas, conductuales, patrones ambientales e incluso hábitos alimenticios para apoyar el reconocimiento de las especies y subespecies. En los ecosistemas marinos, las barreras que conducen a eventos de especiación son

frecuentemente difíciles de observar. Por tanto en los océanos, la especiación ecológica se ha reconocido como el mecanismo principal en la formación de nuevas especies. La especiación ecológica se define como el proceso de formación de nuevas especies en el que las barreras al flujo génico entre poblaciones son resultado de la selección divergente la cual contiene una base ecológica adaptativa (Schluter 2001; Funk et al., 2003). No obstante de que los procesos de especiación en ecosistemas marinos y terrestres siguen procesos similares las oportunidades para el aislamiento alopátrico son menores en los océanos y estuvieron asociados principalmente con la evolución de los continentes; una vez que finalizó dicho proceso la especiación a lo largo de límites ecológicos ha jugado un papel preponderante.

El evento de separación de las especies de Manta actualmente reconocidas, se estima que ocurrió hace 1 millón de años (Ma) durante el Pleistoceno (Kashiwagi et al., 2012). La hipótesis propuesta en la formación de estas dos especies es de que se diferenciaron debido a la elección del hábitat y a las fluctuaciones ecológicas en éstos ya que solían separarse en poblaciones de mantas oceánicas y costeras. En la descripción de Marshall et al.,(2009) en la que describe a *Manta scp cf birostris* ó su sinonimia *Cephalopterus giorna* menciona que esta especie podría presentar una distribución más limitada, incluso endémica, en el mar Caribe. Los resultados de las marcas satelitales, fotografías, censos aéreos y observaciones personales, muestran que las mantas de Holbox se alimentan de mayo a septiembre en el mar Caribe, aunque existen avistamientos de apareamientos antes de dicha temporada, durante la temporada de alta productividad, lo que parece indicar que las mantas de Holbox son visitantes habituales y con alta residencia en el Caribe.

Las mantas de Holbox no sólo se encuentran confinadas a un área en particular sino que además presentan diferencias morfológicas respecto a las otras mantas. Nuestros resultados indican que además, a nivel genético las mantas de

Holbox son diferentes a las dos especies existentes (*M.birostris* y *M.alfredi*). Si bien los genes que usó Kashiwagi (et al., 2012) ND5 y Rag1 por si solos no brindan suficiente información para separar a las mantas de Holbox de *M. birostris*, si la proporciona para separarlas de *M. alfredi* (Fig.17). Sin embargo, el gen mitocondrial ND5 es un gen conservado.. Esto puede ser observado también en la (Tabla 1) en la cual las diferencias nucleotídicas entre diferentes especies de mantas y elasmobranquios son pequeñas a diferencia del genes como CytB y D-loop, que son genes con una mayor tasa de mutación dentro del genoma mitocondrial. Kashiwagi et al. (2012) también reportaron diferencias similares del gen ND5 (Tabla 4) entre *M. birostris* (0.00104) y *M. alfredi* (0.00049).

Tabla 4 diferencias nucleotídicas por grupos de genes ND5 (Kashiwagi et al., 2012)

Number of net nucleotide substitutions between groups for mtDNA ND5, with values for pairwise  $d_i$  below the diagonal, and standard errors above the diagonal.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>Manta</i> spp. All		0.00084	0.00017	0.00036	0.01093	0.01080	0.01019	0.00671
2. <i>M. alfredi</i> MA1-3	0.00253		0.00028	0.00219	0.01093	0.01093	0.01026	0.00675
3. <i>M. alfredi</i> all	0.00049	0.00081		0.00106	0.01091	0.01083	0.01021	0.00669
4. <i>M. birostris</i> all	0.00104	0.00681	0.00313		0.01109	0.01094	0.01035	0.00691
5. <i>Mobula japonica</i>	0.12258	0.12039	0.12106	0.12656		0.01154	0.01001	0.00333
6. <i>Mobula tarapacana</i>	0.11793	0.11898	0.11799	0.11969	0.13198		0.01061	0.00344
7. <i>Mobula thurstoni</i>	0.10541	0.10544	0.10499	0.10786	0.11975	0.12065		0.00269
8. <i>Mobula</i> spp. All	0.06565	0.06528	0.06503	0.06838	0.03398	0.03400	0.02992	

Como las diferencias nucleotídicas son pequeñas entre el género *Manta*, fue necesario utilizar también genes con diferentes tasas de mutación. Como ya se mencionó con anterioridad los elasmobranquios tienen un reloj molecular lento (Nabholz et al 2008 a, b, 2009; Galtier et al., 2009a) y se ha demostrado que en estos grupos la adición de más genes al análisis aumenta la resolución de los árboles filogenéticos (Morin et al., 2010). En el caso del presente estudio, mediante la adición de tres genes al análisis fue posible separar *M. birostris* de las mantas de Holbox. Cada gen mitocondrial tiene una tasa de evolución diferente (Moritz, 1994; Avise 1994; Moore 1995) y se conoce que el D-loop tiene la tasa de mutación más variable en todo el genoma mitocondrial. También es un gen que no se utiliza comúnmente en análisis filogenético, pero en el caso de las mantas de Holbox fue útil para resolver su filogenia (Fig.18). No solo se observó que al añadir

genes con diferentes tasas de mutación los árboles filogenéticos adquirirían mayor resolución, si no que al utilizar todos los genes del genoma mitocondrial obtuvimos un árbol filogenético en el que la edad de los nodos de la manta de Holbox y de *M. birostris* es igual al de otros géneros de rayas y tiburones (Fig.19). No obstante la alta variabilidad del D-loop, el aumento de diferencias nucleotídicas al usar un mayor número de genes con diferentes tasas mutacionales (Tabla 1) y la utilización del tiempo estimado de la especiación de las dos especies de mantas, permiten considerar que la especiación de las mantas de Holbox sea más reciente.

Con base en los resultados obtenidos se propone la hipótesis de que las mantas de Holbox son parte de un gran metapoblación que se distribuye a lo largo del Golfo de México. Igualmente se propone la hipótesis de que el proceso de especiación por el cual las mantas de Holbox se diversificaron ocurrió durante la última era interglacial hace 125.000 años misma que ocasionó el fortalecimiento de las Corrientes del Golfo y de la del Atlántico Norte como se conocen actualmente. Las masas de agua que se encuentran y giran entre continentes con más frecuencia y fuerza, forman las barreras. Por ejemplo, se ha propuesto que la Corriente del Golfo es la principal fuente de origen de la ictiofauna de las Bermudas (Smith-Vaniz et al., 1999), de la fauna del mesopelágica de Caribe, en el norte del Mar de los Sargazos (Jahn, 1976) y de la ictiofauna del Archipiélago de las Azores (Avila et al., 2009). Estos estudios aportan evidencia de que la corriente del Golfo juega un papel muy relevante en la formación de las especies de diferentes animales marinos.

Las mantas de Holbox están confinadas a la zona del Caribe debido a sus características ambientales que les permiten encontrar no solo una zona de alimentación sino también de reproducción. La corriente del Golfo favorece también corrientes únicas de menor escala como la Corriente del Canal de Yucatán y además proporciona condiciones de temperatura y productividad idóneas para la permanencia de las mantas en el área, aunque ocasionalmente realicen migraciones hacia el norte. Al parecer estas migraciones no las hacen todos los individuos y no es coincidencia en que existan reportes de mantas en

octubre y diciembre en los cayos de Florida (FWC, 2014) en aguas someras y desembocaduras de ríos (FWC, 2014), por lo que pudieran ser una posible área de crianza como en el caso de otras especies de tiburones (Heupel et al., 2007).

Existen precedentes de especiación ecológica en otros organismos marinos, incluso en el género *Manta*, proceso que también parece acontece en las mantas de Holbox.

En julio de 2013 el status de *M. birostris* en la UICN cambió a vulnerable, que es una posición por encima de en peligro de extinción. Los informes recientes sobre el estado de la población de las mantarrayas indican disminución de su número debido a la presión de la pesca.

En este estudio se han abordado dos cuestiones de gestión importantes: 1) la existencia de una zona de reproducción en el Caribe mexicano, y 2) la existencia de una tercera especie de manta en aguas mexicanas. Es imperativo que el estatus de esta nueva posible especie se defina lo antes posible para que, al igual que *Manta birostris* y *Manta alfredi* pueda, ser incluida en la lista de especies vulnerables. A pesar de que las mantas de Holbox están en un Área Natural Protegida (ANP), también es importante determinar si esta área es suficiente para salvaguardar la zona de alimentación y reproducción de la especie. Si fuera este el caso, puede ser necesario analizar la redefinición del perímetro del ANP.

## Conclusiones

La permanencia de las mantas en el área se debe principalmente a que su principal recurso de alimentación es abundante. De Mayo a Septiembre la concentración de nutrientes y en consecuencia el zooplancton en el área aumenta y permite que las mantas puedan ser observadas con mayor frecuencia y facilidad. Este aumento en la concentración de nutrientes no solo se refleja en la cantidad de mantas sino también en el aumento de clorofila-A en el agua y en el cambio isotópico de Carbono y Nitrógeno. Cuando este periodo de enriquecimiento de nutrientes disminuye, también lo hacen los avistamientos de mantas más no su presencia en el área de estudio

La separación entre poblaciones de mantas es también evidente tanto en la morfología externa de los organismos del Golfo y a nivel genético. Esta última diferenciación a nivel genético, es consistente con la reportada para este género y para otros géneros de tiburones. Es posible que la población de mantas del Golfo y Caribe divergieran recientemente y que el poco flujo génico con las demás poblaciones así como las características ambientales de la zona sean la explicación al proceso de especiación de estas. El poder delimitar especies y a su vez las áreas donde viven es de suma importancia para su conservación. De la misma forma, es importante hacer una revisión extensiva sobre las rayas y mantarrayas del Golfo de México ya que es muy posible que, al igual que en las mantas, existan otras especies que pudieran pasar por los mismos procesos de especiación.

## Perspectivas a futuro

- Es importante establecer los patrones de distribución de las mantas del caribe mediante el uso de censos aéreos y de marcas satelitales. Esto permitiría una mejor delimitación del área donde se encuentran y daría un mayor sustento a que esta población de mantas es residente del Golfo de México y en particular del Caribe.
- Incluir a esta especie en la lista de CITES y IUCN para que al igual que las dos especies de Manta ya existentes pueda ser protegida tanto en aguas mexicanas como internacionales.
- Incluir un análisis de morfología interna de estos especímenes, sin duda sería de suma importancia para establecer una correcta clave de determinación en campo.

## REFERENCIAS

Anderson, S. and Pyle, P. 2003 A temporal, sex-specific occurrence pattern among white sharks at the South Farallon Islands, California. *Calif. Fish Game* 89, 96–101.

Anderson, R. C., Shiham, A. M., Kitchen-Wheeler, A. M., and Stevens, G. (2011). Extent and economic value of manta ray watching in Maldives. *Tourism in Marine Environments* 7, 15–27. doi:10.3727/154427310X12826772784793

Arnason U, Gullberg A, Janke A. 2004. Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution. *Gene* 333: 27–34

Avila, S.P., Marques da Silva, C., Schiebel, R., Cecca, F., Back-eljau, T. & de Frias Martins, A.M. 2009. How did they get here? The biogeography of the marine molluscs of the Azores. *Bulletin de la Société Géologique de France*, 180, 295–307.

Avise, J. C., and Ball, R. M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. In *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* (D. J. Futuyma, J. Antonovics, Eds.), Vol. 7, pp. 45–67. Oxford University Press, Oxford.

Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman &

Hall, London.

Bancroft, E.N. 1829. On the fish known in Jamaica as the Sea devil. *In: Vigors, N.A. (Ed) The Zoological Journal Vol. 4.* Phillips Publishing, London, pp. 444–457.

Bansemmer, C.S. and Bennett, M.B. 2009. Reproductive periodicity, localized movements and behavioural segregation of pregnant *Carcharias taurus* at Wolf Rock, southeast Queensland, Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 374: 215-2

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.* Sears Foundation for Marine Research, Yale University, New Haven, pp. 508-514.

Bowen BW, Rocha LA, Toonen RJ, Karl SA and ToBo Laboratory. 2013. The origins of tropical marine biodiversity . *TREE* 28(6) 359-366.

Blumenthal, J.M., Abreu-Grobois, F.A., Austin, T.J., Broderick, A.C., Bruford, M.W.,

Coyne, M.S., Ebanks-Petrie, G., For- mia, A., Meylan, P.A., Meylan, A.B. & Godley, B.J. 2009. Turtle groups or turtle soup: dispersal patterns of hawksbill turtles in the Caribbean. *Molecular Ecology*, 18, 4841–4853.

Castro ALF and Rosa RS 2005. Use of natural marks on population estimates of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, at Atol das Rocas Biological Reserve, Brazil. *Environ Biol Fish* 72:213–221

Clark, T., and Laros, K. 2008. Sixteen years of photo-identification of Hawaiian manta rays (*Manta birostris*). *In 'Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists. American Elasmobranch Society Devil Ray Symposium, Montreal, 23–28 July 2008'.*

Coles, R.J. 1916. Natural history notes on the devilfish, *Manta birostris* (Walbaum) and *Mobula olfersi* (Müller). *Bulletin American Museum of Natural History*, 35, 649–657.

Couturier LIE, Jaine FRA, Townsend KA, Weeks SJ and Richardson AJ (2011). Distribution, site affinity and regional movements of the manta ray, *Manta alfredi* (Krefft, 1868), along the east coast of Australia. *Mar Freshw Res* 62: 628–637.

Crow KD, Munehara H, Bernardi G 2010. Sympatric speciation in a genus of marine reef fishes. *Mol Ecol* 19(10):2089–2105

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.

Dewar, H, P. Mous; M. Domeier; A. Muljadi; J. Pet y J. Whitty (2008) Movements and site fidelity of the giant manta ray, *Manta birostris*, in the Komodo Marine Park, Indonesia. *Marine Biology* 155:121-133.

de la Parra Venegas R, Hueter R, González Cano J, Tyminski J and Gregorio Remolina J .2010. An Unprecedented Aggregation of Whale Sharks, *Rhincodon typus*, in Mexican Coastal Waters of the Caribbean Sea. *PLoS ONE* 6(4).

de Queiroz.2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56(6) 879-866.

Dieckmann, U. and Doebeli, M. 1999. On the Origin of Species by Sympatric. *Nature* 400,354-357.

Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput *Nucleic Acids Res.* 32(5),1792-1797

Elmer KR, Lehtonen TK, Kautt AF, Harrod C, Meyer A .2010. Rapid sympatric ecological differentiation of Crater Lake cichlid fishes within historic times. *BMC Biol* 8:60

Funk, D., Omland, K., 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34, 397–423.

Galtier N, Jobson RW, Nabholz B, Glemin S, Blier PU. 2009. Mitochondrial whims: Metabolic rate, longevity and the rate of molecular evolution. *Biol Lett* 5: 413–416.

Gavrilets S, Li H, Vose MD .2000. Patterns of parapatric speciation. *Evolution* 54(4):1126–1134

Graham R, Roberts C .2007. Assessing the size, growth rate and structure of a seasonal population of whale sharks(*Rhincodon typus* Smith 1828) using conventional tagging and photo identification. *Fish Res* 84:71–80

Graham RT, Witt MJ, Castellanos DW, Remolina F, Maxwell S, et al. 2012 Satellite Tracking of Manta Rays Highlights Challenges to Their Conservation. *PLoS ONE* 7(5)

Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*, 59:307-321.

Hesit, E.J y Gold J.R. 1999. Genetic identification of sharks in the US Atlantic large coastal shark fishery. *Fish.Bull* 97:53-61.

Hewitt, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247–276.

Hewitt, G.M., 2000. The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature* 405, 907– 913.

Heupel, M.R., Carlson J.K., Simpfendorfer C.A. 2007. Shark nursery areas:

concepts, definition, characterization and assumptions. Mar Ecol Prog Ser 337, 287–297.

Hinojosa-Alvarez, S. A (2008). Ecología trófica de la Manta gigante (*Manta birostris*, Dondorff 1798), mediante el análisis de isótopos estables  $\delta^{13}\text{C}$  en las áreas naturales protegidas de Yum Balam e Isla Contoy, Quintana Roo . Tesis de Maestría. UNAM. México. 63 pp.

Hoelzel AR, Natoli A, Dahlheim ME, Olavarria C, Baird RW, Black NA .2002. Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci 269(1499):1467–1473

Hofreiter, M., Stewart, J., 2009. Ecological change, range fluctuations and population dynamics during the Pleistocene. Curr. Biol. 19, R584–R594.

Homma, K., Maruyama, T., Itoh, T., Ishihara, H., and 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: Proc 5th Int Conf Indo-Pacific Fishes, Noumea, 1997. Ichthyological Society of France, Paris, p 209–21

Jahn, A.E. (1976) On the midwater fish faunas of Gulf Stream rings with respect to habitat differences between slope water and northern Sargasso Sea. PhD Thesis, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA

Jansson, R., Dynesius, M., 2002. The fate of clades in a world of recurrent climatic change: Milankovitch oscillations and evolution. Annu. Rev. Ecol. Syst. 33, 741–777.

Kashiwagi T, Marshall A, Bennett M and Overdeen J. 2012 . Genetic signature of recent speciation in manta rays (*Manta alfredi* and *M. birostris*)

Kleckner, R.C. & McCleave, J.D. .1982. Entry of migrating American eel

leptocephali into the Gulf Stream system. Helgoländer Meeresuntersuchungen, 35, 329–339.

Kinlan BP, Gaines SD .2003. Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. Ecology 84(8):2007–2020

Lesueur, C.A. 1824. Description of several species of the Linnaean genus *Raia*, of North America. Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 4, 100–121.

Li R, Fan W, Tian G, Zhu H, He L, et al. 2010. The sequence and *de novo* assembly of the giant panda genome. Nature.

Ludwig A., May, B., Deubs, L and Jenneckens, I. 2000. Heteroplasmy in the mtDNA Control Region of Sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus). Genetics.

Luiz, O. J., A. P. Balboni, G. Kodja, M. Andrade y H. Marum. (2009). Seasonal occurrences of *Manta birostris* (Chondrichthyes, Mobulidae) in southeastern Brazil. Ichthyological Research. 56:96-99.

Mallet J, Meyer A, Nosil P, Feder JL .2009. Space, sympatry and speciation. J Evol Biol 22(11):2332–2341

Martin AP (1999) Substitution rates of organelle and nuclear genes in sharks: implicating metabolic rate (again). Mol Biol Evol 16: 996–1002

Marshall A.D, Compagno L.J.V y Benett M.B. 2009. Redescription of the genus *Manta* with the resurrection of *Manta alfredi* (Kreft, 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. and Kashiwagi, T. (2011). *Manta birostris*. In: IUCN (2013). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>

Mayr E 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York

Mayr E 1963. Animal species and evolution. Harvard University Press, Cambridge

Mayr E .1995. Species, classification, and evolution. In: Arai R, Kato M, Doi Y (eds) Biodiversity and evolution. National Science Museum Foundation, Toyko

Moore WS. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation—mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49: 718–726.

Morin PA, Archer FI, Foote AD, Vilstrup J, Allen EE, Wade P et al .2010. Complete mitochondrial genome phylogeographic analysis of killer whales (*Orcinus orca*) indicates multiple species. *Genome Res* 20(7):908–916

Moritz, C. 1994. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9, 373–375.

Mitchill, S.L. 1824. Description of a new and gigantic species of the genus *Cephalopterus* of Dumeril. *Annals of the Lyceum of Natural History of New York*, 23–29.

Mundy, N.I., Winchell, C.S and Woodruff .1996. Tandem Repeats and Heteroplasmy in the Mitochondrial DNA Control Region of the Loggerhead Shrike (*Lanius ludovicianus*). *Journal of Heredity*.

Nabholz B, Glemin S, Galtier N. 2008a. Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals the longevity hypothesis. *Mol Biol Evol* 25: 120–130.

Nabholz B, Mauffrey JF, Bazin E, Galtier N, Glemin S. 2008b. Determination of mitochondrial genetic diversity in mammals. *Genetics* 178: 351–361.

Nabholz B, Glemin S, Galtier N. 2009. The erratic mitochondrial clock: Variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC Evol Biol* 9: 54

Naro-Maciel E, JH Becker, EHSM Lima, MA Marcovaldi, R DeSalle. 2007. Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles of Brazil. *Journal of Heredity*.

Notarbartolo-di-Sciara, G. (1987) A revisionary study of the genus *Mobula* Rafinesque, 1810 (Chondrichthyes: Mobulidae) with the description of a new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 91, 1–91.

Notarbartolo-di-Sciara, G y E. V. Hillyer. 2003. Seasonal circulation on the western shelf of the Gulf of Mexico using a high-resolution numerical model. *J. Geophys. Res.*, 108 (C12), 3389

Palumbi SR 2004 Marine reserves and ocean neighborhoods: the spatial scale of marine populations and their management. *Annu Rev Environ Resour* 29:31–68

Palumbi SR, Baker CS .1994. Contrasting population-structure from nuclear intron sequences and Mtdna of Humpback Whales. *Mol Biol Evol* 11(3):426–435

Passamoti, M and Scali. 2001. Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia). *Current Genetics*.

Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinforma* 14: 817–818.

Poortvliet M and Hoarau G. 2012. The complete mitochondrial genome of the spinetail devilray, *Mobula japonica*. Mitochondrial DNA.

Post, D.M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83(3): 703-718.

Rocha LA 2003. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *J Biogeogr.* 30(8):1161–1171

Rocha LA, Bowen BW 2008. Speciation in coral-reef fishes. *J Fish Biol* 72(5):1101–1121

Schluter, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends Ecol. Evol.*, 16, 372–380.

Schluter, D. 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science*, 323, 737–741.

Slater GS, Birney E. 2005. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* xxxx

Schluter, D., 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science* 586 323, 737–741.

Smith-Vaniz, W.F., Collette, B.B. & Luckhurst, B.E. 1999. Fishes of Bermuda: History, zoogeography, annotated check-list, and identification keys, p. 424. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publication 4, Allen Press, Lawrence, Kansas.

Vander Zanden M.J. and Rasmussen J.B. 2001. Variation in  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. *Limnology and Oceanography* 46, 2061–2066.

Via S 2001. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends Ecol Evol* 16(7):381–390

Ward RD, Holmes BH, White WT and Last PR. 2008. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Mar Fresh Res* 59:57 - 71

Xiong Y, Brandley MC, Xu S, Zhou K, Yang G. 2009. Seven new dolphin mitochondrial genomes and a time-calibrated phylogeny of whales. *BMC Evol Biol* 9: 20.

Zavala-Hidalgo, J., Morey, S.L., O'Brien, J., 2003. Cyclonic eddies northeast of the Campeche Bank from altimetry data. *J. Phys. Oceanogr.* 23: 623–629,