



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Análisis de la diversidad genética y conectividad de ballenas jorobadas  
(*Megaptera novaeangliae*) del Pacífico Sudeste en la costa de Esmeraldas,  
Ecuador durante la temporada 2012**

**Karla Estefanía Rojas López**

**María de Lourdes Torres, Ph.D.,** Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito  
para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, enero de 2014

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Análisis de la diversidad genética y conectividad de ballenas jorobadas  
(*Megaptera novaeangliae*) del Pacífico Sudeste en la costa de Esmeraldas,  
Ecuador durante la temporada 2012**

**Karla Estefanía Rojas López**

Ma. De Lourdes Torres, **Ph.D.**

Director de Tesis y Miembro del Comité de Tesis

.....

Venancio Arahana, **Ph.D.**

Miembro del Comité de Tesis

.....

Judith Denkinger, **Ph.D.**

Miembro del Comité de Tesis

.....

Stella de la Torre, **Ph.D.**

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas  
y Ambientales

.....

Quito, enero de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma: .....

Nombre: Karla Estefanía Rojas López

C. I.: 09921672234

Fecha: Quito, enero de 2014

## **Dedicatoria**

A mis padres y hermana por ser mi apoyo en todo momento, por estar conmigo en las buenas y las malas y saber darme los mejores consejos. Por ayudarme en todo lo que he necesitado y alentarme a ser cada vez mejor.

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer a todos mis profesores, especialmente a María de Lourdes Torres y Venancio Arahana por toda su paciencia, esfuerzo y conocimientos transmitidos a lo largo de la carrera. Por estar siempre disponibles para ayudarme con cualquier duda que he tenido y brindarme su apoyo. A Judith Denkinger por sus valiosos consejos y comentarios a lo largo de este proyecto.

A mi familia y amigos por ayudarme en cualquier cosa que he necesitado, por sus palabras de ánimo y sincera amistad. Me han enseñado a ser mejor persona.

A Andrés Villavicencio que me ayudó a realizar una parte importante de este trabajo y que ha sido un apoyo incondicional en todos mis proyectos.

A la Universidad San Francisco de Quito por otorgarnos el GAIAS Grant (Permiso Ministerio del Ambiente No. 010-2013-IC-FLO-FAN-DPE-MA) para el financiamiento de este proyecto.

## Resumen

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) es un mamífero marino migratorio, que está distribuido en todos los océanos de mundo. Su población mundial se ha reducido drásticamente producto de la cacería comercial durante los dos últimos siglos. Se tiene poca información acerca del grado de intercambio existente entre las diferentes poblaciones de ballenas jorobadas en el Hemisferio Sur. Este trabajo es la segunda fase de una investigación, cuyo objetivo es evaluar la diversidad genética y conectividad de las ballenas jorobadas que visitan la costa de Esmeraldas, Ecuador. Un total de 22 muestras de piel de ballena se obtuvieron mediante dardos de biopsia. El ADN mitocondrial fue extraído y secuenciado. Un total de dieciséis haplotipos diferentes fueron determinados. De estos haplotipos, 4 fueron nuevos para Ecuador, tres de ellos ya se habían reportado anteriormente en otras poblaciones del stock G (Colombia y Santa Elena), y el otro correspondió a una secuencia nueva no reportada antes en el Pacífico Sudeste pero sí en la Polinesia Francesa. Se estimó un valor de  $0.9567 \pm 0.0290$  para la diversidad de haplotipos ( $h \pm sd$ ) y de  $0.0214 \pm 0.0113$  para diversidad de nucleótidos ( $\pi \pm sd$ ), lo que refleja una alta diversidad genética de las ballenas jorobadas en las costas ecuatorianas en comparación a otras poblaciones tanto en áreas de alimentación como de reproducción en el Pacífico Sudeste. El análisis de varianza molecular (AMOVA) no mostró diferencias significativas con la población de ballenas de Santa Elena-Ecuador, Colombia, y la Península Antártica, pero sí se encontró diferencias significativas entre el Estrecho de Magallanes, tanto en la frecuencias de haplotipos como en la composición de nucleótidos. Se encontró una alta identidad a nivel de haplotipos entre la población de Esmeraldas y otras áreas de reproducción dentro del Hemisferio Sur (Stocks B, C, D, E y F). Por otro lado, se encontraron diferencias significativas por medio del AMOVA entre las poblaciones de Esmeraldas y las de Alaska (Pacífico Norte) y Brasil (Stock A). La reconstrucción filogenética agrupó a las 22 muestras en tres de los cuatro clados presentes en el Hemisferio Sur. Al realizar una comparación por sexo y años, se encontró que los machos presentaban una mayor fidelidad de sitio, aunque es posible que varios individuos puedan estar en tránsito hacia las áreas de reproducción en Costa Rica y Panamá. Por otro lado, las hembras no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de haplotipos y composición de nucleótidos, pero estos resultados pueden deberse al reducido número de muestras. Los resultados de este estudio contribuyen a la comprensión de la conectividad de las ballenas jorobadas que visitan las aguas costeras del Ecuador con las de otras poblaciones en el Hemisferio Norte y Sur.

## Abstract

The humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) is a widely distributed marine mammal, which inhabits all oceans of the world. The world population has been drastically reduced due to commercial whaling during the last two centuries. There is little information about the degree of genetic exchange between different populations of humpback whales in the Southern Hemisphere. This work is the second phase of a research, which aims to assess the genetic diversity and connectivity of humpback whales off the coast of Esmeraldas, Ecuador. A total of 22 tissue samples were obtained using a Paxarms Biopsy system. Mitochondrial DNA was extracted and sequenced to establish the genetic diversity of humpback whales off the coast of Esmeraldas during the 2012 season. A total of sixteen different haplotypes were identified. Of these haplotypes, four were new to Ecuador, three of them had been previously reported in other populations of the stock G (Colombia and Santa Elena), and the other corresponded to a new sequence which has not been previously reported in the Southeast Pacific population, but in the French Polynesia. Haplotype diversity ( $h \pm SD$ ) was estimated to be of  $0.9567 \pm 0.0290$  and the nucleotide diversity ( $\pi \pm SD$ )  $0.0214 \pm 0.0113$ , reflecting high genetic diversity among individuals inhabiting the coasts of Ecuador, compared to other populations in both breeding and feeding areas in the Southeast Pacific. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed no significant differences with the whale populations of Santa Elena, Ecuador, Colombia, and the Antarctic Peninsula, but significant differences were found with the Magellan Strait, in the haplotype frequencies and in the nucleotide composition. A high level of haplotype identity was found among the Esmeraldas population and other breeding areas in the Southern Hemisphere (Stock B, C, D, E, F). On the other hand, significant differences were found using the AMOVA among populations of Esmeraldas and Alaska (North Pacific) and Brazil (Stock A). Phylogenetic reconstruction grouped the 22 samples in three of the four clades present in the southern hemisphere. When making a comparison by sex and years, it was found that males showed higher site fidelity, although it is possible that several individuals can be in transit to the breeding areas in Costa Rica and Panama. In addition, females showed no significant differences in haplotype frequencies and nucleotide composition, but these results may be due to the small number of samples. The results of this study will help to understand the connectivity of humpback whales in coastal waters off Ecuador with those of other populations in the Northern and Southern Hemispheres.

## Tabla de contenido

<b>1. Introducción</b> .....	<b>14</b>
1.1. Taxonomía y morfología de la ballena jorobada .....	14
1.2. Historia natural.....	16
1.2.1. Áreas de reproducción.....	16
1.2.2. Áreas de alimentación .....	18
1.2.3. Uso de hábitat.....	19
1.3. Estructura Poblacional y Distribución .....	20
1.4. Ballenas Jorobadas en el Pacífico Sudeste.....	22
1.5. Ballenas Jorobadas en el Ecuador .....	26
1.6. Análisis Moleculares.....	27
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>31</b>
2.1. Objetivo General .....	31
2.2. Objetivos Específicos.....	31
<b>3. Justificación</b> .....	<b>32</b>
<b>4. Área de Estudio</b> .....	<b>34</b>
<b>5. Materiales</b> .....	<b>34</b>
5.1. Recolección muestras de piel de ballenas jorobadas .....	34
5.2. Análisis Moleculares.....	34
5.2.1. Extracción de ADN de ballenas jorobadas.....	34
5.2.2. Cuantificación de ADN de ballenas jorobadas .....	35
5.2.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	35
5.2.4. Determinación de sexo de ballenas jorobadas.....	36
5.2.5. Análisis de ADN mitocondrial de ballenas jorobadas .....	36
5.3. Análisis estadísticos .....	37
<b>6. Métodos</b> .....	<b>37</b>
6.1. Recolección muestras de piel de ballenas jorobadas .....	37
6.2. Análisis Moleculares.....	38
6.2.1. Extracción de ADN de las muestras recolectadas de ballenas jorobadas .....	38
6.2.2. Determinación de sexo de ballenas jorobadas .....	39
6.2.3. Análisis de la región control de ADN mitocondrial de ballenas jorobadas .....	40

6.3. Análisis estadísticos.....	42
<b>7. Resultados .....</b>	<b>43</b>
7.1. Determinación de sexo de ballenas jorobadas .....	43
7.2. Diversidad genética de ballenas jorobadas .....	43
7.3. Comparación de la población de Esmeraldas (2012) con otras áreas del Pacífico Sudeste .....	44
7.4. Conectividad con otras poblaciones de ballenas jorobadas del Hemisferio Norte y Sur .....	46
7.5. Reconstrucción filogenética.....	47
7.6. Comparación interanual global y por sexos de las ballenas jorobadas en Esmeraldas para los años 2010-2012 .....	48
<b>8. Discusión.....</b>	<b>50</b>
8.1. Diversidad genética para la población de ballenas jorobadas de Esmeraldas 2012 ..	50
8.2. Análisis de diferenciación de la población de ballenas jorobadas Esmeraldas (2012) con otras áreas del Pacífico Sudeste .....	52
8.3. Relación genética con poblaciones de ballenas jorobadas en otras áreas de alimentación y reproducción en el Hemisferio Norte y Sur .....	54
8.4. Fidelidad de sitio por años y sexo de las ballenas jorobadas en la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010, 2011 y 2012 .....	57
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>62</b>
<b>10. Recomendaciones.....</b>	<b>64</b>
<b>11. Referencias .....</b>	<b>65</b>
<b>12. Tablas.....</b>	<b>74</b>
<b>13. Figuras .....</b>	<b>81</b>
<b>14. Anexos.....</b>	<b>85</b>

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Distribución y conexiones de las áreas de reproducción y alimentación de las ballenas jorobadas en el Hemisferio Sur.....	74
<b>Tabla 2.</b> Cuadro resumen de la proporción de sexos encontrada en diferentes estudios realizados en el Hemisferio Sur.....	74
<b>Tabla 3.</b> Diversidad de haplotipos de las ballenas jorobadas en la costa de Esmeraldas durante la temporada 2012.....	75
<b>Tabla 4.</b> Cuadro resumen de la diversidad genética dentro de la población a nivel de haplotipos (H) y de nucleótidos ( $\pi$ ), y porcentaje de individuos en cada clado.....	75
<b>Tabla 5.</b> Cuadro resumen de la diversidad genética a nivel de haplotipos (H) y de nucleótidos ( $\pi$ ), en diferentes áreas de reproducción y alimentación del Hemisferio Norte y Sur.....	76
<b>Tabla 6.</b> Haplotipos compartidos de la población de Esmeraldas (2012) y las áreas de reproducción y alimentación del Stock G.....	77
<b>Tabla 7.</b> Valores del análisis de varianza molecular con otras zonas dentro del stock G, basándose en la región control del ADN mitocondrial.....	78
<b>Tabla 8.</b> Valores del análisis de varianza molecular con otras zonas dentro Hemisferio Norte y Sur, basándose en la región control del ADN mitocondrial.....	78
<b>Tabla 9.</b> Valores del análisis de varianza molecular para la comparación interanual de las temporadas 2010, 2011 y 2012 basándose en la región control del ADN mitocondrial.....	79

**Tabla 10.** Haplotipos encontrados en las ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010, 2011 y 2012. La frecuencia de cada haplotipo se muestra por sexo y año.....79

**Tabla 11.** Valores del análisis de varianza molecular entre años y por sexo, se muestra la diferencia a nivel de frecuencias de haplotipos (FST).....80

**Tabla 12.** Valores del análisis de varianza molecular entre años y por sexo, se muestra la diferencia a nivel de composición de nucleótidos ( $\Phi$ ST).....80

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa del área de estudio en la costa de Esmeraldas, Ecuador.....	81
<b>Figura 2.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación de la región control del ADN mitocondrial.....	82
<b>Figura 3.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación de las regiones SFY/SFX (sexaje).....	82
<b>Figura 4.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de restricción de la amplificación de las regiones SFY/SFX.....	83
<b>Figura 5.</b> Reconstrucción filogenética basada en la región control del ADN mitocondrial (469 pb de longitud) de ballenas jorobadas, usando el método Neighbor-Joining, con un apoyo de 1000 replicaciones bootstrap.....	84

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Datos de las muestras de ballenas jorobadas recolectadas en la costa de Esmeraldas, en la temporada 2012. ....	85
--	----

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Taxonomía y morfología de la ballena jorobada

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) es el único cetáceo del género *Megaptera* (orden Cetacea, familia Balaenopteridae), comúnmente llamado rorcuales, cetáceos que poseen barbas (placas córneas) en la boca en lugar de dientes (Flórez-González et al., 2007; Olavarría, 2008). Su nombre común es yubarta y se caracteriza por tener un cuerpo robusto especialmente en la región del pecho, que se va adelgazando hacia los extremos. En la cabeza y mandíbulas presenta una serie de protuberancias llamadas tubérculos (apéndices carnosos), cada uno con un pelo que se cree refuerza la habilidad sensorial (Félix, 2003). En cada lado del paladar existen alrededor de 270 a 400 barbas finas y largas, cerdas hechas de queratina, que es un material orgánico resistente y flexible. Al estar muy juntas en la boca, forman una estructura parecida a un colador que les permite filtrar peces pequeños, krill, anfípodos y moluscos para su alimentación (González, 2002).

Como el resto de ballenas dentro de la familia Balaenopteridae, presentan entre 14 y 22 pliegues gulares con aproximadamente 15 cm de ancho cada uno en su estado no expandido (González, 2002). Estos surcos se extienden desde el mentón hasta el ombligo, los cuales se expanden mientras se alimentan permitiéndole aumentar considerablemente el volumen de la cavidad oral (Félix, 2003). Las aletas pectorales son muy largas, aproximadamente un tercio de la longitud total de su cuerpo y de esta característica deriva el nombre del género *Megaptera* que significa “aleta grande” (Liddell & Scott, 1980). Existe una aleta dorsal situada en el tercio posterior, de altura cercana a 30 cm y de forma muy variable, de aquí su nombre característico, ya que se distingue una joroba pequeña cuando la ballena se dobla para

sumergirse. La aleta caudal tiene una envergadura relativamente grande, y el borde posterior es dentado (Félix, 2003; Olavarría, 2008).

La coloración de esta ballena es negra en el dorso y con extensiones variables de blanco en el vientre, aletas pectorales y aleta caudal. Las aletas pectorales son blancas en la cara inferior y pueden ser blancas o negras en la cara superior dependiendo de cada población o cada individuo (Flórez-González et al., 2007). Esta zona de las aletas tiende a ser blanca en las que habitan en el Atlántico Norte, mientras que en el Pacífico Norte con frecuencia es de color negro (González, 2002). Además, la coloración ventral varía mucho, con diferencias significativas entre poblaciones. Por ejemplo, algunas ballenas del Hemisferio Sur tienen una amplia coloración blanca a diferencia de las ballenas del Pacífico y Atlántico Norte (Clapham, 2009). La parte inferior de la cola tiene un patrón que es único para cada ballena, y aunque este patrón se basa solo en dos colores, negro y blanco, existe una gama infinita de diseños formados por manchas y rayas en la superficie de la cola. Esta característica se utiliza para identificarlas y seguirlas durante años o incluso décadas (Félix, 2003).

Las ballenas jorobadas del Hemisferio Sur son algo más grandes que sus contrapartes del Norte, como es el caso de todos los miembros de la familia Balaenopteridae (Olavarría, 2008). En general, el tamaño promedio varía entre los 13-15m en las ballenas adultas, mientras que un ballenato puede medir de 4 a 4,5 m al nacer. Las hembras son en promedio de 1 a 1,5 m más grandes que los machos. El sexo de las ballenas jorobadas es difícil de evaluar a simple vista, la única diferencia morfológica externa, aparte de la ligera diferencia de tamaño, es un lóbulo hemisférico en la hendidura genital presente en las hembras (Olavarría, 2008).

## **1.2 Historia Natural**

### **1.2.1 Áreas de reproducción**

Durante la época de reproducción en invierno, las ballenas jorobadas permanecen en regiones tropicales y subtropicales, en aguas poco profundas alrededor de islas y en bahías, donde la temperatura del agua varía entre 24°C y 28°C. La temporada de reproducción puede extenderse de cuatro a cinco meses, aunque parte de la reproducción también puede suceder durante la migración (Flórez-González et al., 2007). Generalmente, los animales no se alimentan en las áreas de reproducción, pero existen registros inusuales de individuos solitarios que se alimentan en zonas reproductivas (Clapham 1996; Flórez-González et al., 2007).

La madurez sexual en los machos ocurre a los 7- 12 años de edad y en las hembras a los 4-9 años de edad, con tamaños entre 12 y 14 metros. El ciclo reproductivo de la especie es normalmente de una cría cada dos o tres años (Clapham 1996; Flórez-González et al., 2007; Baker, Perry y Herman, 1987; González, 2002). La gestación dura de 11 a 12 meses, las crías comienzan el proceso de destete a los 6 meses y alcanzan la independencia al final de su año de parto (Clapham 1996; Baker, Perry y Herman, 1987). El factor principal que determina las variaciones interanuales en las tasas de reproducción de las ballenas jorobadas puede ser la disponibilidad de alimentos (Baker, Perry y Herman, 1987; Clapham, 1996). Se ha descubierto que existe una secuencia en la llegada y la partida de las ballenas jorobadas a las zonas de reproducción. Primero llegan las madres que están dando de lactar, seguidas por animales subadultos, adultos y por último las hembras preñadas. Mientras que la secuencia al abandonar los sitios de reproducción se revierte, donde las hembras preñadas son las primeras en irse (Clapham 1996; Flórez-González et al., 2007; González, 2002).

La ausencia de presión de depredación de las ballenas jorobadas en hábitats tropicales, libera a los individuos de la necesidad de coexistir con fines de vigilancia o de defensa común, por lo que el comportamiento social en latitudes bajas se caracteriza por pequeños grupos y asociaciones breves (Clapham, 1996; 2000). Por esta razón, a pesar de que la mayoría de áreas de reproducción pueden tener cientos de hembras, los machos compiten por una sola hembra a la vez (Clapham, 1996; Valsecchi et al., 2002).

El cuidado parental masculino está ausente, y los machos se caracterizan por cantar canciones largas y complejas, principalmente durante la época de apareamiento, pero también esporádicamente en las áreas de alimentación en el verano (Clapham 1996; Flórez-González et al., 2007). Las canciones se las asocia frecuentemente como una forma de competencia entre machos, aunque también se sugiere que son una forma de atraer a una hembra para aparearse o una estrategia de comunicación entre los machos (Flórez-González et al., 2007). Las ballenas dentro de una misma población, cantan la misma canción, y similitudes y diferencias en la estructura de la canción y su contenido se han usado para separar o delimitar poblaciones de esta especie (Clapham 1996; Flórez-González et al., 2007).

Los tipos de asociaciones que se pueden observar en esta temporada son: 1) Animales solitarios jóvenes y/o adultos de ambos sexos; 2) Machos adultos solitarios que permanecen en un área por varias horas emitiendo cantos; 3) Hembras con su cría recién nacida; 4) Hembras con su cría y una escolta; 5) Grupos competitivos (González, 2002). Los grupos competitivos están caracterizados por varios machos adultos que compiten por el acceso sexual a una sola hembra madura, que puede estar acompañada por una cría (Clapham, 2000; González, 2002; Félix, 2003). Estos grupos constan de una ballena central (hembra) con menos actividad física, denominada "animal nuclear", acompañada cercanamente por otra ballena denominada

"escolta principal" que a menudo es agresiva y la defiende de acercamientos de otros machos que se los denomina "escoltas secundarios" (Clapham, 2000). Se ha observado que los machos exhiben una mayor dispersión en cuanto a sus áreas de reproducción, mientras que las hembras demuestran una mayor filopatria hacia las mismas (Pomilla & Rosenbaum., 2005; Acevedo, Aguayo-Lobo & Pastene, 2006; Stevick et al., 2011; Craig & Herman, 1997).

### **1.2.2 Áreas de alimentación**

Las ballenas jorobadas se alimentan durante el verano en zonas de latitudes altas, en aguas ubicadas sobre la plataforma continental. La temperatura superficial del agua en estas regiones varía enormemente, pero en general es baja y fluctúa entre 2 y 10°C. Por lo regular en estas áreas, la productividad primaria y la concentración de presas es alta durante el verano (Flórez-González et al., 2007). En estas zonas de alimentación, con algunas excepciones, la organización social de las ballenas jorobadas está fuertemente caracterizada por grupos pequeños que duran unas pocas horas o menos, donde no se exhibe territorialidad (Clapham, 1996, 2000, 2009). Estos grupos cooperativos se suelen formar con el fin de maximizar el consumo de alimentos (Valsecchi et al., 2002; Flórez-González et al., 2007).

Esta especie utiliza un amplio repertorio de conductas de alimentación, que se heredan culturalmente y al parecer están relacionadas con la composición y densidad del alimento (Flórez-González et al., 2007). Dentro de algunos de estos patrones de alimentación están: 1) el abalanzamiento, donde la ballena sale a la superficie con la boca abierta y nada a gran velocidad atrapando sus presas o incluso abalanzándose sobre los cardúmenes; 2) el uso de nubes, columnas o redes de burbujas, donde los animales nadan en círculos a algunos metros de profundidad exhalando aire, mediante la cual agrupan al cardumen y se abalanzan sobre

éste sincronizadamente; 3) el aturdimiento de las presas mediante aletazos y coletazos; 4) el uso de la superficie del agua para evitar el escape de las presas y 5) la alimentación con las ballenas en formación frontal (Flórez-González et al., 2007; González, 2002; Clapham 1996; Félix, 2003).

La fidelidad hacia las áreas de alimentación es dirigida maternalmente, ya que las madres les enseñan las rutas migratorias a sus crías durante el primer año de vida. Esto se ha comprobado ya que los ballenatos tras cumplir un año de vida regresan por sí mismos a la misma área de alimentación materna (Olavarría, 2008; Baker, Perry & Herman, 1987). Por otro lado, estudios genéticos han demostrado que la fidelidad por herencia materna a las zonas de alimentación y rutas migratorias es una de las razones por las cuales se han mantenido hasta la actualidad las estructuras poblacionales únicas de cada región (Pomilla & Rosenbaum, 2005; Baker & Clapham, 2004; Baker et al., 1990).

### **1.2.3 Uso de hábitat**

Las ballenas jorobadas habitan por lo general aguas localizadas sobre la plataforma continental o a lo largo de sus bordes y en ciertas ocasiones alrededor de algunas islas. Aunque las ballenas jorobadas se caracterizan por una alta movilidad, las hembras con crías recién nacidas prefieren aguas someras y tranquilas en sitios como pequeñas bahías (González, 2002; Constanza, 2003). Esto ha sido atribuido a las ventajas para la crianza, buscando minimizar la amenaza de depredación y evitar el acoso de los machos en busca de apareamiento (Flórez-González et al., 2007).

Mientras se alimentan, las ballenas jorobadas permanecen periodos largos (hasta de varios meses) en áreas específicas, sin exhibir una fidelidad espacial rígida, como sucede en el

caso de animales territoriales. Pueden mostrar movimientos considerables y eventualmente abandonar temporalmente los sitios de alimentación en respuesta a cambios o disminuciones en la disponibilidad de presas (Flórez-González et al., 2007).

La migración anual de las ballenas es un asunto de presupuesto energético. Durante el invierno las aguas se vuelven muy frías y su productividad disminuye considerablemente. Las ballenas al quedarse en estas aguas, gastarían una enorme cantidad de energía para mantener sus funciones metabólicas a una temperatura constante, que no la podrían recuperar con el escaso alimento disponible. La migración les permite permanecer durante varios meses en aguas más cálidas, gastando menos energía para regular su temperatura corporal y en su lugar utilizarla en la reproducción (Clapham, 1996; Félix, 2003).

### **1.3 Estructura poblacional y distribución**

La ballena jorobada es considerada una especie cosmopolita que se encuentra distribuida en todos los océanos del mundo, aunque es poco común en el Ártico (Clapham, 1996; González, 2002). Se considera que las ballenas jorobadas están presentes en las tres principales cuencas oceánicas: Océano Austral, Atlántico Norte y Pacífico Norte (Baker et al., 1993; González, 2002). Según las conexiones migratorias entre las zonas de distribución invernal y de verano, cada población a su vez se divide en stocks o subpoblaciones, que son unidades demográficas relativamente aisladas entre las que puede existir flujo génico (Baker et al., 1986; González, 2002).

La estructura de la población de ballenas jorobadas varía entre los diferentes océanos. Las ballenas jorobadas en el Hemisferio Norte generalmente se alimentan en subpoblaciones

relativamente discretas en el verano, pero se mezclan en áreas de reproducción comunes en el invierno (Clapham, 2000). En el Atlántico Norte existen cuatro principales agrupaciones de alimentación: el Golfo de Maine, Este de Canadá, Groenlandia Occidental y Atlántico Nororiental. Las ballenas de todas estas agregaciones de alimentación migran cada invierno a las Indias Occidentales (Antillas y Bahamas), donde se aparean (Clapham, 2000; González, 2002; Olavarría, 2008). En el Pacífico Norte, las ballenas jorobadas que se alimentan en las aguas de Alaska migran principalmente a las aguas hawaianas. Aquellas que se alimentan a lo largo de las costas de California, Oregon y Washington migran principalmente a las áreas de reproducción mexicanas de la península de Baja California y México continental (Clapham, 2000; Olavarría, 2008). Algunas ballenas jorobadas migran más al sur, llegando a las costas de Costa Rica donde pueden encontrarse con ballenas del Pacífico Sur (González, 2002; Palacios-Alfaro et al., 2012). Además, dentro de este océano existe una subpoblación occidental o asiática que se alimenta en la Isla de Honshu, el Mar de Okhotsk, la Península de Kamchatka y las Islas Aleutianas Occidentales. Esta subpoblación se reproduce en las costas al sur de Japón, sur de China y Corea y alrededor de islas en las Filipinas Orientales (González, 2002).

En el Hemisferio Sur, las ballenas jorobadas se distribuyen en subpoblaciones relativamente discretas tanto en el invierno como en el verano (Clapham, 2000). La Comisión Ballenera Internacional (CBI), ha dividido a esta población en siete subpoblaciones reproductoras (stock A-G) y seis zonas de alimentación alrededor de la Antártica (I-VI) (IWC, 2005) (Tabla 1). Las ballenas de la población reproductora del Pacífico Sudoriental que corresponden al stock G (Costa Rica, Panamá, Colombia y Ecuador) migran hacia el área de alimentación I. La población reproductora del Atlántico Sudoccidental del stock A en la costa de Brasil, migra al Área II. Las ballenas del Atlántico Sudoriental del stock B en la costa de

África Occidental desde el Golfo de Guinea hasta Sudáfrica, migran a las áreas II y III. La población del Índico Suroccidental del stock C en las costas del este de Sudáfrica, Mozambique y Madagascar, migran al Área III. Las ballenas del Océano Índico Suroriental del stock D en el Noroeste de Australia, migran hacia al área IV. Las ballenas que se reproducen en el Pacífico Occidental del stock E en el Noreste de Australia, Nueva Caledonia, Tonga y Fiji, migran hacia el Área V. Finalmente, la población del Pacífico central del stock F en las Islas Cook y Polinesia Francesa está conectada con el Área VI (Olavarría, 2008; Flórez-González et al., 2007).

Estudios realizados con la región control de ADN mitocondrial han determinado que los linajes maternos están estructurados en 4 clados principales: AE, CD, IJ y SH (Baker et al., 1990; 1993; Engel et al., 2008; Olavarría et al., 2008). Cada población oceánica está dominada, en términos de frecuencia y diversidad, por un clado diferente, el clado AE es el más abundante en el Pacífico Norte sugiriendo que esta es su región de origen. El clado CD está presente en las tres poblaciones oceánicas pero es más numeroso en el Océano Austral. El clado IJ es más abundante en el Atlántico Norte pero se lo puede encontrar también en todo el Océano Austral siendo más abundante en las costas Australianas (González, 2002; Baker et al., 1993). Finalmente, el clado SH se lo puede encontrar en todas las poblaciones del Hemisferio Sur a excepción de las ballenas del stock G (Engel et al., 2008; Olavarría et al., 2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2007, 2012).

#### **1.4 Ballenas jorobadas en el Pacífico Sudeste**

La población de ballenas jorobadas en el Pacífico Sudeste tiene un ámbito de distribución bastante extenso, incluyendo las áreas de reproducción en Ecuador, Colombia,

Panamá, Costa Rica, Perú y las zonas de alimentación en el Estrecho de Magallanes en el sur de Chile, y a lo largo de la costa oeste de la Península Antártica (Flórez-González et al., 2007; Félix et al., 2009; Félix y Haase, 2005; Félix, Caballero y Olavarría., 2007; Félix et al., 2009). Actualmente se sabe que desde mediados de junio hasta finales de noviembre la mayoría de la población de ballenas jorobadas del stock G, se localiza en las aguas tropicales y subtropicales a lo largo de los 1.400 km de la Costa Occidental de Sudamérica y parte de Centroamérica, entre el sur de Costa Rica y el norte de Perú (Flórez-González et al., 2007).

En diferentes estudios se ha encontrado que las ballenas jorobadas ubicadas en el Estrecho de Magallanes, son una población discreta de alimentación, ya que no existen reavistamientos de las mismas con la población de la Península Antártica (Acevedo *et al.*, 2007; Flórez-González et al., 2007; Hucke-Gaete et al., 2013). Las ballenas jorobadas del Estrecho de Magallanes muestran un mayor intercambio con las regiones de Panamá y Costa Rica que con el Ecuador y Colombia. Se ha propuesto que las ballenas jorobadas que se encuentran en la zona de alimentación más hacia el sur cerca de la Península Antártica, viajan principalmente a las áreas de reproducción en Colombia y Ecuador, mientras que las ballenas que se encuentran en las áreas de reproducción más septentrionales en Panamá y Costa Rica viajan al área de alimentación en el Estrecho de Magallanes (Acevedo, Aguayo-Lobo & Pastene, 2006; Acevedo *et al.*, 2007; Félix et al., 2009). Por otro lado se ha encontrado por medio de estudios genéticos con ADN mitocondrial, que no existe una diferenciación genética entre las ballenas de la zona de alimentación de la Península Antártica y las zonas de reproducción de Colombia y Ecuador (Acevedo et al., 2007; Félix, Caballero y Olavarría, 2007; Olavarría et al., 2007; Flórez-González et al., 2007; Félix et al., 2009) y que las ballenas del Estrecho de Magallanes conforman una agrupación genéticamente diferente de la zona de

alimentación Antártica (Olavarría, 2008; Flórez-González et al., 2007; Olavarría et al., 2007). Es decir, existe heterogeneidad en la distribución de las ballenas jorobadas en el Pacífico Sudeste (Olavarría *et al.*, 2006; Acevedo *et al.*, 2007). Por otro lado, por medio de diferentes estudios genéticos en diferentes regiones del Pacífico Sudeste (Colombia, Ecuador, Estrecho de Magallanes, la Península Antártica), se ha comprobado que la diversidad genética de las ballenas de estas zonas es la más baja del Hemisferio Sur (Félix et al., 2006, 2007; Olavarría et al., 2006, 2007, 2008).

Las ballenas jorobadas que se distribuyen en el mar peruano, se las puede encontrar durante diferentes meses a lo largo del año. En un estudio realizado por Pacheco, Silva y Alcorta (2009), se encontró que esta zona es usada para reproducción así como un destino migratorio de las ballenas jorobadas. Por otro lado, se han registrado avistamientos realizados en meses de verano frente al Perú donde las ballenas se alimentan (Flórez-González et al., 2007; Pacheco, Silva y Alcorta, 2009). Se sugiere que no todos los animales de esta población completan la migración anual, y que algunos pueden permanecer al sur de la zona de cría, o al norte del área de alimentación en las aguas altamente productivas de la corriente de Humboldt frente a Perú y Chile (Félix, Caballero & Olavarría, 2012). En otro estudio realizado por Hucke-Gaete et al. (2013), se encontró algo similar cuando se obtuvieron registros de ballenas alimentándose en el Norte de la Patagonia, y se propuso que una fracción de la población de ballenas jorobadas del Pacífico Sudeste no completa su ciclo migratorio para explotar diferentes centros productivos a lo largo del Pacífico Suroriental. Este comportamiento ha sido observado igualmente en la población de ballenas jorobadas de la zona de alimentación Antártica V, donde varias hembras no completaban su ciclo migratorio anual al área de reproducción en el Noreste de Australia (Brown et al., 1995). De igual manera, en un estudio

realizado por Opzeeland et al. (2013), se encontró que ballenas jorobadas dentro de la Península Antártica, específicamente al sur del Mar de Weddell, se quedan invernando en esta zona, en vez de completar su ciclo migratorio anual hacia el área de reproducción en la costa de África Occidental. Una de las razones por las que se piensa que ciertas ballenas no completan su migración, es debido a que algunas hembras, al no alcanzar su madurez sexual prefieren quedarse en estas zonas alimentándose para maximizar su crecimiento (Brown et al., 1995; Opzeeland et al., 2013).

Movimientos individuales se han documentado entre Ecuador y Colombia, Colombia y Panamá, Ecuador y Perú, Colombia y Perú, Ecuador y Costa Rica, lo que indica que el intercambio de individuos entre estas áreas se produce regularmente (Flórez-González et al., 1998; Félix et al., 2009). El área de reproducción en Costa Rica es visitada por dos poblaciones de ballenas jorobadas: la población del Pacífico Norte que proviene de la costa de Oregon y California, y la población del Pacífico Sur (Palacios-Alfaro et al., 2012). Se ha sugerido que existe un flujo ocasional de material genético entre estas poblaciones, ya que se han avistado individuos de ambas poblaciones en la misma área durante los meses de apareamiento. (Flórez-González *et al.*, 1998; Flórez-González et al., 2007). En algunos estudios se ha encontrado que el clado AE característico de las poblaciones del Pacífico Norte, está también presente en poblaciones de Colombia, lo que podría sugerir un intercambio genético entre poblaciones del Pacífico Norte y Sur (Flórez-González *et al.*, 1998 ; Olavarría, 2008).

### **1.5 Ballenas jorobadas en el Ecuador**

Las ballenas jorobadas visitan las costas ecuatorianas entre finales de Mayo y Octubre, con picos de abundancia en los meses de Julio y Agosto (Constanza, 2003; Scheidat et al., 2000; Flórez-González et al., 2007; Félix y Haase, 2001). Se ha registrado que a mediados de Agosto es cuando ocurren la mayoría de nacimientos, y a partir de este momento es cuando las madres comienzan a buscar zonas de poca profundidad para llevar a sus crías (Félix, 2003; Félix & Haase, 1998). Por esta razón cuando las madres con crías comienzan su viaje a la Antártida al final de la temporada de reproducción (fines de septiembre y octubre), lo hacen bordeando la costa y es posible observarlas en muchos sitios desde la orilla (Félix, 2003).

Se ha observado que en Ecuador, las ballenas jorobadas muestran una fidelidad muy baja a diferentes sectores estudiados como Puerto Cayo, Isla de la Plata, Bajo de Cantagallo y Puerto López (Félix & Haase, 2001; Félix & Haase, 1998; Félix, 2003; Constanza, 2003), tanto por el reducido número de individuos que se recapturan entre años consecutivos como dentro de una misma temporada reproductiva. Se sugiere que la ausencia de reavistamientos, se debe a que las ballenas no permanecen mucho tiempo en las diferentes áreas de estudio, ya que prefieren aguas más calientes al norte y menos profundas (Félix y Haase, 1998, 2001). Sin embargo, en el estudio realizado por Gladek (2013) en el área de reproducción de Esmeraldas y el Parque Nacional Machalilla, desde la temporada de 1996 hasta el 2012, se encontró que existe una tasa anual de retorno promedio de 49%, por lo que se sugiere que las ballenas jorobadas que visitan las costas ecuatorianas presentan en realidad una alta fidelidad de sitio, contradiciendo hallazgos anteriores. Además en este estudio se encontró que entre los años de 1996 al 2004, las ballenas se quedaban un promedio de 17,2 días en las diferentes zonas de reproducción, lo cual también es un tiempo de ocupancia más alto que los encontrados en

otros estudios (Félix & Haase, 2001, 2005; Scheidat et al., 2000; Constanza, 2003). Se sugiere que estos hallazgos se deben a que se ha dado un mayor esfuerzo al momento de monitorear a las ballenas y también a que la recolección de muestras se realizó cuando las ballenas jorobadas de esta zona ya no se encontraban en tránsito (Gladek, 2013).

La población de ballenas jorobadas del Ecuador pertenece a la zona del Pacífico Sudeste, o el stock G (Félix et al., 2009; Acevedo et al., 2007). Estudios genéticos realizados tanto en Galápagos como en Ecuador continental, han demostrado que existe panmixia con la población de Colombia. Además se ha establecido a la Península Antártica como la principal zona de alimentación para estas poblaciones, debido a su alta relación genética (Félix et al., 2006; Félix, Caballero y Olavarría, 2007, 2012). Por otro lado, se ha encontrado que las ballenas jorobadas de Ecuador tienen una mayor proporción de haplotipos únicos comparada con los de Colombia y que presentan una alta variabilidad genética al compararlas con ballenas del Estrecho de Magallanes (Félix et al., 2006; Félix, Caballero y Olavarría, 2007, 2012).

## **1.6 Análisis moleculares**

Avances en análisis genéticos moleculares en las últimas décadas han proporcionado más información sobre la segregación de las poblaciones de ballenas jorobadas y ayudado a identificar la estructura poblacional de los diferentes stocks reproductivos alrededor del mundo (Olavarría, 2008). Para lograr esto, se han desarrollado dispositivos para la toma de biopsias (Flórez-González et al., 2007) y técnicas de laboratorio como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una enzima termoestable (Saiki et. al 1988). De esta manera se ha logrado el uso de muestras de tejido muy pequeñas para la amplificación in vitro de varias

copias de fragmentos de ADN específicos, que se pueden usar para caracterizar la variación en la secuencia entre individuos, con técnicas como los AFLPs, RFLPs, secuenciación, entre otros (De Vienne, Santoni y Falque, 2003). Por otro lado, gracias a estas herramientas se ha logrado identificar el sexo en ballenas jorobadas, lo cual es bastante difícil debido a la falta de dimorfismos sexuales evidentes (Palsboll et al., 1992).

El material genético en las células eucariotas animales se encuentra en el núcleo (ADN nuclear) y fuera de él (ADN mitocondrial). El ADN mitocondrial tiene diferentes características que lo hacen muy atractivo para ser usado como un marcador molecular: herencia materna (no se recombina), evoluciona a un paso rápido, fácil de aislar y tiene una estructura genética simple (sin intrones, ADN repetitivo, elementos transponibles) (Awise et al., 1985; Galtier et al., 2009; Baker et al., 1993). A diferencia de lo que sucede con moléculas de ADN nuclear, las mutaciones en el ADN mitocondrial que aparecen en diferentes individuos, no se recombinan durante la reproducción sexual (Awise et al., 1985; Galtier et al., 2009; Bermingham y Moritz, 1998), y esto se debe a que cuando un óvulo es fertilizado, las células del embrión resultante contienen el ADN mitocondrial y el citoplasma del óvulo, y no del espermatozoide. Varios estudios han indicado que existen diferentes mecanismos para remover el ADN mitocondrial paterno que pueda quedarse al realizarse la fecundación. El más frecuente sucede cuando las mitocondrias paternas son marcadas con ubiquitina y después son destruidas en el proteosoma (Chan & Schon, 2012). Además, se da una segregación vegetativa, eliminando de forma eficaz la heteroplasmia en la mitosis, por lo que los individuos poseen por lo general sólo un haplotipo del ADN mitocondrial (homoplasmia) (White et al., 2008). Otros estudios han sugerido que la parte que evoluciona más rápido del genoma mitocondrial es la región control no codificante o D-loop. Esto se debe a que existe

una tasa alta de mutación debido al patinaje de la polimerasa y que la reparación en el genoma mitocondrial es ineficaz (Hoelzel et al., 1991; Avise, 1998; Galtier et al., 2009; White et al., 2008). Esta molécula es fácil de aislar ya que dentro de la célula existen cientos de mitocondrias y en cada mitocondria varias copias de ADN mitocondrial, por lo que hay más copias de ADN mitocondrial en las células que otros tipos de ADN (Galtier et al., 2009).

Debido a todas las razones antes explicadas, el ADN mitocondrial ha sido útil para la reconstrucción filogenética de los linajes maternos en las poblaciones de ballenas jorobadas (Baker et al., 1990,1993, 1998a). Al realizar diferentes análisis con la región control, se ha encontrado que la fidelidad por herencia materna a diferentes zonas de alimentación y rutas migratorias ha permitido estructurar las poblaciones de ballenas jorobadas en 4 clados principales: AE, CD, IJ y SH (Pomilla & Rosenbaum., 2005; Baker & Clapham 2004; Baker et al., 1990,1998b). Además al realizar análisis de diferenciación entre poblaciones basándose en la frecuencia de haplotipos de ADN mitocondrial, se ha logrado establecer estructuras poblacionales tanto dentro de las poblaciones y entre las poblaciones de cada cuenca oceánica (Baker et al., 1990,1993, 1998a).

El ADN nuclear se ha utilizado como complemento al ADN mitocondrial en estudios realizados para establecer diferencias entre poblaciones de ballenas jorobadas. Estos análisis han utilizado microsatélites e intrones de actina (González, 2002; Olavarría, 2008). Los análisis con marcadores nucleares han apoyado la división genética de los diferentes clados entre cada cuenca oceánica, pero no la diferenciación de regiones dentro de las mismas, como los hacen los marcadores mitocondriales. En un estudio realizado por Baker et al. (1998b), se encontró que a escala global, los marcadores microsatélites proporcionan estimaciones

inconsistentes de distancias genéticas dentro y entre poblaciones oceánicas. Además las secuencias nucleares típicamente evolucionan más lentamente que el ADN mitocondrial, por lo que las distintas poblaciones difieren en las frecuencias de genes mitocondriales con mayor rapidez que lo hacen para los alelos nucleares (Palumbi y Cipriano, 1998).

El presente estudio es la segunda fase de una investigación que evalúa la diversidad genética y conectividad de las ballenas jorobadas en el área de “Bajos de Atacames” en Esmeraldas. Se analiza la región control del ADN mitocondrial de las muestras obtenidas en la temporada del 2012, con el fin de contribuir con la caracterización de las ballenas jorobadas en esta región, para comprender sus rutas migratorias y posibles intercambios con poblaciones tanto dentro del mismo stock G como con diferentes áreas reproductivas dentro del Hemisferio Sur. Este estudio puede ser empleado para entender la heterogeneidad en la distribución de las ballenas del stock G.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Evaluar el grado de diversidad genética, conectividad y fidelidad de las ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) del área de reproducción “Bajos de Atacames” en la provincia de Esmeraldas, Ecuador.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar la diversidad genética de las ballenas jorobadas en el área de reproducción de Esmeraldas, con muestras obtenidas en la temporada 2012, por medio del análisis de la región control del ADN mitocondrial.
- Comparar la diversidad genética de las ballenas jorobadas del área de reproducción de Esmeraldas, temporada 2012 con la de diferentes poblaciones dentro del Hemisferio Norte y Sur.
- Establecer la relación machos-hembras de las ballenas jorobadas en la temporada 2012.
- Determinar las diferencias de fidelidad entre machos y hembras de las ballenas jorobadas para las temporadas 2010, 2011 y 2012.
- Comparar los resultados obtenidos en la temporada 2012 con los de la primera fase de investigación de diversidad genética y conectividad de las ballenas jorobadas en el área de “Bajos de Atacames” en Esmeraldas durante las temporadas 2010 y 2011.

### 3 JUSTIFICACIÓN

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) es un mamífero marino migratorio, que está distribuido en todos los océanos de mundo (Baker et al., 1993). Su población mundial fue drásticamente reducida producto de la cacería comercial para obtener su aceite durante los dos últimos siglos. Antes de su protección mediante un acuerdo internacional en el año 1966, la población mundial de ballenas jorobadas se había reducido a menos de 5000 individuos, con algunas subpoblaciones regionales reducidas a menos de 200 individuos (Baker et., 1993; Constanza, 2003; Félix, 2003). En la actualidad, las diferentes poblaciones han comenzado una lenta recuperación, y ya no es considerada una especie vulnerable por la IUCN (Reilly et al., 2008). Se estima que la población de ballenas jorobadas en el Hemisferio Sur es de 34000 a 52000 individuos, y específicamente en el Pacífico Sudeste es de alrededor de 3000 a 4000 individuos (Olavarría, 2008). A pesar de que diferentes leyes y acuerdos protegen a las ballenas jorobadas de la explotación directa, no existen regulaciones para actividades que puedan lastimarlas o matarlas indirectamente, tales como la pesca incidental y la contaminación ambiental. Con cierta frecuencia es posible observar ballenas que tienen enredadas sus colas y aletas pectorales en mallas de pesca, que terminan muriendo por agotamiento o varadas en la playa (Félix & Haase, 2005). Otros problemas menos evidentes, a largo plazo para las ballenas, incluyen: la contaminación del mar con residuos industriales y pesticidas, barcos y botes artesanales que interfieren con actividades sociales de las ballenas jorobadas como el apareamiento y comunicación, entre otros (Félix, 2003). En las últimas décadas se han realizado diferentes estudios para poder entender aspectos de su biología e historia natural, de tal manera que se puedan implementar iniciativas para su conservación

(Flórez-González et al., 2007). Por medio de estudios genéticos usando la región control del ADN mitocondrial se ha logrado comprender de mejor manera aspectos como la estructura poblacional, movimientos migratorios y el posible intercambio de individuos entre poblaciones (Olavarría, 2008). En el Ecuador la población de ballenas jorobadas que llega a sus costas en la temporada de apareamiento no está del todo determinada, y aún se desconocen diferentes aspectos como: sus rutas migratorias, número poblacional, conexión con otras subunidades del Pacífico Sur, límites de desplazamiento, entre otros (Constanza, 2003). Se ha propuesto que la costa del Pacífico Sudeste es una vía probable para el flujo de genes entre los océanos, ya que se han encontrado haplotipos únicos del Pacífico Norte en la población de ballenas jorobadas de Colombia, perteneciente al stock G (Baker et al., 1990, 1993; Olavarría, 2008). Por otro lado, en un estudio realizado por Stevick et al. (2011), se encontró que una ballena hembra con su cría realizó un viaje interoceánico desde Puerto Cayo en Ecuador (stock G) hasta Abrolhos Bank en Brazil (stock A), por lo que es posible que exista flujo génico entre estas dos áreas reproductivas. En este estudio (temporada 2012), que constituye la segunda fase de una investigación iniciada en el 2010, que evalúa la diversidad genética y conectividad de las ballenas jorobadas en el área de reproducción de Esmeraldas, se busca complementar la información existente sobre la composición de haplotipos y la variabilidad genética de la población de ballenas jorobadas que visitan las costas ecuatorianas, y al mismo tiempo comprender sus rutas migratorias, fidelidad y posible heterogeneidad en la distribución de ballenas jorobadas del Pacífico Sudeste.

## **4 ÁREA DE ESTUDIO**

Las ballenas jorobadas visitan las aguas costeras de Esmeraldas durante los meses de Junio hasta Septiembre y parte de Octubre (Constanza, 2003). La recolección de muestras en este estudio se realizó desde los meses de Junio hasta Agosto del 2012, en la región costera del cantón Atacames en la provincia de Esmeraldas, en un área conocida como “Bajos de Atacames” (Figura 1). Esta área se extiende desde la desembocadura del río Esmeraldas (N 0°59'54,1'' – W 79°38'37,7''), hasta la desembocadura del río Muisne (N 0°37'3,9''- W 80°02'01,9''), donde la temperatura promedio del agua de mar es de 26° C (INOCAR, 2012; Fernández, 2009). Los análisis moleculares fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

## **5 MATERIALES**

### **5.1 Recolección de muestras de piel de ballenas jorobadas.**

- Rifle modificado de calibre 0.22 (Paxarm)
- Dardos de biopsia (Paxarm)
- Tubos eppendorf para recolección de muestras
- Etanol, 70%

### **5.2 Análisis moleculares**

#### *5.2.1 Extracción de ADN de ballenas jorobadas*

- Muestras de tejido epitelial (ballena jorobada)

- Nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>)
- Buffer de extracción CTAB 2X
- 2, β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- Cloroformo- Alcohol isoamílico (24:1)
- Isopropanol (- 20°C)
- Etanol 70%
- Buffer TE (Tris base 10mM (Invitrogen), EDTA 1mM (Invitrogen), pH 8.0).
- Cama de arena Multi-Blok Heater (ThermoScientific)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf).

### 5.2.2 *Cuantificación de ADN*

- NANODROP 1000 (ThermoScientific)
- Buffer TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)

### 5.2.3 *Electroforesis en geles de agarosa*

- SeaKem LE Agarose
- TBE 1X (Tris base -Acido Borico- EDTA)
- SYBR Safe ADN gel stain (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Ladder ADN 100 bp (Invitrogen)
- MGU-502T Electrophoretic Gel System (Scientific Co)

- Fuente de Poder EPS -300 II ( C.B.S Scientific)
- Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD)

#### *5.2.4 Determinación de sexo de ballenas jorobadas*

- Tris 20 mM pH 8.4 (Invitrogen)
- KCl 50 mM
- MgCl<sub>2</sub> 2 mM (Invitrogen)
- dNTPs 200 μM (Invitrogen)
- 0.5 mg/ml BSA (Invitrogen)
- 0.5 μM de cada primer (SFY1204 / SFY0097)
- Taq DNA polimerasa 0.4 U (Invitrogen)
- Taq 1 endonucleasa de restricción 10 U (Invitrogen)
- T Personal Thermocycler (Biometra)

#### *5.2.5 Análisis de ADN mitocondrial de ballenas jorobadas*

- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> 2 mM (Invitrogen)
- dNTPs 200 μM (Invitrogen)
- 20 pmol de cada primer (t-Pro whale Dlp 1.5 / Dlp 8)
- Taq DNA polimerasa 1 U (Invitrogen)
- T Personal Thermocycler (Biometra)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)

### 5.3 Análisis estadísticos

- Software Mega version 5 (Tamura *et al.*, 2011)
- Software Arlequín version 3.5. (Excoffier, Laval & Schneider, 2005).

## 6 MÉTODOS

### 6.1 Recolección de muestras de piel de ballenas jorobadas

Veintidós muestras de piel de ballenas jorobadas se obtuvieron durante los meses de Junio a Agosto del 2012 en la provincia de Esmeraldas, Ecuador, por medio del sistema de toma de muestras de biopsias Paxarm (Krutzen *et al.*, 2002). Todas estas muestras fueron recolectadas y entregadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito por Judith Denkinger (profesora de la USFQ). El método de recolección consistió en que cuando se observaba a una ballena objetivo, el dardo era disparado hacia la región flanqueante de la ballena. Al hacer impacto, la punta del dardo penetraba la piel y retenía una muestra de aproximadamente 3 cm, que posteriormente se recolectaba del agua. El grupo encargado de la recolección de muestras de esta temporada (2012), intentó obtener más muestras de hembras que de machos. Para esto, buscaron acercarse más al animal nuclear (hembra) y evitar a los escoltas (machos).

La punta del dardo era eliminada con fórceps y posteriormente se obtenían las muestras de tejido adiposo y epitelial. Estas muestras fueron almacenadas en tubos de recolección con etanol al 70%. Cada muestra fue etiquetada con su código correspondiente, la fecha y ubicación del punto de recogida junto con el código de fotografía. Los individuos fueron fotografiados con el fin de evitar la posibilidad de tener duplicados de un mismo individuo.

Las muestras fueron refrigeradas en el campo y después transportadas al laboratorio. Finalmente fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su preservación a largo plazo.

## **6.2 Análisis moleculares**

### *6.2.1 Extracción de ADN de las muestras recolectadas de ballenas jorobadas*

La extracción del ADN genómico de las muestras se realizó siguiendo el protocolo de Kieleczawa (2006) basado en el detergente CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio). Se trituraron 100 mg de cada muestra de tejido, con nitrógeno líquido, utilizando un mortero y pistilo limpios. Después se añadió 800  $\mu\text{l}$  de CTAB 2X y se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml rotulado. En el tubo rotulado, se agregaron 8  $\mu\text{l}$  de 2,  $\beta$ -mercaptoetanol y se homogeneizó la muestra. Cada tubo se incubó a  $62^{\circ}\text{C}$  durante una hora, invirtiendo los tubos cada 10 minutos. Después de la incubación, se añadió 500  $\mu\text{l}$  de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se homogeneizó nuevamente. La mezcla se centrifugó durante 20 minutos a 13200 rpm. Posteriormente, se trasladó 500  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf estéril. A continuación, se añadió un volumen equivalente de isopropanol frío y se homogeneizó la muestra suavemente. Luego, se centrifugó por cinco minutos a 5000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 800  $\mu\text{l}$  de etanol al 75% para lavar el pellet. Se agitó el tubo hasta que el pellet se despegara de la base del mismo y el volumen de etanol colocado fue removido cuidadosamente con una micropipeta. Se dejó secar el pellet dentro de una cámara de flujo laminar. Finalmente, se resuspendió el pellet en 50-70  $\mu\text{l}$  de buffer TE y se almacenó el ADN en una congeladora a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se determinó la concentración y calidad del ADN extraído usando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y geles de agarosa al 1%. En estos geles, se visualizó el

ADN utilizando SYBR® Safe ADN gel stain (Invitrogen) y un fotodocumentador Gel Doc XR (Biorad).

### 6.2.2 *Determinación de sexo de ballenas jorobadas*

Se amplificaron las regiones SFY/SFX del genoma de ballenas jorobadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al., 1988). El volumen de reacción fue de 20 µl y consistió en 20mM Tris pH 8.4, 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 200 uM dNTPs, 0,5 mg/ml BSA, 0,5uM de cada primer (SFY1204/SFY0097), 40 ng de ADN y 0,4 unidades de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) (Pallsboll *et al.* 1992, con modificaciones). El programa de amplificación se efectuó en un termociclador Biometra T-Personal y consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, annealing a 60°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 4 minutos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Se usó ADN humano de mujer como control positivo. Posteriormente, 5 µl del producto de PCR de cada muestra fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% con 2 µl de SYBR Safe a 100V por 45 minutos. Una amplificación correcta mostró una banda de aproximadamente 1100pb (Pallsboll *et al.*, 1992).

Una vez que se comprobó que la reacción de PCR fue exitosa, 10 µl del producto de PCR fueron digeridos con 10 unidades de la enzima de restricción Taq 1(Invitrogen) por 1 hora a 60°C. Los fragmentos de la restricción fueron separados y visualizados en un gel de agarosa al 3% (50 ml de TBE 1X, 1.5 g de agarosa y 2 µl de SYBR® Safe Invitrogen) a 80 V por 1 hora y media. Se determinó el sexo de acuerdo con los patrones de fragmentos de restricción. La digestión enzimática de ADN de ballenas hembra generó fragmentos de 439 pb mientras que la digestión del ADN de los machos produjo fragmentos de dos tamaños

diferentes, uno de 439 pb y otro de 621 pb. El patrón de fragmentos de restricción del control positivo (ADN humano de mujer) era similar al de las ballenas macho, es decir se generaron fragmentos de aproximadamente 439 pb y 621 pb (Pallsboll et al. 1992).

### *6.2.3 Análisis de la región control de ADN mitocondrial de ballenas jorobadas*

A partir del ADN extraído, se amplificó un fragmento de aproximadamente 500 pb de longitud de la región de control del ADN mitocondrial mediante PCR (Saiki et. Al 1988). Se utilizaron los primers: t-Pro-whale Dlp1.5 (5'TCACCCAAAGCTGRARTTCTA-3') y Dlp8 (5'CCATCGWGATGTCTTATTTAAGRGGAA-3') (Baker et al, 1998a; Olavarría et al, 2007; Félix, Caballero y Olavarría, 2012). Para cada reacción de PCR con volumen final de 50 µl se usó Buffer de PCR 1X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTPs, 20 pmol de cada primer, 1U de Taq polimerasa (Invitrogen), y 50 ng de ADN. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T-Personal Biometra. Los perfiles de temperatura consistieron en un período inicial de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, 36 ciclos de 94°C durante 30 segundos, hibridación del primers a 55,5°C durante 1 minuto, extensión de la polimerasa a 72°C durante 1 minuto con 30 segundos, y una extensión final a 72 ° C durante 5 minutos (Félix, Caballero y Olavarría, 2007 con modificaciones; Dalgo, 2013).

Con el fin de verificar la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (50 ml de TBE 1X, 0,5 g de agarosa y 2 µl de SYBR safe) a 80 V por 1 hora. Se utilizó 10 µl del producto de PCR y 3 µl de Blue Juice 10X (Invitrogen) (Dalgo, 2013) (Figura 2).

Los productos de PCR se cuantificaron a través del espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y se enviaron a Functional Biosciences, Inc. (Madison EE.UU.), donde

fueron limpiados utilizando el protocolo de Exo / Sap (Affymetrix, Inc.) y secuenciados en ambas direcciones con un secuenciador de ADN ABI 3730xl.

Las secuencias amplificadas por el primer DIP 1.5 (light strand) fueron alineadas utilizando el sistema “ClustalW” del programa Mega 5 (Tamura et al., 2011), que utiliza los métodos de alineación progresiva. En estos métodos, las secuencias más similares son las que se alinean primero. A partir de esto, se alinean progresivamente los grupos de secuencias más distantes hasta que se obtiene una alineación global (Thompson et al., 1994). Las secuencias fueron recortadas a 469 pb (comenzando desde la posición 6 de la secuencia referencial de la región control de la ballena jorobada X72202) con el fin de coincidir con una región consenso analizada anteriormente (Olavarría et al, 2006; 2007; Félix, Caballero y Olavarría, 2012; Dalgo, 2013). Esta región cuenta con más del 85% de la variación de la región de control del ADN mitocondrial de las ballenas jorobadas (Baker & Medrano-González, 2002 citado por Olavarría, 2008). Cuando se realizó la alineación, a todas las secuencias les faltaban datos al comienzo, es decir, no todas comenzaban desde la posición 6, sino que comenzaban desde posiciones posteriores (ej: desde la posición 15 de la alineación). Por esta razón, se completó las secuencias utilizando la opción “View/Edit trace Data from DNA sequences”, proporcionada por el programa Mega 5 (Tamura et al., 2011). Con esta opción, es posible observar diferentes picos de colores que corresponden para cada letra de la secuencia, donde el negro en este caso era para guanina, el rojo para timina, el azul para citosina y el verde para adenina. De esta manera, las secciones sin letras, fueron completándose en base al color predominante de cada posición correspondiente. Con las secuencias completas, éstas fueron alineadas una vez más como se mencionó anteriormente.

Posteriormente, se realizó una búsqueda en el GenBank con la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) proporcionada por la página web del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). Se seleccionó el algoritmo para secuencias muy similares (megablast), con el fin de identificar los haplotipos presentes en las ballenas jorobadas de este estudio. Luego, se construyó un árbol filogenético usando el método de Neighbor Joining implementado en el programa Mega 5, utilizando la opción Kimura 2-parameter model y 1000 replicaciones bootstrap. La secuencia de la ballena “rorcual común” (fin whale) (número de accesoión X61145; Árnason et al, 1991) se incluyó en el árbol para la comparación debido a su relación taxonómica cercana (Rosenbaum *et al.*, 2009; Dalgo, 2013). Los haplotipos identificados previamente en las poblaciones del Pacífico Sur (Olavarría, 2008), así como secuencias de Alaska (Jackson et al., 2009), Brasil (Engel et al., 2008), y el Atlántico Sur y Océano Índico (Rosenbaum et al., 2009) fueron incluidas para la reconstrucción filogenética, con el fin de obtener una distribución clara de los clados existentes.

### 6.3 Análisis estadísticos

La diversidad genética dentro de la población se calculó a nivel de haplotipos (H) y de nucleótidos ( $\pi$ ) en el programa Arlequin 3.5 (Excoffier et al. 1992). La diversidad de haplotipos (también conocida como la diversidad de genes) representa la probabilidad de que dos haplotipos muestreados al azar sean diferentes, mientras que la diversidad de nucleótidos se define como el número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio, en comparaciones por pares, entre secuencias de ADN (Shane, 2005).

La diferenciación entre áreas de reproducción se realizó usando un análisis de varianza molecular implementado en el programa Arlequin 3.5 (Excoffier et al. 1992). Con esta opción

se calcularon las diferencias en las frecuencias de haplotipos (FST) y la diferenciación de nucleótidos ( $\Phi$ ST). La significancia de los valores obtenidos se comprobó usando 5000 permutaciones aleatorias de la matriz de datos.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Determinación de sexo de ballenas jorobadas**

De las 22 muestras de piel de ballenas jorobadas que se analizaron, 8 fueron hembras, 13 machos y 1 individuo no pudo ser identificado (muestra 58), debido a la poca cantidad de ADN de esta muestra. La proporción de sexos fue de 1,6:1 (machos: hembras) ( $\chi^2 = 1,136$   $p < 0,05$ ) (Tabla 2, Anexo1) (Figura 3 y 4). En la primera fase de este estudio de las 35 muestras recolectadas, 4 fueron hembras y 31 machos, lo cual dio una proporción de sexos de 8:1 (machos: hembras) ( $\chi^2 = 20.82$ ,  $p < 0.001$ ) (Dalgo, 2013).

### **7.2 Diversidad genética de ballenas jorobadas**

Dieciséis haplotipos diferentes fueron identificados en las 22 muestras de Esmeraldas, Ecuador de la temporada 2012 (Tabla 3, Anexo 1). Los nucleótidos variables incluyeron 39 sitios polimórficos, 1 inserción/delección, 3 transversiones y 35 transiciones. La diversidad de haplotipos ( $h \pm sd$ ) fue de  $0.9567 \pm 0.0290$ , mientras que la diversidad de nucleótidos ( $\pi \pm sd$ ) fue de  $0.0214 \pm 0.0113$  (Tabla 4). Durante la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013), en las temporadas 2010 y 2011 se identificaron 16 haplotipos diferentes en 35 muestras. La diversidad total en esa fase fue de  $1.0000 \pm 0.0068$  a nivel de haplotipos ( $h \pm sd$ ) y de  $0.0209 \pm 0.0109$  a nivel de nucleótidos ( $\pi \pm sd$ ). Las diversidades encontradas para la

población de ballenas jorobadas en Esmeraldas durante las dos fases de estudio, fueron similares a otras previamente reportadas en el Hemisferio Sur y altas en comparación a las poblaciones dentro de las áreas de alimentación y reproducción del Stock G (Tabla 5).

Cuando se compararon las muestras de ballenas jorobadas (2012) con un total de 228 secuencias de haplotipos de otras áreas de reproducción y alimentación dentro del Hemisferio Sur y un área de alimentación en el Hemisferio Norte (Alaska), 15 coincidieron con haplotipos previamente reportados. El haplotipo identificado en la muestra 38 (Sp6) no ha sido reportado antes en ningún área de reproducción o alimentación del Stock G (Olavarría, 2007,2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2006, 2007, 2012). De los 15 haplotipos reportados, tres de ellos fueron identificados por primera vez en Ecuador (SP63, SP43 y SP66) (Félix, Caballero y Olavarría, 2006, 2007, 2012).

### **7.3 Comparación de la población de Esmeraldas (2012) con otras áreas del Pacífico Sudeste.**

La frecuencia de haplotipos de la población de Esmeraldas fue comparada con la de otras zonas en el Pacífico Sudeste, tanto en áreas de reproducción (Colombia, Santa Elena) como en áreas de alimentación (Estrecho de Magallanes y la Península Antártica) (Olavarría et al., 2006, 2007). El haplotipo más común entre las ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas (2012) fue el SP90 (18,2%), el mismo que ha sido reportado como el haplotipo más común en el Pacífico Sudeste (Félix et al, 2006, 2007, 2012; Olavarría, 2008) y también fue reportado como el más común en la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013). El segundo haplotipo más común fue el SP32 (13,6%), el cual ha sido reportado igualmente como el segundo más común en Salinas, Colombia y la Península Antártica (Félix et al, 2006, 2007,

2012; Olavarría, 2008). Este haplotipo fue reportado como el tercer más común entre las muestras de la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013). El siguiente más común fue el SP63 (9,1%) reportado anteriormente en Colombia y la Península Antártica, pero por primera vez en el Ecuador (Félix et al., 2006, 2007, 2012). Los otros dos haplotipos reportados por primera vez en el Ecuador fueron el SP43 y SP66, correspondientes a individuos únicos de las muestras recolectadas (Anexo 1). El haplotipo SP43 ha sido reportado anteriormente en la Península Antártica, Colombia, Tonga e Islas Cook (Olavarría et al., 2007, 2008). El haplotipo SP66 ha sido reportado anteriormente en Colombia y la Península Antártica (Olavarría et al., 2007, 2008). Un descubrimiento interesante fue la presencia del haplotipo SP6 en las muestras ecuatorianas para la temporada 2012, que ha sido reportado anteriormente en la Polinesia Francesa, pero no en las ballenas del Pacífico Sudeste (Olavarría, 2008; Félix et al., 2006, 2007, 2012).

En general, las ballenas jorobadas de la zona costera de Esmeraldas para la temporada 2012 compartieron 12 haplotipos de 29 reportados en Salinas, Ecuador (41%) (Félix, Caballero y Olavarría, 2012), 14 de los 27 haplotipos reportados en Colombia (52%), 13 de 34 en la Península Antártica (38%), 2 de los 4 haplotipos reportados para el Estrecho de Magallanes (50%) (Olavarría, 2008) y 9 de los haplotipos reportados para la primera fase de este estudio (56%) (Dalgo, 2013) (Tabla 6).

Al comparar los haplotipos de Esmeraldas en la temporada 2012 con los de otras áreas del stock G, el AMOVA reveló una variación entre las poblaciones del 6,93% y dentro de las mismas de 93,07%. Durante la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013), se encontró una variación de 5,49% entre las subpoblaciones del stock G y un 94,51% de variación dentro de las mismas. No se encontraron diferencias significativas entre la población de Esmeraldas

(2012), y la población de Santa Elena, Colombia y la Península Antártica, sin embargo, como se ha informado anteriormente, se encontró una diferencia significativa entre las ballenas jorobadas de Ecuador y el Estrecho de Magallanes, tanto en la frecuencias de haplotipos así como la composición de nucleótidos ( $F_{ST}= 0.2612$ ,  $\Phi_{ST}= 0.2612$ ,  $p < 0,00001$ ) (Félix, Caballero y Olavarría, 2007, 2012; Dalgo, 2013) (Tabla 7).

#### **7.4 Conectividad con otras poblaciones de ballenas jorobadas del Hemisferio Norte y Sur.**

Se encontró un alto nivel de identidad al comparar las secuencias de Esmeraldas (2012) con haplotipos reportados para las poblaciones del Atlántico Sudeste y el Océano Índico (Rosenbaum et al., 2009), Australia Oeste, Nueva Caledonia, Tonga, Polinesia Francesa y las Islas Cook (Olavarría, 2008). Esto puede significar un potencial flujo génico entre las poblaciones del Hemisferio Sur. Durante la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013) se encontró igualmente un alto nivel de identidad con poblaciones de ballenas jorobadas del Atlántico Sudeste y el Océano Índico (Rosenbaum et al., 2009), y por otro lado con las poblaciones de ballenas de Brasil y Alaska (Engel et al., 2008; Jackson et al., 2009), sugiriendo un potencial intercambio de individuos entre poblaciones de ballenas jorobadas tanto en el Hemisferio Norte como con el Hemisferio Sur.

Al realizar el AMOVA, se encontraron diferencias significativas tanto en la frecuencia de haplotipos así como la composición de nucleótidos entre la población de ballenas jorobadas de Esmeraldas (2012) y las poblaciones de las 6 diferentes zonas de reproducción (Stock A, B, C, D, E y F) dentro del Hemisferio Sur y el área de alimentación en el Pacífico Norte (Alaska). Las diferencias más altas se reflejaron con las poblaciones de ballenas jorobadas en Alaska ( $F_{ST}= 0.7586$ ,  $\Phi_{ST}= 0.7586$ ,  $p < 0,00001$ ) y Brasil ( $F_{ST}= 0.0796$ ;  $\Phi_{ST}= 0.0796$ ,  $p= 0,0004$ ),

datos que coinciden con los reportados en la primera fase de este estudio (Tabla 8) (Dalgo, 2013).

### **7.5 Reconstrucción filogenética**

La reconstrucción del árbol filogenético por medio del método Neighbor Joining (Figura 5), agrupó los 16 haplotipos en 3 clados: CD, IJ y SH aunque con un bajo apoyo de bootstrap (<50%). Como se ha reportado anteriormente en estudios realizados en el Pacífico Sur (Olavarría et al., 2006, 2007, 2008) así como en la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013), el clado CD fue el más común (64%) seguido del clado IJ (32%) y finalmente el clado SH (4%) (Tabla 4). Una de las muestras correspondió al clado SH, el cual ha sido reportado anteriormente en todas las poblaciones del Pacífico Sur (Stock E y F) y en Brasil (Stock A), pero nunca antes en las ballenas jorobadas del Pacífico Sudeste (Stock G) (Olavarría et al., 2007, 2008; Engel et al., 2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2006, 2007, 2012; Dalgo, 2013). El cuarto clado AE, predominante en ballenas jorobadas del Pacífico Norte (Baker et al., 1998a), y encontrado en menor proporción en ballenas jorobadas de Colombia, Península Antártica, Brasil y Ecuador (Olavarría et al., 2007, 2008; Engel et al., 2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2006, 2007, 2012), no se encontró entre las ballenas jorobadas de la temporada 2012, pero si fue encontrado anteriormente entre las muestras de la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013).

## **7.6 Comparación interanual global y por sexos de las ballenas jorobadas en Esmeraldas para los años 2010, 2011 y 2012.**

Se realizó un test de AMOVA para comparar la frecuencia de haplotipos y la composición de nucleótidos entre los diferentes años de estudio, donde se encontró que no hubieron diferencias significativas entre las ballenas jorobadas del 2011 y 2012 ( $F_{ST}= 0.01943$ ,  $\Phi_{ST}= 0.01943$ ,  $p= 0,19425$ ), y las del 2010 y 2012 ( $F_{ST}= 0.00320$ ,  $\Phi_{ST}=0.00320$ ,  $p= 0,33948$ ) (Tabla 9). En la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013), se encontraron diferencias significativas tanto en la frecuencia de haplotipos así como la composición de nucleótidos al comparar las ballenas jorobadas del 2010 y 2011 ( $F_{ST}=0.08778$ ,  $p<0.05$ ;  $\Phi_{ST}=0.08778$ ,  $p<0.00001$ ).

De los 16 haplotipos encontrados para el 2012 y los 7 del 2011, se compartieron 5 diferentes haplotipos entre los dos años (SP98, SP32, SP90, SP1 y SP14). Por otro lado, de los 12 haplotipos encontrados en la población del 2010, 6 se compartieron con la población de ballenas jorobadas del 2012 (SP90, SP68, SP32, SP62, SP52 y SP50). En cuanto a las ballenas jorobadas del 2010 y 2011, de los 12 y 7 haplotipos encontrados respectivamente para cada año, sólo 3 haplotipos (SP25, SP32 y SP90) estuvieron presentes en ambos años (Dalgo, 2013).

Una comparación de la composición de haplotipos por sexo y años se realizó para comprender si existe una posible diferencia en los patrones migratorios entre machos y hembras. Para las hembras se encontraron 2 haplotipos diferentes en 2010, 2 en el 2011 y 7 para el 2012, mientras que en los machos se encontraron 10 haplotipos diferentes para el 2010, 6 para el 2011 y 10 en el 2012 (Tabla 10) (Dalgo, 2013).

La mayoría de los haplotipos encontrados en las hembras estaban presentes entre los haplotipos de los machos (SP1, SP14, SP25, SP32, SP50, SP90 SP98). Sin embargo, se

encontró que algunos haplotipos estuvieron más representados en machos que en hembras. Por ejemplo, el haplotipo SP90 y SP32 estuvieron un 88,9 y 50% más presentes en machos que en hembras. Al realizar el AMOVA no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de haplotipos y composición de nucleótidos entre la población de hembras y machos ( $F_{ST} = -0.0062$ ,  $\Phi_{ST} = -0.0062$ ,  $p = 0.4943$ ).

Al comparar los haplotipos entre hembras para los diferentes años de estudio, se encontraron algunas diferencias. Ninguno de los haplotipos de las hembras del 2010 estuvo presente en los haplotipos de las hembras del 2011, lo cual se repitió en la comparación de las hembras del 2011 y 2012. En cuanto a las hembras del 2010 y 2012, se encontró que se compartía un haplotipo en común (SP68) (Tabla 10). A pesar de que en general no se compartieron haplotipos entre las hembras de los diferentes años, al realizar el AMOVA, no se encontraron diferencias significativas tanto en la frecuencia de haplotipos así como en la composición de nucleótidos. Por otro lado, al comparar los haplotipos entre los machos, se encontró que entre la población de machos del 2010 y 2011 se compartieron 2 haplotipos (SP32 y SP90), mientras que entre los machos del 2010 y 2012 se compartieron 3 haplotipos (SP52, SP62 y SP90), y finalmente para la población de machos del 2011 y 2012 se compartieron 2 haplotipos (SP1 y SP90). Al realizar el AMOVA, se encontró que no hubieron diferencias significativas tanto en la frecuencia de haplotipos así como la composición de nucleótidos entre los machos del 2010 y 2012 ( $F_{ST} = 0.0093$ ,  $\Phi_{ST} = 0.0093$ ,  $p = 0.3052$ ) al igual que en los del 2011 con los del 2012 ( $F_{ST} = 0.0432$ ,  $\Phi_{ST} = 0.0432$ ,  $p = 0.1276$ ), pero si al comparar los machos del 2010 con los del 2011 ( $F_{ST} = 0.0969$ ,  $\Phi_{ST} = 0.0969$ ,  $p = 0.0230$ ) (Tablas 11 y 12).

## 8 DISCUSIÓN

### 8.1 Diversidad genética de ballenas jorobadas para la población de Esmeraldas 2012

La diversidad genética tanto a nivel de haplotipos como de nucleótidos encontrada en las poblaciones de ballenas jorobadas del Hemisferio Sur (Stock A, B, C, D, E, F, G), ha demostrado ser más alta a la encontrada en las poblaciones de ballenas jorobadas del Hemisferio Norte (Baker et al., 1998a; Baker & Medrano-Gonzales, 2002 citado en Olavarría, 2008) (Tabla 5). A pesar de esto, la diversidad genética de ballenas jorobadas encontrada en diferentes regiones del Pacífico Sudeste, es la más baja del Hemisferio Sur, llegando a ser casi igual a la encontrada en las poblaciones del Atlántico y Pacífico Norte (Félix et al., 2006; Olavarría et al., 2006, 2007, 2008).

En este estudio, la diversidad total de haplotipos ( $h \pm sd$ ) en el área de reproducción de Esmeraldas para la temporada 2012 fue de  $0.9567 \pm 0.0290$ , mientras que la diversidad de nucleótidos ( $\pi \pm sd$ ) fue de  $0.0214 \pm 0.0113$ . Estos valores de diversidad genética fueron más altos a los encontrados en poblaciones del Hemisferio Norte como era de esperarse, y al mismo tiempo fueron más altos a los valores encontrados para las poblaciones en el Pacífico Sudeste en la Isla Gorgona en Colombia, Santa Elena en Ecuador, la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes (Olavarría, 2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2007, 2012). Por otro lado, la diversidad total encontrada en la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013) fue de  $1.0000 \pm 0.0068$  a nivel de haplotipos ( $h \pm sd$ ) y de  $0.0209 \pm 0.0109$  a nivel de nucleótidos ( $\pi \pm sd$ ), superando a la diversidad genética encontrada durante la segunda fase de este estudio y al mismo tiempo a los valores de diversidad total de las diferentes áreas de alimentación y reproducción del Pacífico Sudeste (Olavarría, 2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2007, 2012).

Todo esto indica que la población de ballenas jorobadas que visita las costas de Esmeraldas puede tener una diversidad genética más alta que la de otras áreas dentro del stock G. Esta diversidad más alta se vio reflejada en el hecho de haber encontrado 16 haplotipos diferentes en tan sólo 22 muestras (relación 0,73:1 haplotipos: muestras). Para ilustrar esto, se presentan otros estudios realizados en diferentes zonas de reproducción y de alimentación del Pacífico Sudeste en los cuales se obtiene una diversidad genética más baja. En el estudio realizado por Félix, Caballero y Olavarría (2012) en la Península de Santa Elena (Ecuador), se encontraron tan solo 29 haplotipos de un total de 103 muestras (relación 0,28: 1 haplotipos: muestras). En otros estudios como el de Engel et al. (2008) en el Área I de la Península Antártica, se encontraron 17 haplotipos de un total de 46 muestras (0,37: 1 haplotipos: muestras), en el de Olavarría et al. (2007) realizado en el Estrecho de Magallanes se encontraron 4 haplotipos de un total de 52 muestras (0,08:1 haplotipos: muestras). Como se puede observar, la relación entre haplotipos y muestras de este estudio es mayor a la relación encontrada en otros estudios. Sin embargo, este resultado hay que verificarlo aumentando el número de muestras de ballenas jorobadas en las costas de Esmeraldas para poder saber si en realidad la diversidad genética en esta área es mayor a la de otras áreas del Pacífico Sudeste.

Una de las posibles razones para encontrar una diversidad genética más alta, es que exista intercambio de individuos con otras zonas de reproducción dentro del Hemisferio Sur. De los 16 haplotipos encontrados entre las ballenas jorobadas de la temporada 2012, 15 coincidieron con otros reportados en diferentes zonas alimentación y reproducción dentro del Pacífico Sudeste (Olavarría et al., 2007, 2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2007, 2012; Dalgo, 2013). El haplotipo nuevo encontrado en las ballenas jorobadas de Esmeraldas y no presente en el stock G, fue el SP6 que sólo ha sido reportado anteriormente en poblaciones de

la Polinesia Francesa (Stock F) (Olavarría et al., 2007, 2008). Esto puede sugerir que existe un posible flujo génico (dispersión de las hembras) entre las ballenas jorobadas del Pacífico Sur. Los otros 3 haplotipos (SP63, SP43 y SP66) encontrados por primera vez en el Ecuador, ya se los ha reportado anteriormente en la Isla Gorgona de Colombia y en la parte este de la Península Antártica que es la principal zona de alimentación para las ballenas jorobadas de esta área (Félix, Caballero y Olavarría, 2007, 2012). El haber encontrado estos haplotipos confirma lo reportado en otros estudios, cuyos resultados sugieren que el área de reproducción de las ballenas jorobadas que se alimentan en la Península Antártica se extiende a lo largo de las costas de Colombia y Ecuador (Flórez-González et al, 1998; Félix et al., 2009; Acevedo et al, 2007; Félix, Caballero y Olavarría 2007).

## **8.2 Análisis de diferenciación de la población de ballenas jorobadas de Esmeraldas (2012) con otras áreas del Pacífico Sudeste.**

Al comparar la frecuencia de haplotipos de la población Esmeraldas con la de otras zonas en el Pacífico Sudeste, tanto en áreas de reproducción (Colombia, Santa Elena) como en áreas de alimentación (Estrecho de Magallanes y la Península Antártica), el AMOVA reveló que el 6,93% de la variación genética total se distribuyó entre las subpoblaciones del stock G, mientras que el 93,07% de la variación estuvo dentro de las mismas. La alta proporción de varianza dentro de la población y la baja variación entre los sitios de comparación indican que estas poblaciones de ballenas presentan una alta similitud genética (Excoffier et al., 1992). En otras palabras, que se trata de una población panmítica (Flórez-González et al., 1998; Olavarría et al 2007, 2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2007, 2012). Durante la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013), se encontró una variación de 5.49% entre las subpoblaciones

del stock G y un 94.51% de variación dentro de las mismas, resultados similares a los encontrados en esta segunda parte del estudio (2012), por lo que se refuerza la idea de que la población de ballenas jorobadas en el área de reproducción de Esmeraldas representa una población panmítica con el resto de poblaciones del stock G. Además, los valores de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  entre la población de Esmeraldas y las poblaciones de Santa Elena, Colombia y la Península Antártica fueron menores a 0,01, lo que significa que existe poca diferenciación genética (Excoffier et al., 1992), probablemente como consecuencia del intercambio de individuos que transitan por estas áreas. Sin embargo, como se ha reportado anteriormente, se encontró una diferencia significativa ( $F_{ST}= 0.2612$ ,  $\Phi_{ST}= 0.2612$ ,  $p<0.00001$ ) entre las ballenas jorobadas de Ecuador (2012) y las del Estrecho de Magallanes (Olavarría et al., 2007, 2008)

Esta diferencia encontrada entre las ballenas de Ecuador y las del Estrecho de Magallanes apoya lo reportado por Olavarría et al. (2006, 2008), Félix, Caballero & Olavarría (2007, 2012), Acevedo et al. (2007), Dalgo (2013), que existe heterogeneidad en el patrón migratorio del stock G hacia sus áreas de alimentación. Las ballenas jorobadas del Estrecho de Magallanes muestran un mayor intercambio con las regiones de Panamá y Costa Rica que con el Ecuador y Colombia. Se ha propuesto que las ballenas jorobadas que se encuentran en la zona de alimentación más hacia el sur cerca de la Península Antártica, viajan principalmente a las áreas de reproducción en Colombia y Ecuador, mientras que las ballenas que se encuentran en las áreas de reproducción más septentrionales en Panamá y Costa Rica viajan al área de alimentación en el Estrecho de Magallanes (Acevedo, Aguayo-Lobo & Pastene, 2006; Acevedo *et al.*, 2007; Félix et al., 2009). Por lo que es posible, que las ballenas vistas entre el Estrecho de Magallanes y el Ecuador, representen animales en tránsito hacia o desde destinos

más septentrionales situadas fuera de Panamá y/o Costa Rica (Flórez-González et al., 1998; Félix et al., 2009). Por otro lado, se ha encontrado por medio de estudios genéticos con ADN mitocondrial, que las ballenas del Estrecho de Magallanes conforman una agrupación genéticamente diferente de la zona de alimentación Antártica (Olavarría, 2008; Flórez-González et al., 2007; Olavarría et al., 2007).

### **8.3 Relación genética con poblaciones de ballenas jorobadas en otras áreas de alimentación y reproducción en el Hemisferio Norte y Sur**

El alto nivel de identidad entre los haplotipos encontrados en la población de ballenas jorobadas de Esmeraldas (2012) y los reportados para las poblaciones del Atlántico Sudeste y el Océano Índico (Rosenbaum et al., 2009), Australia Oeste, Nueva Caledonia, Tonga y Polinesia Francesa (Olavarría, 2008), puede indicar un potencial flujo génico, mediado por migraciones de individuos que se mueven a través de mayores rangos dentro de las diferentes zonas de reproducción en el Hemisferio Sur (Pomilla y Rosenbaum., 2005; Valsecchi et al., 2010; Stevick et al., 2010, 2011). En la primera fase de este estudio (Dalgo, 2013) se encontró igualmente un alto nivel de identidad con poblaciones de ballenas jorobadas del Atlántico Sudeste, Océano Índico, Brasil y Alaska, sugiriendo de igual manera un potencial intercambio de individuos con estas zonas de alimentación y reproducción. Se han observado movimientos individuales de ballenas por ejemplo entre Brasil (Stock A) y Madagascar (Stock C) (Stevick et al., 2010), Tonga (Stock E) y las Islas Cook (Stock F) y entre Australia Oeste (Stock D) con Nueva Caledonia y Tonga (Stock E) (Garrigue et al., 2002 citado en Olavarría, 2008).

A pesar de haber encontrado un alto nivel de identidad de haplotipos entre las ballenas jorobadas de Esmeraldas (2012) y las diferentes zonas antes mencionadas, se encontraron

diferencias significativas tanto en la frecuencia de haplotipos ( $F_{ST}$ ) así como la composición de nucleótidos ( $\Phi_{ST}$ ). Esto puede deberse a que en un pasado existió flujo génico, y por esto se comparten los mismos haplotipos (alta identidad), pero en la actualidad las frecuencias de estos haplotipos no son las mismas entre las diferentes áreas de reproducción, por lo que se trata de poblaciones discretas (Olavarría et al., 2007, 2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2007, 2012). En un estudio realizado por Rosenbuam et al. (2009), se encontró que no existían diferencias significativas entre las poblaciones de ballenas jorobadas del Golfo de Guinea en el Atlántico Sudeste (stock B) y la Costa este de África en el Suroeste del Océano Índico (stock C), ya que había un cierto grado de intercambio contemporáneo entre estas dos subpoblaciones adyacentes, lo contrario a lo encontrado en este estudio.

En diferentes estudios realizados por Olavarría et al. (2003, 2007, 2008) se ha encontrado que existe poco flujo génico entre las diferentes poblaciones del Pacífico Sur (Stock E, F y G). Esto se debe a que la dispersión de hembras a través del Pacífico Sur es limitada, a pesar de la ausencia de barreras geográficas, como consecuencia de la fuerte fidelidad materna a los distintos destinos migratorios (Baker et al. 1990; Olavarría, 2008; Baker, Perry & Herman, 1987; Rosenbaum et al., 2009). En el estudio realizado por Olavarría et al. (2007), se encontró que en términos de flujo génico materno, el mayor aislamiento en el Pacífico Sur se da entre Colombia (stock G) y Oceanía (Stock E y F). Por otro lado, en el estudio realizado por Félix, Caballero y Olavarría (2007), se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de haplotipos y composición de nucleótidos entre la población de ballenas jorobadas en Santa Elena (stock G) con respecto a las poblaciones de ballenas jorobadas del Pacífico Sur (Stock E y F) y el sureste del océano Índico (Stock D). Se sugiere que estas diferencias se deben a la influencia del flujo de genes transecuatorial que ocurre al

parecer a lo largo de la costa del Pacífico de América Central con poblaciones del Pacífico Norte (Palacios-Alfaro et al., 2012; Olavarría, 2008; Baker et al., 1993, 1998a; Flórez-González *et al.*, 1998). Además, se ha encontrado que al realizar reconstrucciones filogenéticas las únicas zonas de reproducción en las que está presente el clado AE, característico de la población de ballenas jorobadas del Pacífico Norte, son Colombia, Santa Elena (Ecuador) y Brasil (Baker et al., 1993, 1998a; Félix, Caballero y Olavarría, 2007; Dalgo, 2013). En este estudio no se encontró ninguna muestra perteneciente a este clado. Es posible que por esta razón, los valores de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  fueron los más altos en relación con la población de ballenas jorobadas en Alaska, que es una de las áreas de alimentación en el Pacífico Norte. La poca cantidad de muestras pudo haber sido un factor importante para no encontrar haplotipos pertenecientes al clado AE en las muestras recolectadas en la temporada 2012. En la primera fase de esta investigación (Dalgo, 2013), si se encontraron dos haplotipos compartidos pertenecientes al clado AE (SP8 y Mno03Ma02).

Otra de las poblaciones de ballenas jorobadas con la que se encontró diferencias significativas a nivel de haplotipos ( $F_{ST}$ ) y de nucleótidos ( $\Phi_{ST}$ ) fue la de Brasil, y esto puede deberse principalmente a la aparente falta de intercambio de individuos entre las poblaciones del Pacífico Sudeste y el Atlántico Sudoeste, basado en la comparación de ballenas foto-identificadas (Garrigue et al., 2002 citado en Olavarría, 2008; Stevick et al. 2004). A pesar de esto, en un estudio realizado por Stevick et al. (2011), se encontró que una ballena hembra realizó un viaje interoceánico desde Puerto Cayo en Ecuador, hasta Abrolhos Bank en Brasil. En otro estudio realizado por Engel et al. (2008), se encontró que la población de ballenas jorobadas que visitan las costas de Brasil contenía haplotipos del clado AE que sólo se habían encontrado anteriormente en las poblaciones de Colombia y Santa Elena. De igual manera, se

ha reportado que el clado SH está presente en la población de Brasil, así como en todas las áreas de reproducción de Pacífico Sur (E y F), excepto en Colombia, Santa Elena y Esmeraldas (Stock G) (Olavarría et al., 2007, 2008; Engel et al., 2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2006, 2007, 2012; Dalgo, 2013). En este estudio se encontró un haplotipo perteneciente a este clado. Por todas las razones antes descritas, es posible que exista un intercambio de individuos entre estas dos áreas reproductivas.

#### **8.4 Fidelidad de sitio por años y sexo de las ballenas jorobadas en la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010, 2011 y 2012.**

Como se ha reportado anteriormente para otras áreas de reproducción de las ballenas jorobadas, la proporción de sexos en este estudio fue sesgada hacia los machos. Sin embargo, esta proporción fue menor a la encontrada en la primera fase de esta investigación y de otros estudios realizados en diferentes áreas de reproducción tanto en el Hemisferio Norte como en el Sur (Brown et al., 1995; Olavarría et al., 2007; Valsecchi et al., 2010; Félix, Caballero & Olavarría, 2012; Dalgo, 2013) (Tabla 2). Esto puede deberse a que en el método utilizado para el muestreo, se intentó obtener más muestras de hembras que de machos (ver sección 6.1). Además, debido a la conformación y estructura del sistema de apareamiento de las ballenas jorobadas (ver sección 1.2.1) es más fácil obtener muestras de machos que de hembras.

Se ha encontrado que existen diferentes patrones temporales y espaciales de la migración entre hembras y machos (Valsecchi et al., 2010). En un estudio realizado por Brown et al. (1995), se encontró que alrededor de 50% de las hembras de la Zona Antártica V no migraban a sus zonas de reproducción cada año. Por lo que se sugiere que ciertas hembras permanecen en las zonas de alimentación durante todo el invierno. Se han observado ballenas

jorobadas en zonas de alimentación durante el invierno en el Golfo de Maine (Clapham, 1996) y en el norte de la Patagonia (Hucke-Gaete et al., 2013). Puede ser ventajoso para algunas hembras no realizar este largo viaje a las zonas de reproducción, debido a los costos energéticos de la gestación y la lactancia añadido a la migración. De esta manera, algunas hembras optan por no realizar la migración en años alternos para recuperarse de los costos energéticos de la reproducción. Además, las hembras inmaduras pueden maximizar su crecimiento, permaneciendo en las áreas de alimentación de la Antártida durante todo el año (Brown et al., 1995). Por el contrario, se ha observado que los machos exhiben una mayor dispersión en cuanto a sus áreas de reproducción, ya que tratan de maximizar sus oportunidades de apareamiento. Por esta razón, es más común encontrar a machos en diferentes zonas de reproducción lejanas a sus originarias (Craig et al., 2003; Stevick et al., 2003; Pomilla & Rosenbaum., 2005; Acevedo, Aguayo-Lobo & Pastene, 2006; Stevick et al., 2011; Craig & Herman, 1997; Valsecchi et al., 2010). Por ejemplo, en un estudio realizado por Craig & Herman en el 2000, se encontró que los machos tendían a moverse más entre las diferentes islas de Hawaii mientras que las hembras preferían quedarse en una misma isla durante todo el período de reproducción.

Se ha reportado la predominancia de los machos entre las ballenas que migran. Por ejemplo, Brown et al. (1995) encontró una proporción de sexos 2,6:1 (machos: hembras) en la migración hacia la zona de reproducción del este de Australia. De esta manera, si algunas hembras se quedan en las áreas de alimentación, esto puede explicar por qué más machos son muestreados en las zonas de reproducción en los primeros meses del período de reproducción (Brown et al., 1995; Valsecchi et al., 2010).

En diferentes estudios realizados en el Ecuador, se ha encontrado que algunas ballenas jorobadas no se quedan durante todo el período de reproducción en la misma área. En una investigación realizada por Scheidat et al. (2000), en el parque Nacional Machalilla, se encontró que varias ballenas pasan solo hasta 5 días en la misma zona y que sólo alrededor del 10% se quedan más de 2 semanas. Por lo que se sugirió que varios individuos sólo están en tránsito en esta región. En otro estudio realizado por Félix & Haase (2001), igualmente en el parque Nacional Machalilla, se encontró que a pesar de tener pocos avistamientos interanuales, los mismos mostraban sincronía, por lo que se sugirió que había un uso cíclico mas no residente por parte de algunas ballenas jorobadas que visitan las costas ecuatorianas. En el estudio realizado por Gladek et al. (2013), en las áreas de reproducción de Esmeraldas y el parque Nacional Machalilla desde la temporada de 1996 hasta el 2012, se encontró que 68,16% de las ballenas jorobadas que visitan esta área han sido vistas una sola vez, mientras que el 31,84% han sido vistas más de una vez, sugiriendo que la mayor cantidad de ballenas sólo están de tránsito por esta área de reproducción.

Al realizar los análisis de varianza molecular con las muestras de los machos en los diferentes años de estudio, se encontró que los machos del 2010 y 2012 al igual que los del 2011 y 2012 no reflejaron diferencias significativas en la frecuencia de haplotipos y composición de nucleótidos, a diferencia de los machos del 2010 y 2011. Las diferencias encontradas tanto en la frecuencia de haplotipos así como la composición de nucleótidos para los años de estudio del 2010 y 2011, pueden deberse principalmente a que las muestras del 2010 fueron recolectadas en Agosto, cuando ya los machos no están en tránsito y se quedan como grupos residentes (Félix & Haase, 2001 citado en Dalgo, 2013). Mientras que las muestras del 2011 fueron tomadas en Julio, por lo que es posible que la mayoría de machos se

encontraban aún en tránsito hacia las áreas de reproducción en el norte como Colombia, Panamá y Costa Rica (Palacios-Alfaro et al., 2012). En el estudio de Félix et al. (2009), se encontró que 4 individuos registrados en Ecuador en 4 años diferentes (1996, 2002, 2005 y 2008) fueron avistados en Costa Rica-Panamá en el 2007. Estos animales formaban parte de grupos competitivos o escoltaban a hembras con sus crías, por lo que se propuso que se trataba de machos. En este estudio se sugiere, que a pesar de que los registros se dieron en diferentes años, no se descarta que algunas ballenas podrían frecuentar estos sitios durante la misma temporada y en una base interanual. Además se recalca la posibilidad que las ballenas que pasan por Ecuador hacia Costa Rica y Panamá están en tránsito. Esto coincide con lo discutido anteriormente en la sección 8.2, donde se sugiere la posibilidad de una heterogeneidad en la distribución de las ballenas jorobadas pertenecientes al Stock G (Stevick et al., 2007; Félix, Caballero & Olavarría, 2012).

En los análisis realizados con las muestras de hembras, se encontró que sólo se compartió un haplotipo entre las hembras del 2010 y 2012, y ningún haplotipo entre las hembras del 2011 y 2012 ni tampoco entre las del 2010 y 2011. Al realizar los análisis de varianza molecular, no se encontraron diferencias significativas en los valores de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  entre los diferentes años de estudio. Esto puede deberse principalmente a que solo se obtuvieron 2 muestras de hembras para cada uno de los primeros años de estudio (2010 y 2011). Al comparar los haplotipos correspondientes para cada año usando el software Arlequin, no se encontró diferencias, debido a que los mismos difieren principalmente en uno o dos nucleótidos (Shane, 2005), y a que el programa toma en cuenta la frecuencia con la que se presenta cada haplotipo para comparar las poblaciones correspondientes. Además, estos haplotipos al corresponder a muestras únicas, tenían una frecuencia de 1.

En un estudio realizado por Félix, Caballero & Olavarría en el 2012 en la Península de Santa Elena, Ecuador, se realizaron unos análisis parecidos donde se encontró que entre los años del 2006 y 2007 las diferencias más altas tanto en la frecuencia de haplotipos así como la composición de nucleótidos fueron entre las hembras, mientras que los machos compartieron la mayoría de haplotipos y sus frecuencias por lo que tuvieron pocas diferencias. En otro estudio realizado por Rosenbaum et al. (2006) en el Atlántico Sudeste y Océano Índico, se sugirió que debido al reducido número de muestras de hembras, los haplotipos más comunes aumentan en frecuencia, reduciendo el número de haplotipos raros o poco frecuentes, lo que resulta en distancias significativamente más bajas entre los haplotipos disponibles. Lo sucedido en el estudio de Rosenbaum et al. (2006) es similar a lo que ha ocurrido con las muestras recolectadas para las hembras de este estudio.

## 9. CONCLUSIONES

La diversidad genética de la población de ballenas jorobadas de Esmeraldas durante la temporada 2012 fue alta en comparación con otras áreas de reproducción (Isla Gorgona en Colombia, Santa Elena en Ecuador) y alimentación (Península Antártica y Estrecho de Magallanes) del Pacífico Sudeste.

La proporción de sexos en este estudio fue sesgada hacia los machos. Sin embargo, esta proporción fue menor a la encontrada en otros estudios, ya que se utilizó un método de muestreo diferente (ver sección 6.1).

Los haplotipos SP63, SP43 y SP66 fueron encontrados por primera vez en el Ecuador, y el haplotipo SP6 se identificó por primera vez en el Pacífico Sudeste. Estos cuatro nuevos haplotipos encontrados, dan un total de 35 haplotipos reportados para las zonas de reproducción ecuatorianas.

Se comprobó que la población de ballenas jorobadas en el Pacífico Sudeste es panmítica a lo largo de la costa de Colombia y Ecuador, pero segregada en sus áreas de alimentación, en la península Antártica y el Estrecho de Magallanes.

Se encontró una alta identidad a nivel de haplotipos entre la población de Esmeraldas (2012) y otras áreas de reproducción dentro del Hemisferio Sur (B, C, D, E, F). A pesar de esto, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de haplotipos y composición de nucleótidos, por lo que se concluye que en un pasado pudo haber existido flujo génico, pero

que en la actualidad las migraciones interoceánicas son pocas. Todo esto significa que estas poblaciones son altamente estructuradas dentro de sus áreas de reproducción.

De acuerdo a este estudio los clados CD e IJ son predominantes para la población de ballenas jorobadas de Esmeraldas.

La ausencia del clado AE en Esmeraldas (2012), influyó en las diferencias significativas de los valores  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  encontradas con la población de Alaska.

Se encontró que en general, los machos mostraron mayor fidelidad de sitio, aunque se propone que varios individuos pueden estar en tránsito hacia las áreas de reproducción en Costa Rica y Panamá.

Las pocas diferencias en la frecuencia de haplotipos y composición de nucleótidos al comparar a las hembras para los diferentes años de estudio, pueden deberse al reducido número de muestras.

## 10. RECOMENDACIONES

Ampliar el número de muestras recolectadas, así como la cobertura geográfica en las costas Ecuatorianas para comprobar si la diversidad genética de esta área de reproducción, es en realidad mayor a otras áreas dentro de Pacífico Sudeste.

Incluir a Galápagos en futuros análisis, ya que se trata de un área poco explorada, y podría ayudar a entender mejor la conectividad existente entre Ecuador y otras áreas de reproducción en el Hemisferio Sur.

Para comprobar la hipótesis de que varios machos presentes en las costas ecuatorianas, son animales en tránsito hacia zonas al Norte como Panamá y Costa Rica, se deberían tomar muestras de estas áreas y compararlas con las encontradas en las costas ecuatorianas.

Para realizar estudios de diferenciación genética por sexo y años, se deberían tomar un número equitativo de muestras tanto de machos como de hembras entre los diferentes años y en la misma temporada para poder entender claramente cuál es el comportamiento de ambos sexos.

## 11. REFERENCIAS

- Acevedo, J. A., Aguayo-Lobo, A. & Pastene, L. (2006). Filopatría de la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae* Borowski 1782), al área de alimentación del Estrecho de Magallanes. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 41(1), 11-19.
- Acevedo, J., Rasmussen, K., Félix, F., Castro, C., Llano, M., Secchi, E., Saborio, M.T., Aguayo-Lobo, A., Haase, B., Scheidat, M., Dalla-Rosa, L., Olavarría, C., Forestell, P., Acuña, P., Kaufman, G., & Pastene, L. (2007). Migratory destination of humpback whales from the Magellan Strait feeding ground, Southeast Pacific.
- Avise, J., Arnold, J., Ball, M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J., Reeb, C., Saunders, N. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial dna bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol.*, 18, 89-522.
- Avise, J. (1998). The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7, 371–379.
- Baker, C.S., Herman L.M., Perry, A., Lawton, W.S., Straley, J.M., Wolman, A.A., Kaufman, G.D., Winn, H.E., Hall, J.D., Reinke, J.M., & Ostman, J. (1986). Migratory movement and population structure of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the central and eastern North Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 31, 105-119.
- Baker, C.S., Perry, A., & Herman L. M. (1987). Reproductive histories of female humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the North Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 41, 103-114.
- Baker C. S., Palumbi, S.R., Lambertsemn, R., Weinrichj, M., Calambokidis, J., O'Brien, S. (1990). The influence of seasonal migration on the distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nature*, 344, 238-240.
- Baker, C. S., Perry, A., Bannister J.L., Weinrich M.T., Abernethy R.B., Calambokidis, J., Lien, J., Lambertsen, R.H., Ramirez Urban, Vasquez, O., Clapham, P.J, Alling, A., O'Brien, S. J. & Palumbi S.R. (1993). Abundant mitochondrial DNA variation and

- world-wide population structure in humpback whales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8239-8243.
- Baker C. S., Flórez-González, L., Abernethy, B., Rosenbaum, H. C., Slade, R.W., Capella, J., & Bannister, J. L. (1998a). Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among humpback whales of the Southern Hemisphere. *Marine Mammal Science*, 14(4), 721-737.
- Baker, C. S., Medrano-González, L., Calambokidis, J., Perry, A., Pichler, F., Rosenbaum, H., Straley, J. M., Urban-Ramirez, J., Yamaguchi, M., & Von Ziegeler, O. (1998b). Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among humpback whales in the North Pacific. *Molecular Ecology*, 7, 695–707.
- Baker C. S., & Clapham, P.J. (2004). Modelling the past and future of whales and whaling. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(7), 365–371.
- Bermingham, E., Moritz, C. (1998). Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7, 367–369.
- Brown, M. R., Corkeron, P. J., Hale, P. T., Schultz, K. W. & Bryden, M. M. (1995). Evidence for a Sex-Segregated Migration in the Humpback Whale (*Megaptera novaeangliae*). *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 259.
- Clapham, P. J. (1996). The social and reproductive biology of Humpback Whales: an ecological perspective. *Mammal Review*, 26, 27–49.
- Clapham, P. J. 2000. The Humpback whale: Seasonal feeding and breeding in a baleen whale. *Cetacean Societies: Field studies of dolphins and whales*. University of Chicago Press. Pp. 173-196.
- Clapham, P & Mead, J (2009). *Megaptera novaeangliae*. *American Society of Mammalogist*, (604), 1-9.

- Constanza, Pairoa-Riofrio. (2003). Estudio poblacional de ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) en Esmeraldas, Ecuador. Educación y capacitación. Organización para la Conservación de Mamíferos Acuáticos en Sudamérica, Yaqu Pacha.
- Chan, D., Schon, E. (2012). Eliminating Mitochondrial DNA from Sperm. *Developmental Cell*, 22, 469-47.
- Craig, A. S. and Herman, L. (1997). Sex differences in site fidelity and migration of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) to the Hawaiian Islands. *Canadian Journal of Zoology*, 75(11): 1923-1933.
- Craig, A & Herman, L. (2000). Habitat preferences of female humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the Hawaiian Islands are associated with reproductive status. *Marine Ecology Progress series*, vol. 193, 209-216.
- Craig, A., Herman, L., Gabriele, C., Pack, A. (2003). Migratory timing of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the central north pacific varies with age, sex and reproductive status. *Behaviour* 140, 981-1001.
- Dalgo, D. (2013). Genetic Diversity And Connectivity Of Eastern Pacific Humpback Whales (*Megaptera Novaeangliae*, Borowski, 1781) Off The Coast Of Esmeraldas, Ecuador. Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito.
- De Vienne, D., Santoni, S., Falque, M. 2003. Molecular markers in plant genetics and biotechnology. Science Publishers, Inc. Enfield (NH) USA, Plymouth UK.
- Engel, M.H., Fagundes, N. J. R., Rosenbaum, H. C. Leslie, M.S., Ott, P.H., Schmitt, R., Secchi, E. Dalla Rosa, L. & Bonatto, S. L. (2008). Mitochondrial DNA diversity of the Southwestern Atlantic humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) breeding area off Brazil, and the potential connections to Antarctic feeding areas. *Conserv Genet*, 9, 1253–1262.

- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Félix, F. & Haase B. (1998). La investigación de la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) alrededor de la isla de la Plata, Manabí, durante 1995. *Acta Oceanográfica del Pacífico*. INOCAR, Ecuador, 9(1).
- Félix, F. & Haase B. (2001). The humpback whale off the Coast of Ecuador, population parameters and behavior. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 36 (1), 61-74.
- Félix, F. (2003). Guía de campo para la observación de ballenas jorobadas en la costa de Ecuador. Fundación Ecuatoriana para el Estudio de Mamíferos Marinos (FEMM). Guayaquil, Ecuador. 28 Pp.
- Félix, F. & Haase B. (2005). Distribution of humpback whales along the coast of Ecuador and management implications. *J. CETACEAN RES. MANAGE.*, 7(1), 21–31.
- Félix, F., Palacios, D.M., Caballero, S., Haase, B. & Falconi, J. (2006). The 2005 Galápagos humpback whale expedition; a first attempt to assess and characterize the population in the archipelago, Report SC/A06/HW15 to the Inter-sessional workshop for the Comprehensive Assessment of Southern Hemisphere humpback whales Scientific Committee of the International Whaling Commission. Hobart, Australia.
- Félix, F., Caballero, S., & Olavarría, C. (2007). A preliminary assessment of the genetic diversity in humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from Ecuador and population differentiation with other Southern Hemisphere breeding grounds and feeding areas, Report SC/59/SH11 to the Scientific Committee of the International Whaling Commission. Anchorage, USA.
- Félix, F., Rasmussen, K., Garita, F., Haase, B. and Simonis, A. 2009. Movements of humpback whales between Ecuador and Central America, wintering area of the Breeding Stock G. Paper SC/61/SH18 presented to the 61 Scientific Committee of the International Whaling Commission.

- Félix, F., Caballero, S. & Olavarria, C. (2012). Genetic diversity and population structure of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from Ecuador based on mitochondrial DNA analyses. *J. CETACEAN RES. MANAGE*, 12(1), 71–77.
- Fernández, S. (2009). Preferencia de Hábitat de la Ballena Jorobada (*Megaptera novaeangliae*) en la costa de Esmeraldas, Ecuador. Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito.
- Flórez-González, L., Capella A., Haase, B., Bravo, G.A., Félix, F., & Gerrodette, T. 1998. Changes in winter destinations and the northernmost record of southeastern Pacific humpback whales. *Marine Mammal Science*, 14, 189-196.
- Flórez-González, L., Ávila, I., Capella, J., Falk, P., Félix, F., Gibbons, J., Guzmán, H., Haase, B., Herrera, J., Peña, V., Santillán, L., Tobón, I., Van Warebeek, K. (2007). Estrategia para la conservación de la ballena jorobada del Pacífico Sudeste. Lineamientos de un plan de acción regional e iniciativas nacionales. Fundación Yubarta. Cali. Colombia. 106 p.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glemin, S., Hurst, G. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18, 4541–4550.
- Gladek, L. (2013). Abundance and site fidelity of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) population in Esmeraldas, Ecuador. Tesis de Maestría. Universidad San Francisco de Quito.
- González, L. (2002). Programa de acción para la conservación de especies: ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*). Universidad Nacional Autónoma de México. Coyoacán, México. 60 Pp.
- Hoelzel, A., Hancock, J., Dover, G. (1991). Evolution of the Cetacean Mitochondrial D-Loop Region. *Mol. Biol. Evol.*, 8(3), 475-493.
- Hucke-Gaetea, B., Harob, B., Torres-Florez, J., Montecinos, Y., Viddia, F., Bedriñana-Romano, I., Neryb, M., Ruiz, D. (2013). A historical feeding ground for humpback

whales in the eastern South Pacific revisited: the case of northern Patagonia, Chile. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst. Update on SC/65a/Forinfo01*.

INOCAR. (2012). Derrotero de las Costas Ecuatorianas. Capítulo II: De Río Mataje a Cabo San Francisco. Extraído el 30 de Junio del 2013 desde: [http://www.inocar.mil.ec/docs/derrotero/derrotero\\_cap\\_II.pdf](http://www.inocar.mil.ec/docs/derrotero/derrotero_cap_II.pdf)

IWC. 2005. Report of the Scientific Committee, Annex H, Report of the Sub-Committee on other Southern Hemisphere whale stocks. *J. Cetacean Res. Manage.* 7, 235-246.

Kieleczawa, J. (2006). *DNA sequencing II: optimizing, preparation and cleanup*. Ontario: Jones and Bartlett Publishers. P 49-53.

Krützen, M., Barré, L.M., Möller, L.M., Heithaus, M.R., Simms, C., Shenjrin, W.8., 2002. A biopsy system for small cetaceans: darling success and wound healing in lursiops spp. *Marine Mammal Science* 18, 863-878.

Liddell & Scott. (1980). *Greek-English Lexicon, Abridged Edition*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Olavarría, C., Poole, M., Hauser, N., Garrigue, C., Caballero, S., Brasseur, M., Martien, K., Russell, K., Oremus, M., Dodemont, R., Flórez, L., Capella, J., Rosenbaum, H., Moro, D., Jenner, C., Jenner, M.C., Bannister, J., Baker, C.S (2003). Population differentiation of humpback whales from far Polynesia (Group F breeding grounds) based on mitochondrial DNA sequences: Update on SH/55/SH11.

Olavarría, C., Aguayo, A., Acevedo, J., Medrano, L., Thiele, D., & Baker, C.S. (2006). Genetic differentiation between two feeding areas of the Eastern South Pacific humpback whale population: Update on SC/57/SH3, Report SC/A06/HW29.

Olavarría, C., Baker, C.S., Garrigue, C., Poole, M., Hauser, N., Caballero, S., Florez-Gonzalez, L., Brasseur, M., Bannister, J., Capella, J., Clapham, P., Dodemont, R., Donoghue, M., Jenner, C., Jenner, M., Moro, D., Oremus, M., Paton, D., Rosenbaum, H. & Russell, K. (2007). Population structure of South Pacific humpback whales and

- the origin of the eastern Polynesian breeding grounds. *Mar Ecol Prog Ser*, 330, 257-268.
- Olavarría, C. (2008). Population structure of Southern Hemisphere humpback whales. PhD Thesis. The University of Auckland. New Zealand.
- Opzeeland, I., Parijs, S., Kindermann, L., Burkhardt, E., Boebel, O. (2013). Calling in the Cold: Pervasive Acoustic Presence of Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*) in Antarctic Coastal Waters. *PLoS ONE* 8(9), 1-7.
- Pacheco, A., Silva, S. & Alcorta, B. (2009). Winter distribution and group composition of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) off northern Perú. *Lat. Am. J. Aquat. Mamm.* 7(1-2), 33-38.
- Palacios-Alfaro, J.D., D. Martínez-Fernández, C. Sánchez-Godínez, R. Venegas-Li. (2012). Distribution and behavior of humpback whale (*Megaptera novaeangliae* Borowski, 1781) (Breeding Stock G), in southern Pacific of Costa Rica. Updated: SC-64-SH16. International Whale Commission (IWC)'s Scientific Committee Documents. 8p
- Palsboll, P., Vader, A., Bakke, I., & El-Gewely, R. (1992). Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Zoology*, 70, 2166-2170.
- Palsboll, P.J., Allen, J., Berubé, M., Clapham, P.J., Feddersen, T.P. Hammond, P.S., Hudson, R.R., Jorgensen, H, Katona, S., Larsen, A. H., Larsen, F., Lien, J., Mattila, D. K., Sigurjónsson, J., Sears, R., Smith, T., Sponer, R., Stevick, P. & Oien, N. (1997). Genetic tagging of humpback whales. *Nature*, 388, 767-769.
- Palumbi, S.R., Cipriano, F. (1998). Species Identification Using Genetic Tools: The Value of Nuclear and Mitochondrial Gene Sequences in Whale Conservation. *The American Genetic Association*, 89, 459-464.
- Pomilla, C. & Rosebaum, H. (2005). Against the current: an inter-oceanic whale migration event. *Biol. Lett*, 1, 476-479.

- Reilly, S. B., Bannister, J. L., Best, P. B., Brown, M., Brownell Jr., R. L., Butterworth, D. S., Clapham, P. J., Cooke, J., Donovan, G. P., Urbán, J. & Zerbini, A.N. (2008). *Megaptera novaeangliae*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.6. <www.iucnredlist.org>. Junio 2013
- Rosenbaum, H., Pomilla, C., Mendez, M., Leslie, M., Best, P., Findlay, K., Minton, G., Ersts, P., Collins, T., Engel, M., Bonatto, S., Kotze, D., Meyer, M., Barendse, J., Thornton, M., Razafindrakoto, Y., Ngouesso, S., Vely, M., & Kiszka, J. (2009). Population Structure of Humpback Whales from Their Breeding Grounds in the South Atlantic and Indian Oceans. PLoS ONE 4(10), e7318.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science, 239, 487-491.
- Sasaki, T., Nikaido, M., Hamilton, H., Goto, M., Kato, H., Kanda, N., Pastene, L.A., Cao, Y., Fordyce, R. E., Hasegawa, M. & Okada, N. (2005). Mitochondrial Phylogenetics and Evolution of Mysticete Whales. Systematic Biology, 54(1), 77-90.
- Scheidat, M., Castro C., Denking, J., González, J. & Adelung D. (2000). A breeding area for humpback whales (*Megaptera Novaeangliae*) off Ecuador. J. Cetacean Res. Manage., 2(3), 165–171.
- Shane. (2005). Shane's Simple Guide to F-statistics. University of Auckland.
- Stevick, P., Allen, J., Berube, M., Clapham, P., Katona, S., Larsen, F., Lien, J., Mattila, D., Palsboll, P., Robbins, J., Sigurjonsson, J., Smith, T., Oien, N., Hammond, P. (2003). Segregation of migration by feeding ground origin in North Atlantic humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). J. Zool., Lond, vol.259, 231–237.
- Stevick, P., Aguayo, A., Allen, J., Avila, I., Capella, J., Castro, C., Chater, K., Dalla Rosa, L., Engel, M., Félix, F., Flórez-González, L., Freitas, A., Haase, B., Llano, M., Lodi, L., Muñoz, E., Olavarría, C., Seccii, E., Scheidat, M., Siciliano, S. (2004). Migrations of

- individually identified humpback whales between the Antarctic Peninsula and South America. *J. Cetacean. Res. Manage.* 6(2), 109–113.
- Stevick, P., Neves, M., Johansen, F., Engel, M., Allen, J., Marcondes, M. & Carlson, C. (2010). A quarter of a world away: female humpback whale moves 10 000 km between breeding areas. *Biol. Lett.* (2011) 7, 299–302.
- Stevick, P.T., J. Allen, M. Engel, F. Felix, B. Haase and M. Neves. 2011. First record of inter-oceanic movement of a humpback whale between Atlantic and Pacific breeding grounds off South America. Updated:SC/63/SH4. 5Pp.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Thompson, J., Higgins, D., & Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Valsecchi, E., Hale, P., Corkeron, P., Amoss, W. (2002). Social structure in migrating humpback whales. *Molecular Ecology*, 11, 507-518.
- Valsecchi, E., Corkeron, P., Galli, P., Sherwin, W., Bertorelle, G. (2010). Genetic evidence for sex-specific migratory behavior in western South Pacific humpback whales. *Marine Ecology Progress Series*. Vol 398, 275-286.
- White, D., Wolff, J., Pierson, M., Gemmill, N. (2008). Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology*, 17, 4925–4942.

## 12. TABLAS

**Tabla 1.** Distribución y conexiones de las áreas de reproducción y alimentación de las ballenas jorobadas en el Hemisferio Sur.

Áreas de reproducción		Áreas de alimentación		Conexiones
<b>Stock A</b>	Costa de Brasil	<b>Área I</b>	Mar de Bellinghausen y alrededor de las islas Shetland del Sur (120 ° W - 60 ° W)	Stock G-Área I
<b>Stock B</b>	Costa de África occidental desde el Golfo de Guinea hasta Sudáfrica	<b>Área II</b>	Mar de Weddell y alrededor de las Islas Malvinas Dependencias (60 ° W - 0 °)	Stock A-Área II
<b>Stock C</b>	Costas del este de Sudáfrica, Mozambique y Madagascar	<b>Área III</b>	Entre Bouvet y Kerguelén (0 ° - 70 ° E)	Stock B-Área IIyIII
<b>Stock D</b>	Noroeste de Australia	<b>Área IV</b>	Entre la isla de Kerguelen y el mediosur de Australia (70 ° E - 130 ° E)	Stock C-Área III
<b>Stock E</b>	Noreste de Australia, Nueva Caledonia, Tonga y Fiji	<b>Área V</b>	Entre 130 ° E y 170 ° W, incluyendo el Mar de Ross	Stock D-Área IV
<b>Stock F</b>	Islas Cook y Polinesia Francesa	<b>Área VI</b>	De 170 ° W hasta la frontera occidental de la Zona I (120 ° W)	Stock E-Área V
<b>Stock G</b>	Costa Rica, Panamá, Colombia y Ecuador			Stock F-Área VI

(Olavarría, 2008)

**Tabla 2.** Cuadro resumen de la proporción de sexos encontrada en diferentes estudios realizados en el Hemisferio Sur.

	Individuos muestreados	Machos	Hembras	Sexo sin Determinar	Proporción
<b>Brown et al., 1995</b>	180	127	53	0	2.4 : 1
<b>Olavarría et al., 2007</b>	1112	705	361	46	1.9 : 1
<b>Valsecchi et al., 2010</b>	135	91	44	0	2.1 : 1
<b>Félix, Caballero &amp; Olavarría., 2012</b>	103	66	25	12	2.6 : 1
<b>Dalgo, 2013</b>	35	31	4	0	8.0 : 1
<b>Esmeraldas, 2012</b>	22	13	8	1	1.6 : 1

**Tabla 3.** Diversidad de haplotipos de las ballenas jorobadas en la costa de Esmeraldas durante la temporada 2012. Se muestra la frecuencia, porcentaje y clado de cada haplotipo (ADNmt) por sexo. La N corresponde al total de individuos (machos y hembras) de cada haplotipo.

Haplotipo	Clado	Hembras		Machos		Sexo sin identificar	Total	
		n	%	n	%		N(machos y hembras)	%
SP32	IJ	2	25			1	3	13,6
SP60	CD	1	12,5				1	4,5
SP6	SH			1	7,7		1	4,5
SP90	CD	1	12,5	3	23		4	18,2
SP50	IJ			1	7,7		1	4,5
SP52	CD			1	7,7		1	4,5
SP68	CD	1	12,5				1	4,5
SP63	CD			2	15,4		2	9,1
SP98	CD	1	12,5				1	4,5
SP62	CD			1	7,7		1	4,5
SP14	IJ	1	12,5				1	4,5
SP43	IJ			1	7,7		1	4,5
SP1	CD			1	7,7		1	4,5
SP66	CD	1	12,5				1	4,5
SP100	CD			1	7,7		1	4,5
SP33	IJ			1	7,7		1	4,5
Total		8	100	13	100	1	22	100,0

**Tabla 4.** Cuadro resumen de la diversidad genética dentro de la población de ballenas jorobadas de Esmeraldas (2012) a nivel de haplotipos (H) y de nucleótidos ( $\pi$ ), número de muestras y haplotipos, número y porcentaje de individuos en cada clado.

Stock	Año	Muestras	# de haplotipos	H $\pm$ SD	$\pi \pm SD$	Número de individuos en cada clado			
						CD (%)	IJ (%)	AE (%)	SH (%)
G	2012	22	16	0.9567 $\pm$ 0.0293	0.0214 $\pm$ 0.0113	14 (64)	7 (32)	0 (0)	1 (4)

**Tabla 5.** Cuadro resumen de la diversidad genética a nivel de haplotipos (H) y de nucleótidos ( $\pi$ ), en diferentes áreas de reproducción y alimentación del Hemisferio Norte y Sur. ND corresponde a no determinado.

<b>Hemisferio Sur</b>				
<i>Stock</i>	Región	Ha	<i>h (SD)</i>	$\pi$ (SD)
A	Brazil	61	0.972(0.004)	0.025(0.013)
B	Gabon	100	0.979(0.002)	0.021(0.011)
C	Madagascar	93	0.978(0.002)	0.021(0.010)
D	Noroeste de Australia	53	0.970(0.004)	0.020(0.014)
E	Nueva Caledonia y Tonga	74	0.968(0.004)	0.021(0.010)
F	Islas Cook y Polinesia Francesa	32	0.918(0.011)	0.019(0.010)
G	Colombia	27	0.900(0.016)	0.019(0.001)
G	Santa Elena	29	0.893 (0.023)	0.018 ( 0.009)
<i>Áreas de alimentación</i>				
Área I	Península Antártica	17	0.913(0.016)	0.019(0.001)
Área II	Península Antártica	14	0.916(0.029)	0.025(0.013)
Estrecho de Magallanes	Chile	4	0.339(0.080)	0.010(0.053)
<b>Hemisferio Norte</b>				
Atlántico Norte	General	ND	0.881(0.015)	0.024(0.001)
Pacífico Norte	General	ND	0.772(0.024)	0.046(0.008)

(Engel et al., 2008; Olavarria, 2008; Rosenbaum et al., 2009)

**Tabla 6.** Haplotipos compartidos de la población de ballenas jorobadas de Esmeraldas (2012) y las áreas de reproducción y alimentación del Stock G.

Same, Ecuador 2012 (16)	Same, Ecuador 2010-2011 (16)	Santa Elena, Ecuador (29)	Colombia (27)	Península Antártica (34)	Estrecho de Magallanes (4)
SP1	SP1	SP1	SP1	SP1	
SP6					
	SP8		SP8	SP8	SP8
			SP9	SP9	
	SP10	SP10	SP10	SP10	
			SP12	SP12	
				SP13	
SP14	SP14	SP14	SP14	SP14	
		SP16			
		SP19			
	SP25	SP25	SP25		
		SP26		SP26	
			SP29		
SP32	SP32	SP32	SP32	SP32	
SP33		SP33	SP33	SP33	
				SP35	
		SP41			
		SP42			
SP43			SP43	SP43	
SP50	SP50	SP50	SP50	SP50	
SP52	SP52	SP52	SP52	SP52	
			SP54		
SP60		SP60	SP60	SP60	
		SP61	SP61	SP61	
SP62	SP62	SP62	SP62	SP62	
SP63			SP63	SP63	
SP66			SP66	SP66	
SP68	SP68	SP68	SP68	SP68	
		SP72	SP72	SP72	
	SP73	SP73	SP73	SP73	
			SP74		
			SP75		
				SP88	
	SP89				
SP90	SP90	SP90	SP90	SP90	SP90
SP98	SP98	SP98	SP98	SP98	SP98
SP100		SP100		SP100	
		SP101	SP101	SP101	
				SP111	
	Mno03Ma02	Mno03Ma02			Mno03Ma02
	Nuevo033				
		MnoEc2506			
		MnoEc3206			
		MnoEc3506			
		MnoEc3707			
		MnoEc5206			
				Mno96AP07	
				Mno97AP06	
				Mno97AP07	
				Mno99AP09	
				AN00-019	
				AN00-025	
<b>Total (compartidos)</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>2</b>

(Olavarría, 2008; Félix, Caballero y Olavarría, 2012; Dalgo, 2013).

**Tabla 7.** Valores del análisis de varianza molecular con otras zonas dentro del stock G, se muestra la diferencia a nivel de frecuencias de haplotipos (FST) y diferenciación de nucleótidos ( $\Phi$ ST), así como la significancia estadística (p). La significancia de los valores obtenidos se comprobó usando 5000 permutaciones aleatorias de la matriz de datos.

	<b>Santa Elena, Ecuador</b>	<b>Colombia</b>	<b>Península Antártica</b>	<b>Estrecho de Magallanes</b>
<b>Fst</b>	-0.0039	-0.0154	-0.0052	0.2612
<b>valor p</b>	0.4929±0.0066	0.9149±0.0044	0.5517±0.0064	<0.00001
<b><math>\Phi</math>st</b>	-0.0039	-0.0154	-0.00519	0.2612
<b>valor p</b>	0.4950	0.9097	0.5534	<0.00001

(Félix, Caballero y Olavarría, 2012; Olavarría, 2008)

**Tabla 8.** Valores del análisis de varianza molecular con otras zonas del Hemisferio Norte y Sur, se muestra la diferencia a nivel de frecuencias de haplotipos (FST) y diferenciación de nucleótidos ( $\Phi$ ST), así como la significancia estadística (p). La significancia de los valores obtenidos se comprobó usando 5000 permutaciones aleatorias de la matriz de datos.

	<b>Brazil</b>	<b>Alaska</b>	<b>Atlántico Sur y Océano Índico</b>	<b>Australia Oeste</b>
<b>Stock</b>	<b>A</b>	<b>Pacífico Norte</b>	<b>B y C</b>	<b>D</b>
<b>Fst</b>	0.0796	0.7586	0.0321	0.0277
<b>valor p</b>	0.0004±0.0003	<0.00001	0.0359±0.0025	0.0369±0.0028
<b><math>\Phi</math>st</b>	0.0796	0.7586	0.0321	0.0277
<b>valor p</b>	0.0002	<0.00001	0.0413	0.0398
	<b>Nueva Caledonia</b>	<b>Tonga</b>	<b>Polinesia Francesa</b>	<b>Cook Islands</b>
<b>Stock</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>F</b>
<b>Fst</b>	0.0261	0.0319	0.0263	0.0475
<b>valor p</b>	0.0427±0.0026	0.0236±0.0019	0.0461±0.0035	0.0157±0.0016
<b><math>\Phi</math>st</b>	0.0261	0.0319	0.0263	0.0475
<b>valor p</b>	0.0423	0.0335	0.0454	0.0175

(Olavarría, 2008; Rosenbaum et al., 2009; Engel et al., 2008)

**Tabla 9.** Valores del análisis de varianza molecular entre ballenas jorobadas muestreadas para los años 2010, 2011 y 2012 en Esmeraldas, Ecuador. Se muestra la diferencia a nivel de frecuencias de haplotipos (FST) y diferenciación de nucleótidos ( $\Phi$ ST), así como la significancia estadística (p). La significancia de los valores obtenidos se comprobó usando 5000 permutaciones aleatorias de la matriz de datos.

	Esmeraldas 2010	Esmeraldas 2011	
Esmeraldas 2012	0.00320	0.01943	<b>Fst</b>
	0.36104±0.0069	0.19857±.0046	<b>valor p</b>
	0.00320	0.01943	<b><math>\Phi</math>st</b>
	0.33948	0.19425	<b>valor p</b>

(Dalgo, 2013)

**Tabla 10.** Haplotipos encontrados en las ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010, 2011 y 2012. La frecuencia de cada haplotipo (ADNmt) se muestra por sexo y año. La N corresponde al total de individuos (machos y hembras) de cada haplotipo.

Haplotipo	Hembras				Machos				Sexo sin identificar	Total N(machos y hembras)
	Agosto 2010	Julio 2011	Julio y Agosto 2012	2010,2011 & 2012	Agosto 2010	Julio 2011	Julio y Agosto 2012	2010, 2011 & 2012		
SP1		1		1		1	1	2		3
SP6				0			1	1		1
SP8				0	1			1		1
SP10				0	2			2		2
SP14			1	1		2		2		3
SP25		1		1	1			1		2
SP32			2	2	2	2		4	1	7
SP33				0			1	1		1
SP43				0			1	1		1
SP50	1			1			1	1		2
SP52				0	1		1	2		2
SP60			1	1						1
SP62				0	5		1	6		6
SP63				0			2	2		2
SP66			1	1						1
SP68	1		1	2						2
SP73				0	3			3		3
SP89				0	1			1		1
SP90			1	1	1	5	3	9		10
SP98			1	1		2		2		3
SP100				0			1	1		1
Mno03MA02				0	1			1		1
Nuevo033				0		1		1		1
TOTAL	2	2	8	12	18	13	13	44		57

(Dalgo, 2013)

**Tabla 11.** Valores del análisis de varianza molecular entre años y por sexo, se muestra la diferencia a nivel de frecuencias de haplotipos (FST), así como la significancia estadística (p). La significancia de los valores obtenidos se comprobó usando 5000 permutaciones aleatorias de la matriz de datos. La M corresponde a machos y la H a hembras.

	H 2010		H 2011	
	Fst	valor p	Fst	valor p
H 2011	0.00000	0.66673 ± 0.0061		
H 2012	-0.00021	0.55783 ± 0.0073	-0.18003	0.86749 ± 0.0053
	M 2010		M 2011	
M 2011	0.09693	0.02400 ± 0.0021		
M 2012	0.00933	0.30530 ± 0.0056	0.04320	0.12378 ± 0.0046

(Dalgo, 2013)

**Tabla 12.** Valores del análisis de varianza molecular entre años y por sexo, se muestra la diferencia a nivel de la composición de nucleótidos ( $\Phi$ ST), así como la significancia estadística (p). La significancia de los valores obtenidos se comprobó usando 5000 permutaciones aleatorias de la matriz de datos. La M corresponde a machos y la H a hembras.

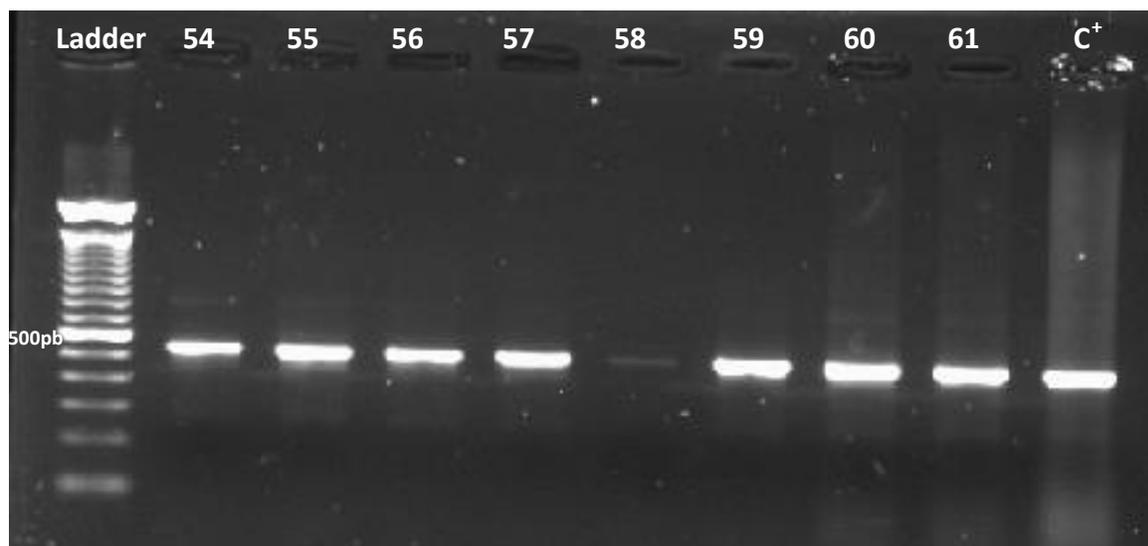
	H 2010		H 2011	
	$\Phi$ st	valor p	$\Phi$ st	valor p
H 2011	0.00000	0.67599		
H 2012	-0.00021	0.54702	-0.18003	0.86111
	M 2010		M 2011	
M 2011	0.09693	0.02302		
M 2012	0.00933	0.30516	0.04320	0.12758

(Dalgo, 2013)

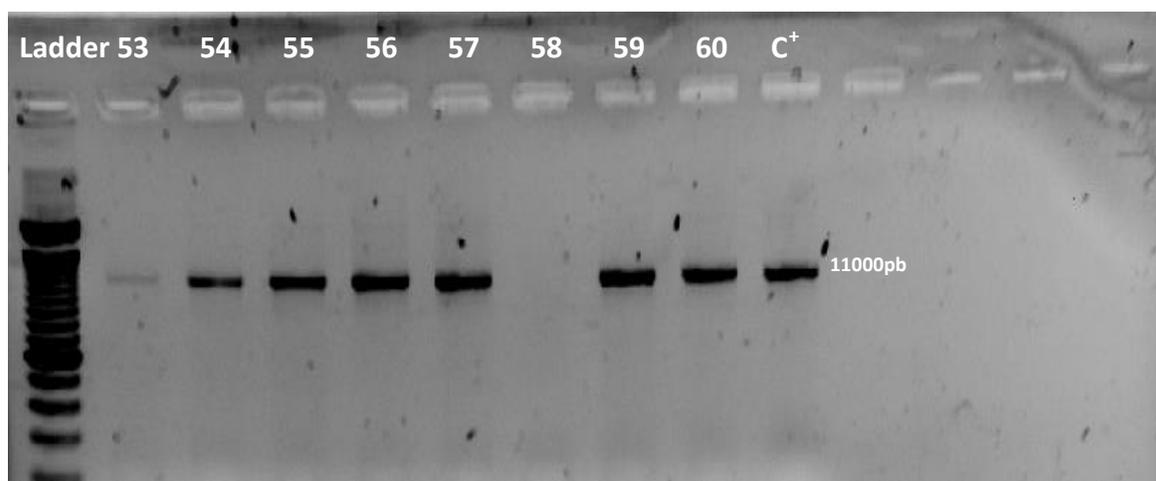
13. FIGURAS



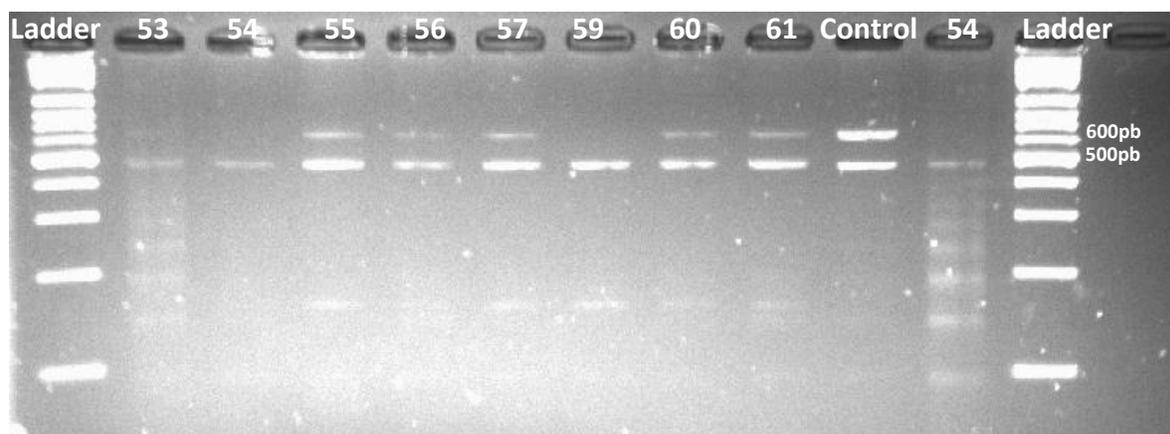
Figura 1. Mapa del área de estudio en “Bajos de Atacames” ubicado en la provincia de Esmeraldas, Ecuador. La línea azul representa los límites del área de estudio (Denkinger, *et al.* 2006).



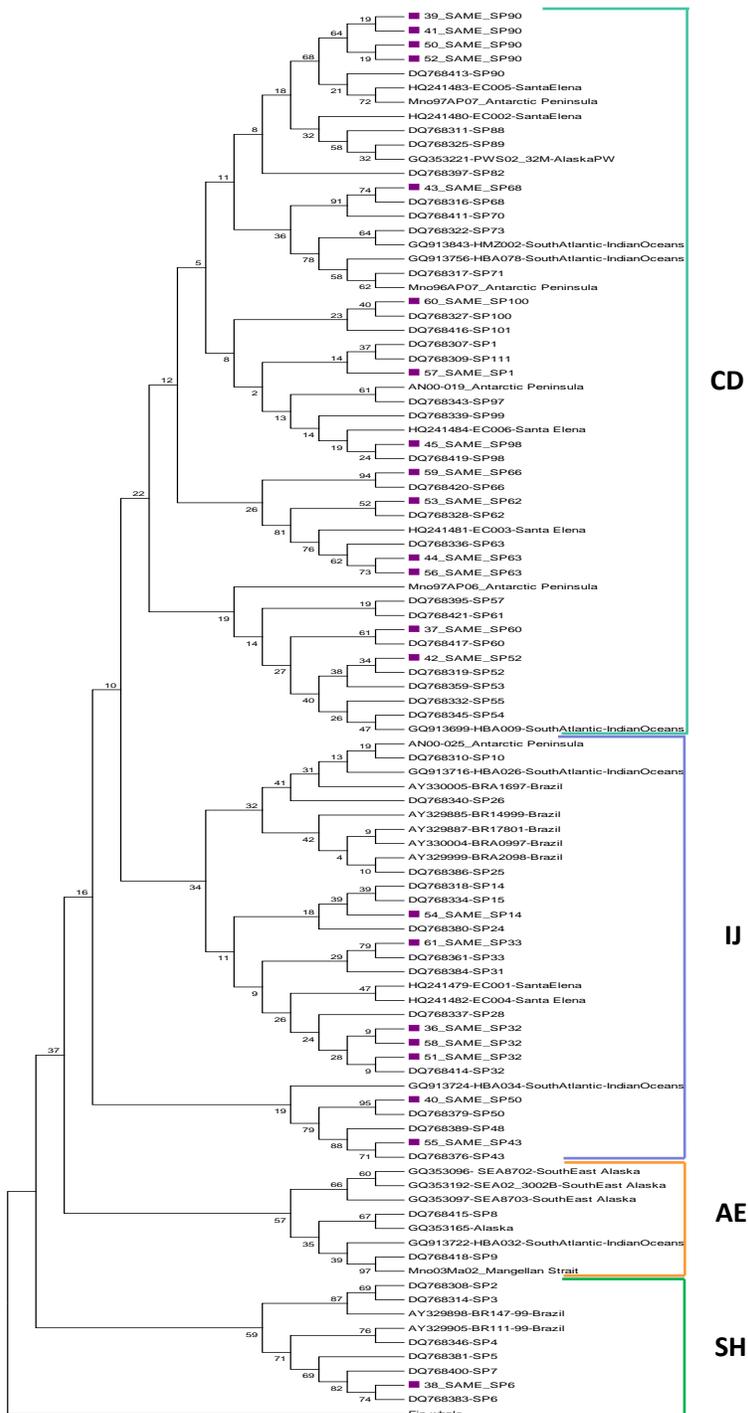
**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación de la región control del ADN mitocondrial. El producto es de aproximadamente 500 pares de bases. Los carriles con los números 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 y 61 corresponden a muestras de ballenas jorobadas; el carril C<sup>+</sup> corresponde al control positivo que se trata de una muestra que amplificaba en la primera fase de esta investigación (Muestra 26).



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación de las regiones SFY/SFX. El tamaño aproximado es de 1100 pares de bases. Los carriles con los números 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60 corresponden a muestras de ballenas jorobadas; el carril C<sup>+</sup> corresponde al control positivo que se trata de ADN humano de mujer.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la restricción con la enzima Taq 1 de los productos de amplificación de las regiones SFY/SFX. La digestión de ADN de ballenas hembra generó fragmentos de 439 pb mientras que la digestión del ADN de los machos produjo fragmentos de dos tamaños diferentes, uno de 439 pb y otro de 621 pb. El patrón de fragmentos de restricción del ADN humano de mujer (control) es el mismo que el de las ballenas macho. Los carriles con las muestras 53, 55, 56, 57, 60 y 61 corresponden a macho; mientras que los carriles con las muestras 54 y 59 corresponden a hembra.



**Figura 5.** Reconstrucción filogenética basada en la región control del ADN mitocondrial (469 pb de longitud) de ballenas jorobadas, usando el método Neighbor-Joining, con un apoyo de 1000 replicaciones bootstrap. Las secuencias marcadas con cuadrados morados corresponden a las 22 muestras recolectadas en la temporada 2012. Las líneas en el lado derecho agrupan a los haplotipos en los clados CD, IJ, AE y SH. El clado AE no contiene ninguna de las muestras obtenidas en este estudio. Se utilizó la especie de *Balaenoptera physalus* o “fin whale” como outgroup, debido a su relación filogenética cercana con las ballenas jorobadas.

## 14. ANEXOS

**Anexo 1.** Datos de las muestras de ballenas jorobadas recolectadas en la costa de Esmeraldas, en la temporada 2012. ND corresponde a no determinado.

Área	# de Muestra	Localización		Fecha de recolección	Haplotipo	Sexo
		UTMN	UTME			
Same-Ecu	36	722561	110597	12/07/2012	SP32	H
Same-Ecu	37	722561	110598	12/07/2012	SP60	H
Same-Ecu	38	722561	110598	12/07/2012	SP6	M
Same-Ecu	39	722561	110598	14/07/2012	SP90	M
Same-Ecu	40	722561	110598	14/07/2012	SP50	M
Same-Ecu	41	722561	110598	16/07/2012	SP90	M
Same-Ecu	42	722561	110598	16/07/2012	SP52	M
Same-Ecu	43	722561	110598	19/07/2012	SP68	H
Same-Ecu	44	722562	110598	29/07/2012	SP63	M
Same-Ecu	45	722562	110598	20/07/2012	SP98	H
Same-Ecu	50	722595	0	24/07/2012	SP90	M
Same-Ecu	51	722595	0	24/07/2012	SP32	H
Same-Ecu	52	722561	110598	25/07/2012	SP90	H
Same-Ecu	53	722561	110598	25/07/2012	SP62	M
Same-Ecu	54	722561	110598	01/08/2012	SP14	H
Same-Ecu	55	722561	110598	02/08/2012	SP43	M
Same-Ecu	56	722561	110598	02/08/2012	SP63	M
Same-Ecu	57	722561	110598	02/08/2012	SP1	M
Same-Ecu	58	722561	110598	03/08/2012	SP32	ND
Same-Ecu	59	722561	110598	03/08/2012	SP66	H
Same-Ecu	60	-----	-----	-----	SP100	M
Same-Ecu	61	-----	-----	-----	SP33	M