



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Análisis de diversidad genética y conectividad de ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*), mediante el análisis de la región control de ADN mitocondrial en la costa de Esmeraldas, Ecuador durante las temporadas 2010-2014.**

**Nina Quilla Espinosa de los Monteros Silva**

**Venancio Arahana, Ph.D., Director de Tesis**

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

Quito, mayo de 2015

**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*), mediante análisis de la región control de ADN mitocondrial, en la costa de Esmeraldas, Ecuador durante las temporadas 2010-2014.**

**Nina Quilla Espinosa de los Monteros Silva**

Venancio Arahana, **Ph.D.**,  
Director de Tesis y Miembro del Comité de Tesis .....

Judith Denkinger, **Ph.D.**,  
Co-directora de Tesis y Miembro del Comité de Tesis .....

Ma. de Lourdes Torres, **Ph.D.**,  
Miembro del Comité de Tesis .....

Stella de la Torre, **Ph.D.**,  
Decana del Colegio de Ciencias Biológicas  
y Ambientales .....

Quito, mayo de 2015

© 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: Nina Quilla Espinosa de los Monteros Silva

C. I.: 1500755283

Lugar y fecha: Quito mayo de 2015

## **Dedicatoria**

A mi madre, por ser mi mejor ejemplo y mi inspiración, por brindarme su apoyo incondicional, su paciencia y ayudarme a ser cada vez mejor.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito y su Departamento de Becas Deportivas y de Excelencia, por darme la oportunidad de combinar mi formación académica y mi pasión deportiva.

A mis profesores, por todo el conocimiento transmitido a lo largo de mi carrera universitaria. A Judith Denkinger por permitirme ser parte de este proyecto A María de Lourdes Torres y Venancio Arahana por su apoyo en la solución de conflictos a lo largo del proyecto.

A la Hosteria “El Acantilado” por su apoyo al desarrollo del turismo científico, a Giovis y Dani y todo el equipo de trabajo de campo por su constante interés y colaboración. A Estefanía Rojas y todos quienes forman parte del Laboratorio de Biotecnología Vegetal-USFQ.

A mi familia por ser eje importante en mi desarrollo académico y personal.

A mis queridos “Biotecnólogos 2010-etc” y al resto de amigos, gracias por las alegrías, las tristezas y por hacer de mi vida universitaria un disfrute total y ser un apoyo constante en el cumplimiento de nuestras metas.

## Resumen

La ballena jorobada es un cetáceo considerado una especie cosmopolita, distribuída en todos los océanos del mundo. Durante muchos años ha sido víctima de actividades de cacería, lo que ha hecho que la cantidad de individuos disminuya en gran cantidad. La información disponible sobre sus ciclos migratorios y conectividad entre las zonas de alimentación y reproducción en el Pacífico Sudeste no es la suficiente para una determinación clara de cómo ocurren estos ciclos. El presente proyecto representa la tercera fase de estudio (Temporadas 2013 y 2014) de una investigación que busca evaluar la diversidad genética de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas, Ecuador. Se obtuvo un total de 25 muestras de piel de ballena mediante dados de biopsia Paxarm. El sexo de los individuos se determinó mediante la amplificación de fragmentos de la región SFX/SFY con el uso de enzimas de restricción (Taq1). También, se amplificó un fragmento de la región control de ADNmt de aproximadamente 500pb, el cual fue secuenciado para determinar los haplotipos a los que corresponde cada individuo. Se identificó 12 haplotipos, 6 para el 2013 y 6 para el 2014. La diversidad de haplotipos ( $H \pm sd$ ) y de nucleótidos ( $\pi \pm sd$ ) para el 2013, fue de aproximadamente  $0.782 \pm 0.015$  y  $0.016 \pm 0.009$ , respectivamente; menor en relación a otras zonas del Hemisferio Sur. Se recopiló datos de todas las fases de estudio (2010-2014) y se estableció diferentes análisis mediante AMOVA, herramienta estadística del programa Arlequin 3.5. La diversidad genética de Esmeraldas se mostró alta en relación a otras zonas del Stock G (Santa Elena y Colombia). En cuanto a las zonas de alimentación del Hemisferio Sur se identificó una diferenciación marcada entre las ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas y el Estrecho de Magallanes, con una mayor conectividad entre las ballenas de Esmeraldas y la zona de alimentación de la Península Antártica. La comparación entre sexos no mostró información relevante.

### Abstract

The humpback whale is considered a cosmopolitan species, distributed all around the world. For many years it has been victim of hunting activities, largely reducing the number of individuals accounted for. The information available on their migratory cycles and connectivity between feeding and breeding areas in the Southeastern Pacific is not enough for a clear determination of how these cycles may occur. This project represents the third phase of a research (2013 and 2014 seasons) that seeks to assess the genetic diversity of humpbacks whales of the coast of Esmeraldas, Ecuador. A total of 25 skin samples were obtained by whale Paxarm biopsy darts. The sex of the individuals was determined by amplifying fragments from the SFX / SFY region using restriction enzymes (Taq1). A fragment of the mtDNA control region of about 500pb, was amplified and sequenced to determine the haplotypes were identified, 6 for the samples collected in 2013 and 6 for the samples collected in 2014. The haplotype ( $H \pm sd$ ) and nucleotide diversity ( $\pi \pm sd$ ) for 2013, was approximately  $0.782 \pm 0.015$  and  $0.016 \pm 0.009$ , respectively; which was, lower in relation to other areas of the Southern Hemisphere. Data from all phases of study (2010-2014) was collected and different analysis were established by AMOVA, a statistical tool from Arlequin 3.5 software. Genetic diversity in Esmeraldas was higher in comparison to other areas in Stock G (Santa Elena and Colombia). As for feeding in the Southern Hemisphere, a marked difference between humpback whales from the coast of Esmeraldas and the Strait of Magellan was found, with a greater connectivity between whales from Esmeraldas and the feeding area of the Antarctic Peninsula. The comparison between sexes showed no relevant information.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Resumen .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
1.1. Características generales de <i>Megaptera novaeangliae</i> .....	14
1.1.1. Zonas de Alimentación.....	15
1.1.2. Zonas de reproducción.....	16
1.2. Distribución poblacional y ciclos migratorios de <i>Megaptera novaeangliae</i> .....	17
1.3. Análisis de ciclos migratorios de <i>Megaptera novaeangliae</i> en base a análisis moleculares. ....	19
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivo General.....	21
2.2. Objetivos Específicos .....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>4. ÁREA DE ESTUDIO.....</b>	<b>23</b>
<b>5. MATERIALES.....</b>	<b>24</b>
5.1. Recolección de muestras de piel de ballenas jorobadas ( <i>M. novaeangliae</i> ).....	24
5.2. Análisis moleculares .....	24
5.2.1. Extracción de ADN de <i>M. novaeangliae</i> .....	24
5.2.2. Cuantificación de ADN de <i>M. novaeangliae</i> .....	24
5.2.3. Electroforesis en gel de agarosa .....	25
5.2.4. Sexaje de <i>M. novaeangliae</i> .....	25
5.2.5. Análisis de la región control de ADNmt de <i>M. novaeangliae</i> .....	25
5.2.6. Análisis estadísticos.....	26

<b>6. MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
6.2. Fases del estudio .....	26
6.1. Recolección de muestras de piel de <i>M. novaeangliae</i> .....	26
6.2. Análisis moleculares .....	27
6.2.1. Extracción de ADN de muestras de piel de <i>M. novaeangliae</i> .....	27
6.2.2. Sexaje de muestras de <i>M. novaeangliae</i> .....	28
6.2.3. Análisis de la región control de ADNmt de <i>M. novaeangliae</i> .....	29
6.3. Análisis estadísticos.....	31
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
7.1. Diversidad genética de <i>M. novaeangliae</i> .....	31
7.2. Comparación interanual de la diversidad genética de individuos <i>M. novaeangliae</i> en Esmeraldas para las temporadas 2010-2014.....	33
7.3. Sexaje de muestras de <i>M. novaeangliae</i> y comparación interanual por sexo de ballenas jorobadas de Esmeraldas (2010-2014).....	33
7.4. Comparación las ballenas jorobadas de Esmeraldas (Julio-Agosto y Septiembre) de las temporadas 2010-2014, con la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes.....	34
7.5. Conectividad de las ballenas jorobadas de las zonas de reproducción del Pacífico Sudeste con las zonas de alimentación (Península Antártica y Estrecho de Magallanes).....	35
7.6. Conectividad de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas (2010-2014) con otras poblaciones del Pacífico Sudeste.....	35
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
8.1. Diversidad genética de ballenas jorobadas en la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010-2014.....	37
8.2. Análisis de diferenciación genética global de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas (2010-2014) y comparación con la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes.....	39

8.3. Análisis interanual por sexo de ballenas jorobadas para las temporadas 2010-2014 de la costa de Esmeraldas. ....	40
8.4. Comparación de los grupos de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas (2010-2014) de los meses de Julio-Agosto y Septiembre, con la Península Antártica y Estrecho de Magallanes. ....	41
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>10. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>
<b>12. TABLAS.....</b>	<b>56</b>
<b>13. FIGURAS.....</b>	<b>65</b>
<b>14. ANEXOS .....</b>	<b>68</b>

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Número de haplotipos, diversidad de haplotipos (H) y nucleótidos ( $\pi$ ) identificados en ballenas jorobadas de las temporadas 2010-2014 en las costas de Esmeraldas, Ecuador. ....	56
<b>Tabla 2.</b> Diversidad de haplotipos de las ballenas jorobadas en la Costa de Esmeraldas durante las temporadas 2010-2014. Se muestra la frecuencia y porcentaje de cada haplotipo (ADNmt) por sexo. ....	57
<b>Tabla 3.</b> Diversidad de haplotipos y nucleótidos de varias zonas del Hemisferio Sur. ....	58
<b>Tabla 4.</b> Comparación interanual de diferenciación genética para las poblaciones de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010-2014. ....	59
<b>Tabla 5.</b> Haplotipos compartidos entre las poblaciones de Esmeraldas (2010-2014) y otras áreas de Pacífico Sudeste. ....	60
<b>Tabla 6.</b> Comparación interanual de ballenas jorobadas hembras de la costa de Esmeraldas, Ecuador, para las temporadas 2010-2014. ....	61
<b>Tabla 7.</b> Comparación interanual de ballenas jorobadas machos, de la costa de Esmeraldas, Ecuador, para las temporadas 2010-2014. ....	62
<b>Tabla 8.</b> Comparación mensual (Julio y Agosto, Septiembre) de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas (2010-2014) con la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes respectivamente. ....	63
<b>Tabla 9.</b> Diferenciación entre grupos de ballenas jorobadas de Esmeraldas y Colombia vs. Península Antártica y Estrecho de Magallanes. ....	64

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Zonas de alimentación y de reproducción de ballenas jorobadas ( <i>M. novaeangliae</i> ) a nivel mundial. ....	65
<b>Figura 2.</b> Área de Estudio de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010-2014 (Playa de Same). ....	66
<b>Figura 3.</b> Límites geográficos del área de estudio de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas, para las temporadas 2010-2014. ....	67

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Datos de las muestras de ballenas jorobadas recolectadas en la costa de Esmeraldas en la temporada 2010 y 2011. ....	68
<b>Anexo 2.</b> Datos de las muestras de ballenas jorobadas recolectadas en la costa de Esmeraldas en la temporada 2012. ....	69
<b>Anexo 3.</b> Datos de las muestras de ballenas jorobadas recolectadas en la costa de Esmeraldas en la temporada 2013 y 2014. ....	70

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Características generales de *Megaptera novaeangliae*

*Megaptera novaeangliae* (Borowski, 1781) es una de las aproximadamente 78 especies del orden de los cetáceos, conocida como ballena jorobada (Chittleborough, 1965; Mikhailiev, 1996), yubarte o xibarte. Pertenece a la familia *Balaenopteridae*. Tiene un gran interés comercial, lo que ha hecho que durante mucho tiempo se encuentre bajo peligro por la caza excesiva de estos ejemplares (Olavarría, 2008).

Son animales de cuerpo robusto, de aproximadamente entre 11.5 y 15 metros de longitud, además de un peso de 25 a 30 toneladas; tomando en cuenta que las hembras suelen ser ligeramente más grandes que los machos (Leviathan, n.d). Poseen largas aletas pectorales las cuales pueden alcanzar alrededor de la tercera parte de la longitud del cuerpo. En la parte superior los individuos presentan una coloración negra y en la parte interna se puede observar regiones variables de color blanco. Tienen barbas córneas numerosas, las cuales están formando placas dispuestas en dos series (Parker & Haswell, 1987), se estima que existen alrededor de 300-329 placas a cada lado de la mandíbula superior para las ballenas jorobadas (Deméré, 2000).

A la ballena jorobada se la conoce por considerarse muy acrobática en su comportamiento debido a los saltos que constantemente realiza, siendo ésta actividad, uno de los distintivos de estos animales. Viven en pequeños grupos, generalmente inestables, siendo lo más común las relaciones entre madre y cría. Sin embargo, en muchas ocasiones pueden observarse grupos de individuos machos, conocidos como grupos competitivos en donde lo que los representa es el cortejo para lograr la atención de alguna hembra. Así también se pueden identificar individuos que se piensa actúan como escoltas para

interacciones madre-cría durante tramos de migración. Estas migraciones madre-cría se sabe que podrían dejar de cierta forma una memoria de los sitios de alimentación y reproducción a las crías lo cual podría contribuir a una determinación más clara de los ciclos migratorios que tendrán los individuos (Acevedo, et al., 2006).

### **1.1.1. Zonas de Alimentación**

Para alimentarse, las ballenas engullen grandes cantidades de agua junto con el alimento. Son capaces de dilatar la garganta por la presencia de pliegues ventrales, luego de esto cierran la boca y el agua se expulsa a través de las barbas. En muchos casos las jorobadas concentran a sus presas con una red de burbujas formada al liberar aire de los pulmones y nadando en círculos cada vez más estrechos alrededor de los cardúmenes (Parker & Haswell, 1987).

*M. novaeangliae* es una especie que se caracteriza por utilizar las zonas con latitudes altas para sus actividades de alimentación (Rasmussen, et al., 2007), en donde las temperaturas superficiales están entre los 2 y 10°C (Flórez-González, et al., 2007). Las condiciones ambientales resultan ser mejores en estas latitudes, para que los individuos puedan utilizar a estas áreas como una fuente de nutrientes (Félix, 2003).

Las zonas de alimentación son abandonadas siguiendo un patrón, así primero las hembras en estado de lactancia, seguidas por los individuos jóvenes, machos y finalmente las hembras en estado de gestación. Estas últimas intentan aprovechar los recursos disponibles en la zona ingiriendo mayores volúmenes de alimento. En muchos casos las hembras deben cumplir también la actividad de alimentación de sus crías, por lo que pueden permanecer más tiempo en las zonas de alimentación, ahorrando más energía para

poder continuar con sus ciclos migratorios (Clapham, 1996). No hay registros de reproducción en latitudes altas, sin embargo, se han podido observar algunos individuos machos durante el fin de la primavera (Clark & Clapham, 2004).

### **1.1.2. Zonas de reproducción**

Las ballenas jorobadas se caracterizan por poblar las áreas de latitudes bajas para sus actividades de reproducción, esto lo hacen durante el invierno (Rasmussen, et al., 2007). Estas zonas generalmente están alrededor de islas y bahías con temperaturas que oscilan entre los 24 y 28°C. En el Hemisferio Sur, zona de interés del estudio, se identifican estas zonas en las áreas de Ecuador y Colombia (Olavarría, 2008).

Machos y hembras alcanzan su madurez sexual aproximadamente en un promedio de 5 años (Chittleborough, 1965; Clapham, et al., 1992). Las hembras tienen crías aproximadamente cada 2 o 3 años (Clapham & Mayo, 1987), las cuales requieren entre 11 o 12 meses de periodo de gestación para su nacimiento. Éste ocurre en aguas tropicales, y luego de un entrenamiento para sobrevivir de aproximadamente 6 meses, pueden llegar a ser independientes (Clapham & Mayo, 1987; Clapham, et al., 1993).

Se sugiere que las madres buscan zonas de aproximadamente 20 metros de profundidad para llevar a sus crías (Félix, 2003). Incluso se dice que las ballenas jorobadas son uno de los cetáceos más ágiles en sus actos de cortejo que se llevan a cabo en estas áreas (Pairoa-Riofrío, 2003). En este caso, los primeros individuos en abandonar las zonas de reproducción son las hembras en estado de gestación, para empezar la migración hacia las zonas de latitudes altas (Clapham, 1996).

## 1.2. Distribución poblacional y ciclos migratorios de *Megaptera novaeangliae*

Las ballenas jorobadas realizan migraciones caracterizadas por ser estacionales entre las áreas de reproducción en latitudes bajas y las áreas de alimentación en latitudes altas (Rice, 1998). El tiempo que dure un ciclo migratorio puede variar considerablemente dependiendo de las características de los individuos, condiciones ambientales y zonas geográficas en las que se lleve a cabo (Clapham & Mattila, 1988). De forma general, a las ballenas jorobadas se las puede clasificar geográficamente por su ubicación en tres grupos, divididos en: Atlántico Norte, Pacífico Norte y Hemisferio Sur. Las sub-clasificaciones varían dependiendo del movimiento de los individuos hacia zonas de alimentación y de reproducción. En verano existen subpoblaciones que se alimentan en el Hemisferio Norte, mientras en invierno éstas se mezclan en las zonas de reproducción (Clapham, 2000).

En el Atlántico Norte se identifican cuatro grupos de alimentación: el Golfo de Maine, Este de Canadá, Groenlandia Occidental y Atlántico Nororiental; en invierno, estos grupos migran hacia una zona de reproducción ubicada en India Occidental (González, 2002; Olavarría, 2008). Para el Pacífico Norte, los individuos que se alimenta en Alaska migran principalmente hacia aguas hawaianas para su reproducción; y aquellas ballenas que se alimentan en las costas de California, Oregón y Washington, migran hacia la península de Baja California y México Continental con el mismo fin (Clapham, 2000; Olavarría, 2008). Algunas ballenas pueden migrar mucho más hacia el sur, llegando incluso a encontrarse con individuos del Pacífico Sur, cerca de Costa Rica (González, 2002; Palacios-Alfaro et al., 2012).

El Hemisferio Sur, presenta subpoblaciones en verano e invierno (Baker, et al, 1998) seis subgrupos de alimentación (I-VI) y siete grupos subpoblaciones de

reproducción, clasificadas en stocks (A-G) (IWC, 2005). Así entonces existen movimientos constantes entre las zonas de alimentación y reproducción. El grupo de individuos del stock G (Costa Rica, Panamá, Colombia y Ecuador) migra hacia el área I. Los individuos del stock A migran hacia el Área II, los individuos del stock B migran hacia el área II y III, las ballenas del stock C migra hacia el área III. El stock D migra hacia el área IV, el stock E migran hacia el área V y finalmente los grupos de ballenas del stock F presenta migración hacia el área VI (Figura 1) (Olavarría, 2008; Flórez-González et al., 2007).

### **1.2.1. Ballenas jorobadas en el Hemisferio Sur.**

Las ballenas jorobadas migran a lo largo de la costa oeste de Sudamérica con zonas de reproducción en Ecuador y Colombia (Stock G). Además de zonas de alimentación en la costa oeste de la Península Antártica y en el Estrecho de Magallanes al sur de Chile. Para los individuos del Stock G (Ecuador y Colombia), se identifica una sola zona de alimentación, ubicada en la Antártica, parte de Área I (Figura 1) (Donovan, 1991). Con resultados de estudios genéticos y demográficos se ha confirmado que existe una relación entre estas dos zonas (Olavarría, 2008).

### **1.2.2. *Megaptera novaeangliae* en Ecuador**

Las ballenas jorobadas visitan las costas ecuatorianas entre finales del mes de mayo hasta aproximadamente octubre, mostrando una mayor presencia en el territorio en los meses de julio y agosto. Mediante registros se ha podido determinar que agosto es el mes en el cual ocurren la mayor cantidad de nacimientos (Constanza, 2003; Scheidat, et al., 2000; Flórez-González et al., 2007; Félix & Haase, 2001); momento en el cual las madres buscan sitios con las condiciones adecuadas para las nuevas crías, como bajas profundidades y temperaturas más cálidas (Félix, 2003).

Ecuador forma parte del stock G; para este stock, mediante estudios moleculares previos se ha sugerido panmixia y heterogeneidad (Félix, et al., 2007). Esto posiblemente se debe a la diferencia en los movimientos migratorios de hembras. Además en estudios de años anteriores (2010-2012) se ha identificado una mayor proporción de haplotipos únicos para Ecuador, comparados con datos de Colombia; y una alta variabilidad genética en relación al Estrecho de Magallanes (Dalgo, 2013; Rojas, 2014; Félix, et al., 2007).

### **1.3. Análisis de ciclos migratorios de *Megaptera novaeangliae* en base a análisis moleculares.**

Hoy en día para el análisis de los ciclos migratorios, el uso de técnicas moleculares para la identificación de individuos es la mejor opción. Considerando que la foto-identificación es un método que ha sido utilizado en otras investigaciones pero muestra muchas inconsistencias para diferenciación efectiva de los individuos (Acevedo, 2007).

Otro de los factores que podría ser influyente en su comportamiento es el sexo de los individuos. Éste puede aportar información para establecer una mejor comparación y obtención de datos sobre la especie (Valsecchi, et al., 2010); datos que también son posibles mediante técnicas moleculares. *M. novaeangliae* no presenta dimorfismo sexual, por lo que la determinación del sexo de las ballenas se realiza con una amplificación de fragmentos de la región SFX/SFY del genoma de cada uno de los individuos, y el uso de enzimas de restricción (Palsboll et al, 1992).

El ADN mitocondrial es una molécula de herencia materna, es decir, que se mantiene en las generaciones de los individuos a lo largo del tiempo. Es útil para identificar la variedad de haplotipos que puedan existir en un grupo. Considerando que los haplotipos

son una representación genómica de los alelos de un individuo, con una secuencia de bases resultado de posibles eventos de recombinación (Clapham, 2000).

La molécula del ADN mitocondrial representa solo una pequeña fracción del genoma del organismo, aun así, ha sido el marcador molecular más popular para el estudio de diversidad genética en animales durante las tres últimas décadas (Awise, et al., 1987; Moritz, et al., 1987). Es un análisis escogido ya que su amplificación es relativamente fácil y esta región del genoma presenta una alta tasa de mutación (Gissi, et al., 2008). Tomando en cuenta las variaciones que pueda presentar la secuencia, es posible la identificación de la variabilidad genética de una población de ballenas (Baker et al, 1993). Esto puede generar alguna señal sobre la historia de una población en periodos cortos de tiempo (Galtier, et al., 2009). Posteriormente, la caracterización genética de los individuos, se lleva a cabo mediante un análisis estadístico, que permite establecer diferentes relaciones con grupos de individuos cercanos a los individuos de estudio. En este caso, identificar la conectividad entre los grupos de ballenas del Hemisferio Sur (Olavarría, 2008).

En la presente investigación se utilizaron técnicas moleculares para la extracción de ADN mediante protocolo de CTAB. La determinación de sexaje incluyó el uso de enzimas de restricción y para la determinación de la diversidad genética se realizó análisis molecular de ADN mitocondrial de ballenas. Cada resultado fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa, para entonces proseguir con los análisis estadísticos correspondientes de los datos. Esto siguiendo procedimientos expuestos en estudios previos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Analizar la diversidad genética y conectividad de ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) en las costas de Esmeraldas-Ecuador, mediante análisis de la región control del ADN mitocondrial, para las temporadas 2010-2014.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la diversidad de haplotipos para las ballenas de las costas de Esmeraldas de las temporadas 2013 y 2014 mediante el análisis de la región control de ADN mitocondrial.
- Establecer un análisis de conectividad de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas, Ecuador (2013 y 2014), con las zonas de alimentación de la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes.
- Realizar análisis de diversidad genética y comparación de los grupos de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas (2010-2014) con las zonas de alimentación de la Península Antártica y Estrecho de Magallanes considerando el año de estudio.

## 3. JUSTIFICACIÓN

*M. novaeangliae* ó ballena jorobada es una especie cosmopolita, distribuída en todos los océanos del mundo (Rosenbaum, et al., 2009). Son animales que se caracterizan por presentar flujos migratorios extensos a lo largo del mundo, visitando zonas de reproducción y alimentación dependiendo de las estaciones climáticas y sus necesidades. Las características de estas zonas de reproducción son de gran importancia para que las

ballenas puedan cumplir con sus actividades.

Antes de la implementación de políticas de protección internacional, la población de ballenas jorobadas se redujo de 5000 individuos a 200 individuos en algunas subpoblaciones alrededor de todo el mundo (Baker et., 1993; Constanza, 2003; Félix, 2003). En el Pacífico Sudeste se estima que la población de ballenas está entre 3000 a 4000 individuos (Olavarría, 2008). A pesar de que la cacería de ballenas esté prohibida, no existen políticas para el control de actividades que puedan causar daños o heridas a estos cetáceos (Félix, 2003). La venta de productos obtenidos a partir de ballenas de forma ilegal es también una problemática de interés pues, no hay regulaciones dentro del comercio de estos productos a baja escala. Es decir, solo se prohíbe la comercialización ilegal al tratarse de cargamentos pesados (Baker & Palumbi, 1994).

Las ballenas son de gran importancia en los mares porque ayudan a la producción de plancton. Cuando se alimentan a grandes profundidades y vuelven a la superficie para respirar, permiten expandir nutrientes y microorganismos; además de que el nitrógeno de su orina y heces funcionan como fertilizantes para el plancton. El fitoplancton es un mecanismo de reducción de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, ya que es capaz de capturarlo y generar oxígeno (Fondear, 2005). Por esto, su presencia en los mares es un aspecto clave en la conservación de los ecosistemas.

Esmeraldas representa una de las áreas de reproducción para las ballenas, correspondiente al stock G (Donovan, 1991). Este estudio recopila información sobre los individuos observados los dos últimos años. De gran importancia, ya que para el Pacífico Sudeste, especialmente Ecuador, no se tiene suficiente información genética que pueda aportar a explicar mejor los ciclos migratorios.

El presente trabajo nos permite conocer más acerca de la información genética, comportamiento y migración de las ballenas de la zona de Esmeraldas. Fomentando la implementación de mejores políticas y acciones de control para la protección de las poblaciones de *M. novaeangliae* en territorio ecuatoriano. Nos permite además, identificar la posible conectividad entre el territorio ecuatoriano con otras zonas del Hemisferio Sur. Principalmente la relación entre la costa de Esmeraldas (Zona de reproducción del Stock G), con la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes (Zonas de alimentación) (Olavarría, 2008). Precisamente, considerando que no se tiene certeza de la conectividad entre el Estrecho de Magallanes y Ecuador (Acevedo, et al., 2006). Todo esto tomando en cuenta los factores que puedan influenciar en las diferentes variaciones, ciclos e índices de diferenciación entre las poblaciones (Baker, 1987). El desarrollo del proyecto mediante técnicas moleculares y estadísticas, da paso a un análisis de la variabilidad genética de las ballenas, distribución de los diferentes haplotipos, aportando información al aspecto de conservación de estos animales.

#### **4. ÁREA DE ESTUDIO**

Las ballenas jorobadas visitan las costas ecuatorianas desde el mes de junio hasta septiembre y en algunos casos hasta el mes de octubre cada año, con fines de reproducción. La recolección de muestras de piel de ballena se llevó a cabo desde julio hasta septiembre para el año 2013; y desde agosto a septiembre para el año 2014, en la provincia de Esmeraldas, cantón Atacames, en el sector conocido como “Bajos de Atacames”, cercano a la playa de Same (Figura 2). El área va 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'' (Figura 3). El análisis molecular de las muestras se llevó 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 (*M. novaeangliae*)**

- GPS.
- Rifle modificado de calibre 0.22 (Paxarm).
- Dardos de biopsia (Paxarm).
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Etanol al 70%.
- Pinzas de disección.

### **5.2. Análisis moleculares**

#### **5.2.1. Extracción de ADN de *M. novaeangliae***

- Muestras de piel de ballena.
- Nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>).
- Buffer de extracción CTAB 2X.
- 2, B-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).
- Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1).
- Isopropanol frío (-20°C).
- Etanol al 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 de *M. novaeangliae***

- NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

- Buffer TE (Tris base 10mM (Invitrogen), EDTA 1mM (Invitrogen), pH 8.0).
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO).

### **5.2.3. Electroforesis en gel de agarosa**

- SeaKem LE Agarose.
- TBE 1X (Tris base-Ácido bórico-EDTA).
- SYBR Safe ADN gel stain (GIBCO).
- Blue Juice 10x Loading BUffer (Invitrogen).
- Ladder ADN 100bp (Invitrogen).
- MGU-502T Electrophoretic Gel System (C. B. S Scientific).
- Fuente de Poder EPS -300 II ( C.B.S Scientific).
- Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD).

### **5.2.4. Sexaje de *M. novaeangliae***

- 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) (Palsboll, et al., 1992).
- Taq DNA polimerasa 0.4 U (Invitrogen).
- Taq 1 endonucleasa de restricción 10 U (Invitrogen).
- T Personal Thermocycler (Biometra).

### **5.2.5. Análisis de la región control de ADNmt de *M. novaeangliae***

- 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) (Palsboll, et al., 1992).
- Taq DNA polimerasa 1 U (Invitrogen).
- T Personal Thermocycler (Biometra).
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf).

#### **5.2.6. Análisis estadísticos**

- Software Mega version 6 (Tamura *et al.*, 2011).
- Software Arlequín version 3.5. (Excoffier, Laval & Schneider, 2005).

## **6. MÉTODOS**

### **6.2. Fases del estudio**

El estudio genético acerca de ballenas jorobadas en la costa de Esmeraldas, Ecuador, ha comprendido hasta el momento 3 fases de análisis. La primera fase realizada por Dalgo (2013) correspondiente a los años 2010 y 2011. La segunda fase, realizada por Rojas (2014) correspondiente al año 2012, y la tercera fase, correspondiente a los años 2013 y 2014. El presente trabajo abarca el análisis de la tercera fase y un análisis global de información de las temporadas estudiadas (2010-2014).

#### **6.1. Recolección de muestras de piel de *M. novaeangliae***

En Same, ubicado las costas de la provincia de Esmeraldas-Ecuador, para esta fase de estudio se realizó la recolección de muestras durante los meses de julio a septiembre. Se recolectaron 25 muestras de piel de ballena; 13 correspondientes al año 2013, y 12 para el año 2014, siguiendo el protocolo de toma de muestras de Paxarm (Krutzen et al., 2002), las

recomendaciones, parámetros, observaciones indicadas en la Guía de Observación De Ballenas Jorobadas (Félix, 2003). Además se tomó datos biogeográficos importantes como la hora, coordenadas del sitio de observación, profundidad aproximada, principales patrones de comportamiento, es decir, si estos eran individuos solitarios o grupos, si se encontraban saltando o desplazándose. Además datos de las condiciones climáticas durante las expediciones que duraron un promedio de 6 horas diarias.

La toma de muestras incluye una serie de pasos, se realiza el acercamiento hasta el individuo elegido y se ejecuta el disparo con el dardo de biopsia, hacia la región cercana a la aleta posterior de la ballena. El dardo diseñado exclusivamente para este tipo de prácticas, penetra algunos milímetros la piel del individuo, reteniendo un mínimo de piel. Entonces el dardo cae al mar y es recogido manualmente para extraer cuidadosamente la porción de piel que se coloca en tubos eppendorf con etanol al 70%, debidamente rotulado.

La información registrada previa al disparo permitió que se descarten posibilidades de duplicados. Las muestras de piel fueron entregadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito por Judith Dekinger (USFQ) e integrantes del proyecto "CETÁCEA-Ecuador, 2014" para posteriores análisis experimentales.

## **6.2. Análisis moleculares**

### **6.2.1. Extracción de ADN de muestras de piel de *M. novaeangliae***

A partir de las muestras de piel de ballena, se siguió el protocolo de extracción de ADN utilizando CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Kieleczawa, 2006). Aproximadamente 100 mg de cada muestra de piel de ballena se trituró con nitrógeno líquido, utilizando un mortero y pistilo desinfectados con alcohol al 70%. Inmediatamente

se añadió 800uL de CTAB 2X y se transfirió la mezcla a un tubo eppendorf de 1.5 mL debidamente rotulado; se añadió 8uL de B-mercaptoetanol y cuidadosamente se homogenizó las muestras para luego incubarlas en una cama de arena aproximadamente a 62°C durante una hora, invirtiendo los tubos cada 10 minutos.

Se añadió 500uL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo y se centrifugó por 20 minutos a 13200 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf estéril y se añadió aproximadamente 500uL de isopropanol frío. Se invirtieron los tubos cuidadosamente para homogenizar las muestras y luego se las centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante fue eliminado y se añadió 800uL de etanol al 75% para lavar el pellet. Se eliminó cuidadosamente el etanol, se dejó secar el pellet en una cámara de flujo laminar y finalmente se resuspendió el pellet con 70uL de buffer TE. Se almacenó las muestras de ADN debidamente rotuladas, a -20°C.

Para comprobar la exitosa extracción de ADN, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% durante 1 hora a 80V, y luego se tomó una foto del gel con un fotodocumentador Gel Doc XR (BioRad). Adicionalmente las muestras fueron cuantificadas mediante un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

### **6.2.2. Sexaje de muestras de *M. novaeangliae***

Con el ADN extraído se procedió a la amplificación de las regiones SFX/SFY del genoma de *M. novaeangliae*, mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Saiki, et al., 1988). Siguiendo el protocolo de Palsboll, et al (1992). El volumen final de la reacción fue de 20uL (20mM de Tris pH 8.4, 50mM de KCl, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200uM de dNTPs, 0.5mg/mL de BSA, 0.5uM de cada primer, 40 ng de ADN y 0.4 unidades de Taq DNA

polimerasa (Invitrogen)). Los primers utilizados fueron SFY1204/SFY0097 (Palsboll, et al., 1992). Con un termociclador Biometra T-Personal se siguió un programa térmico que inició con una desnaturalización a 94°C por 2 minutos, seguida por 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. Como control positivo se usó ADN humano de mujer. El producto de amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, colocando 5µl del producto de PCR, 2 µl de SYBR Safe y se corrió a 100V por 45 minutos. Se fotografió el gel en un fotodocumentador BIORAD (Palsboll, et al., 1992).

A continuación 10uL del producto de PCR fueron sometidos a la acción de 10 unidades de enzima de restricción Taq1 (Invitrogen) durante una hora a 60°C. El producto de la reacción se corrió en un gel de agarosa al 3% con 2uL de SYBR Safe a 80V durante 1 hora y media. Se fotografió el gel con el fotodocumentador para identificar el patrón de fragmentación. Según Palsboll, et al (1992) las bandas que se identifica para el análisis siguen un patrón determinado. El control positivo se caracteriza porque muestra un patrón de fragmentación similar al esperado para ballenas machos, generando 2 bandas de 439 y 621pb aproximadamente. Mientras se sabe que para ballenas hembras se identifica un patrón de una sola banda (439pb aproximadamente).

### **6.2.3. Análisis de la región control de ADNmt de *M.novaeangliae***

Se amplificó un fragmento correspondiente a la región control del ADN mitocondrial las ballenas jorobadas, de aproximadamente 500pb, mediante PCR (Saiki, et al., 1988). La reacción en cadena de la polimerasa tuvo un volumen final de 50uL, se utilizó los primers: t-Pro-whale D1p1.5 (5'TCACCCAAAGCTGRARTTCTA-3') y D1p8

(5'CCATCGWGATGTCTTATTTAAGRGGAA-3') (Palsboll, et al., 1992) (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) (Baker, et al., 1998; Olavarría, et al., 2007; Félix, et al., 2012). La amplificación se realizó en un termociclador T-personal Biometra, con el programa térmico que consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, seguida por 36 ciclos de 94°C durante 30 segundos, hibridación de primers a 55,5°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto con 30 segundos, y una extensión final a 72 ° C durante 5 minutos (Félix, et al., 2007; Dalgo, 2013).

Se realizó la electroforesis utilizando 10uL de muestra de ADNmt con 3uL de Blue Juice 10X (Invitrogen) en gel de agarosa al 1% durante 1 hora a 80V (Dalgo, 2013). Antes de la secuenciación es importante confirmar una calidad adecuada de las muestras, para lo cual se las cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Posteriormente los productos de la PCR se enviaron a Functional Biosciences, Inc. En Madison, EE.UU, para su secuenciación con un secuenciador de ADN ABI 3730xl.

Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando “ClustalW” del programa Mega 5 (Tamura, et al., 2011; Thompsom, et al., 1994). Se recortó las secuencias hasta 469pb a partir de la posición 6 para que coincida con una región consenso (Olavarría et al, 2006; 2007; Félix, et al., 2012; Dalgo, 2013). Las secuencias fueron editadas y completadas. Con las secuencias listas se realizó una búsqueda de homología de cada una de las secuencias con información almacenada en el GenBank mediante la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) herramienta brindada por la página web del Centro Nacional de

Información sobre Biotecnología (NCBI), para determinar los haplotipos a los que correspondían cada muestra.

### **6.3. Análisis estadísticos**

Para el cálculo de la diversidad genética de los grupos de individuos en estudio se utilizó el programa Arlequin 3.5 (Excoffier, et al., 1992), que proporcionó el nivel de diversidad de haplotipos ( $H$ ) y el nivel de diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ). La diversidad de haplotipos representa la probabilidad de que dos haplotipos muestreados al azar sean diferentes. La diversidad de nucleótidos indica cómo se define el número promedio de diferencias de nucleótidos por cada sitio (Shane, 2005).

Por otra parte las distancias genéticas entre los individuos de las áreas de reproducción se determinaron mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) que está implementado en el mismo programa, Arlequin 3.5 (Excoffier, et al., 1992), para lograr un cálculo de las diferencias en las frecuencias de haplotipos ( $F_{ST}$ ), así como diferenciación de nucleótidos ( $\Phi_{ST}$ ) (Shane, 2005; Rojas, 2014).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Diversidad genética de *M. novaeangliae*.**

Para la primera fase del estudio, a partir de 35 muestras se identificaron 19 haplotipos diferentes, con una diversidad de haplotipos de  $1.0000 \pm 0.0068$  ( $h \pm sd$ ) y de  $0.0209 \pm 0.0109$  a nivel de nucleótidos ( $\pi \pm sd$ ) (Dalgo, 2013). Para la segunda, a partir de 21 muestras se identificaron 16 haplotipos diferentes, con valores de  $0.9567 \pm 0.0290$ , mientras la diversidad de nucleótidos ( $\pi \pm sd$ ) fue de  $0.0214 \pm 0.0113$  (Tabla 1) (Rojas, 2014). Para la tercera fase, a partir de 25 muestras se identificaron 12 haplotipos, con una

diversidad de haplotipos de  $0.782 \pm 0.105$  para el 2013 y de  $0.864 \pm 0.072$  para el 2014; mientras la diversidad de nucleótidos fue de  $0.016 \pm 0.009$  y  $0.015 \pm 0.009$ , para las temporadas 2013 y 2014 respectivamente (Tabla 1).

Tomando en conjunto las temporadas 2010-2014, existe un total de 81 muestras, con un total de 27 haplotipos (Tabla 2). La diversidad de haplotipos fue de  $0.927 \pm 0.015$  ( $H \pm SD$ ) mientras la diversidad de nucleótidos fue de  $0.019 \pm 0.010$  ( $\pi \pm sd$ ) (Tabla 1). Estos resultados fueron comparados con información de diversidad reportada para el Hemisferio Sur, y se encontró que la diversidad de nucleótidos es similar a otras regiones del Stock G (Colombia (0.019) y Santa Elena (0.019)); y zonas de alimentación como el Área I de la Península Antártica (0.019) y el Estrecho de Magallanes (0.010). El Área II de la Península Antártica, por otra parte, muestra valores más altos de diversidad nucleotídica (0.025) que Esmeraldas (0.019) (Tabla 1). En cuanto a la diversidad de haplotipos, Esmeraldas (0.927) mostró mayor diversidad que Colombia (0.900), Santa Elena (0.922) y las zonas de alimentación de la Península Antártica (Área I (0.913) y Área II (0.916)) y superior de forma marcada en comparación con el Estrecho de Magallanes (0.339) (Tabla 3).

No se identificó ningún nuevo haplotipo, para las temporadas 2013 y 2014. El número de haplotipos en comparación a las fases anteriores de estudio (2010-2012) fue menor. En años anteriores (2012), 3 haplotipos fueron identificados por primera vez en Ecuador (SP63, SP43 y SP66) (Rojas, 2014), mientras en las temporadas 2013 y 2014 se identificó 2 haplotipos (HBA023, HBA075) correspondientes al Océano Índico y Sur del Atlántico (Félix, et al., 2006, 2007, 2012; Rosenbaum, et al., 2009).

## **7.2. Comparación interanual de la diversidad genética de individuos *M.***

### ***novaeangliae* en Esmeraldas para las temporadas 2010-2014.**

En cuanto a la frecuencia y composición de nucleótidos fue en la primera fase del estudio en donde se encontraron diferencias entre el año 2010 y 2011 ( $F_{ST}=0.08778$ ,  $p<0.05$ ;  $\Phi_{ST}=0.08778$ ,  $p<0.00001$ ) (Tabla 4) (Dalgo, 2013). En el resto de temporadas de estudio no se evidenciaron diferencias relevantes entre los grupos de ballenas.

En cuanto a los haplotipos, la mayor cantidad de haplotipos compartidos se encuentran entre las ballenas del 2010 y 2012, con 6 haplotipos compartidos; y las temporadas que menos haplotipos comparten corresponden a los años 2011 y 2014 con un solo haplotipo (Tabla 5).

## **7.3. Sexaje de muestras de *M. novaeangliae* y comparación interanual por sexo de ballenas jorobadas de Esmeraldas (2010-2014).**

Para la primera fase de estudio, con 35 muestras, 4 fueron hembras y 31 machos, con una proporción de 8:1 (machos: hembras) (Anexo 1) (Dalgo, 2013). Para la segunda fase, a partir de 22 muestras se registraron 8 hembras y 13 machos, descartando una de las muestras por poseer poca cantidad de ADN, con una proporción de sexos de 1.6:1 (machos: hembras) (Anexo 2) (Rojas, 2014).

En el presente estudio, de las 13 muestras que corresponden al año 2013 se obtuvo 5 hembras y 8 machos, con una proporción 1.6:1 (machos: hembras). En el 2014, de 12 muestras, 1 fue identificada como hembra, mientras 11 se identificaron como machos, con una proporción de 11:1 (machos: hembras). Con esto, un total de 6 individuos hembras, y

19 individuos machos para las temporadas 2013-2014. Tomando en conjunto el periodo 2010-2014 se obtuvo un total de 81 muestras, de las cuales 63 son machos, 18 hembras.

Dentro de Esmeraldas, para el análisis interanual por sexo, en hembras, las temporadas entre las cuales los individuos mostraron menos diferenciación fueron entre 2010 y 2012, 2011 y 2012, 2011 y 2013, 2011 y 2014, 2012 y 2013 (Tabla 6). Para los machos, las relaciones entre las diferentes temporadas que mayor conectividad mostraron fueron entre 2011 y 2013, 2012 y 2013 (Tabla 7).

#### **7.4. Comparación las ballenas jorobadas de Esmeraldas (Julio-Agosto y Septiembre) de las temporadas 2010-2014, con la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes**

Tomando en cuenta los ciclos migratorios de *M. novaeangliae*, se realizó una comparación con el fin de conocer las posibles rutas migratorias de los individuos que visitan la zona de Esmeraldas y las zonas de alimentación de la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes. Al encontrarse el Estrecho de Magallanes más al norte, se esperaría que los individuos muestreados en Esmeraldas, el primer mes (Junio) de la temporada, muestren conectividad con esta zona; y los individuos muestreados para los siguientes meses muestren más conectividad con la Península Antártica ubicada más al sur (Félix & Haase, 2001; Stevick, et al., 2004).

La primera comparación se estableció entre los individuos identificados en los meses de julio-agosto con la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes. Se realizó el análisis mediante AMOVA del programa Arlequin. Se identificó una diferenciación más baja entre los grupos de ballenas de Esmeraldas (Julio-agosto) con la Península Antártica

( $F_{ST}=0.0007$  ( $p<0.00001$ ) y  $\Phi_{st} = 0.07668$  ( $p< 0.00001$ )), que entre las ballenas de Esmeraldas (Julio-agosto) con el Estrecho de Magallanes ( $F_{ST}=0.21374$  ( $p<0.00001$ ) y  $\Phi_{st} = 0.34693$  ( $p< 0.00001$ )) (Tabla 8).

Otro de los análisis se centró en la comparación de los individuos muestreados en la costa de Esmeraldas en el mes de septiembre, con el Estrecho de Magallanes y la Península Antártica. Se identificó mayor semejanza con la Península Antártica con valores de  $F_{ST}=0.17552$  ( $p<0.00001$ ) y un  $\Phi_{st}= 0.47102$  ( $p< 0.00001$ ), contrario a lo esperado.

#### **7.5. Conectividad de las ballenas jorobadas de las zonas de reproducción del Pacífico Sudeste con las zonas de alimentación (Península Antártica y Estrecho de Magallanes).**

El presente análisis se realizó con el afán de comprender la relación que puedan tener los individuos que visitan las zonas de reproducción de Ecuador y Colombia con la Península Antártica y Estrecho de Magallanes. Intentando relacionar los sitios en los que se estarían alimentando los individuos dentro de sus ciclos migratorios. Se determinó que los individuos de Ecuador y Colombia mantienen una diferenciación baja con la Península Antártica, es decir están más relacionados con esta zona, mostrando valores de  $F_{ST}=-0.00083$  ( $p=0.68035$ ) y un  $\Phi_{st}= 0.08833$  ( $p< 0.00001$ ) (Tabla 9).

#### **7.6. Conectividad de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas (2010-2014) con otras poblaciones del Pacífico Sudeste.**

Los grupos de ballenas jorobadas de Ecuador se compararon con los de otras áreas de reproducción del Stock G (Santa Elena y Colombia) y de alimentación del Pacífico Sudeste (Península Antártica y Estrecho de Magallanes) (Olavarría, et al., 2006). Para las

temporadas 2013 y 2014 se identificó 12 haplotipos, de los cuales el más frecuente correspondió al SP90, el cual ha sido reportado como el haplotipo más común del Pacífico Sudeste (Félix, et al., 2006), coincidiendo con las dos fases anteriores de estudio (2010-2011 y 2012) (Dalgo, 2013; Rojas, 2014). El segundo haplotipo más frecuente para las mismas temporadas fue el HBA075, no registrado en las fases anteriores del estudio (Dalgo, 2013; Rojas, 2014), común en las regiones del Océano Índico y Sur del Atlántico (Rosenbaum, et al., 2009). El tercer haplotipo más frecuente es el SP32, identificado de igual forma como el tercero más frecuente en la primera fase del estudio (Dalgo, 2013). Además de registrarse como el segundo haplotipo más común en la segunda fase de estudio (Rojas, 2014), y en las zonas de Salinas, Colombia y la Península Antártica (Félix, et al., 2006,2007; Olavarría, 2008).

Con el total de 27 haplotipos presentes en el área de Ecuador (Tabla 1) para las temporadas 2010-2014, se identificó al haplotipo SP32 como el más común, seguido del SP90, el SP1 y el SP62, estos dos últimos en igual proporción (Tabla 1). Los grupos de individuos que comparten el mayor número de haplotipos son los de Esmeraldas (2012) y la Península Antártica con 13 haplotipos compartidos (Tabla 3). Por otra parte, se identificó que los 4 haplotipos identificado para el Estrecho de Magallanes (Olavarría, 2008), están compartidos con Esmeraldas (2010-2014); uno de estos (SP90) está dentro de los haplotipos más comunes para el Pacífico Sudeste (Félix, et al., 2006).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Diversidad genética de ballenas jorobadas en la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010-2014.

La diversidad genética de las ballenas durante las temporadas 2010-2014 se reflejó en los valores de diversidad de haplotipos ( $(H \pm SD)$   $0.927 \pm 0.015$ ) y de diversidad de nucleótidos ( $(\pi \pm SD)$   $0.019 \pm 0.010$ ) (Tabla 1). Estos valores no han variado significativamente cada año. La diversidad de haplotipos más baja se registró en el año 2013 con un valor de  $0.782 \pm 0.105$  (Tabla 1). Para la diversidad de nucleótidos ( $\pi \pm SD$ ) el valor más bajo correspondió al año 2014 con valores de  $0.019 \pm 0.010$ . De forma general, esta diversidad en Esmeraldas, muestra valores cercanos a los de otras regiones del Hemisferio Sur, superando la diversidad de algunos sitios como las Islas Cook, Polinesia Francesa, Colombia y Santa Elena (Olavarría, 2008). Para las áreas de alimentación, supera la diversidad de la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes (Tabla 3) (Olavarría, 2008; Félix, et al., 2007, 2012). Estos resultados coinciden con las fases anteriores de este estudio (Dalgo, 2013; Rojas, 2014).

Aun con un número bajo de muestras, el número de haplotipos identificados en Esmeraldas (2010-2014) fue alto, esto nos sugiere que la diversidad genética en general es alta. Esta información es respaldada con estudios anteriores, como el realizado por Félix, et al., 2012 sobre “Diversidad genética y estructura de la población de ballenas jorobadas (*M. novaeangliae*) de Ecuador con base en análisis de ADN mitocondrial” en donde Ecuador con un menor número de muestras que Colombia, mostró el mismo número de haplotipos. Para las zonas de alimentación, por otra parte, se ha registrado un estudio en el Estrecho de Magallanes en donde a partir de una población de 52 muestras, apenas pudieron

encontrarse 4 haplotipos (Olavarría, et al., 2007). Los resultados de estos estudios respaldan datos obtenidos en las fases anteriores de la investigación (Dalgo, 2013; Rojas, 2014) en donde la diversidad genética para Ecuador también se habría mostrado mayor que el resto de zonas del Stock G. Esto sugiere que las ballenas que atraviesan el Pacífico Sudeste, dentro de sus ciclos migratorios visitan frecuentemente el área de reproducción ubicada en las costas ecuatorianas de Esmeraldas (Félix, 2008).

La diversidad genética encontrada puede ser resultado de un intercambio de individuos entre los grupos de ballenas que visitan las costas de Esmeraldas y el resto del Hemisferio Sur. Esta podría ser una de las razones principales por las cuales se identificaron en la temporada 2013-2014 los haplotipos HBA023 y HBA075 correspondientes a la zona del Atlántico Sur y Océano Índico (Rosenbaum, et al., 2009). Al ser Esmeraldas una zona de reproducción, en donde las hembras visitan las costas con fines de crianza y reproducción, podría considerarse que es una zona clave para el intercambio de individuos. Una de las relaciones genéticas más notables se identificó entre Ecuador y el área de alimentación ubicado a lo largo de la costa oeste de la Península Antártica, con el registro de un número considerable de haplotipos compartidos entre estas áreas (De 5 a 14 haplotipos) (Tabla 5).

Otro aspecto a tomar en cuenta es que el número de individuos muestreados para los últimos años (2013 y 2014) fue menor. Sin embargo, la diversidad de haplotipos no disminuyó significativamente, pero sí la diversidad de nucleótidos. Para cada uno de estos años se identificó un total de 6 haplotipos, número que no es realmente bajo en relación al número de muestras, que fue de 25. De forma general la cantidad de muestras obtenidas en

esta fase no fue muy alta ya que el número de expediciones realizadas fue menor que el de fases anteriores.

## **8.2. Análisis de diferenciación genética global de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas (2010-2014) y comparación con la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes.**

Las ballenas del Estrecho de Magallanes, zona de alimentación del Pacífico Sudeste (Acevedo, et al., 2006), mostraron clara diferenciación genética con las ballenas de Esmeraldas ( $F_{ST}=0.31446$ ,  $p<0.00001$ ;  $\Phi_{st}=0.17689$ ,  $p <0.00001$ ) (Tabla 9).

Por otra parte, las ballenas de la costa de Esmeraldas y las de la Península Antártica, tienen un valor de diferenciación bastante bajo ( $F_{ST}=-0.00083$ ,  $p=0.68035$ ;  $\Phi_{st}=0.08833$ ,  $p <0.00001$ ). Por esto se puede sugerir una estrecha relación genética entre las poblaciones de Esmeraldas y aquellas que visitan la zona de alimentación de la Península Antártica.

Estudios previos han registrado diferencias significativas entre la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes ( $F_{ST}=-0.180$ ;  $\Phi_{st}=0.169$ ) (Olavarría, 2008), lo que quiere decir que los individuos que visitan la Península Antártica no muestran evidencia de un notable intercambio de individuos con las ballenas que visitan el Estrecho de Magallanes al sur de Chile. Siendo así, la conectividad estaría dándose principalmente entre las zonas de reproducción ubicadas en Ecuador, y la zona de alimentación a lo largo de la costa oeste de la Península Antártica (Félix, et al., 2007), coincidiendo con el hecho de que es con esta zona con la cual se ha registrado el mayor número de haplotipos compartidos (Tabla 5).

### **8.3. Análisis interanual por sexo de ballenas jorobadas para las temporadas 2010-2014 de la costa de Esmeraldas.**

Se realizó un análisis interanual por sexos de las ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010-2014. Para las hembras, el número de ballenas muestreadas fue bastante bajo (16) y de forma general no mostraron similitud entre las diferentes temporadas consideradas: 2010-2014 (Tabla 5). El índice de diferenciación más alto correspondió a los grupos de ejemplares muestreados entre el 2013 y 2014 (Tabla 5). Ante esto, se debe tener presente que las hembras presentan ciclos migratorios que dependen en gran parte de las condiciones reproductivas en las que se encuentren, ya que deben considerar el gasto energético de la migración (Brown, et al., 1995; Valsecchi, et al., 2010).

Para los individuos machos, se identificó valores bajos de diferenciación entre los diferentes años de estudio (Tabla 6). La comparación entre grupos de ballenas con la diferenciación genética más baja fue entre los individuos machos de Esmeraldas del 2011 y los machos de 2013 ( $F_{ST}=-0.06448$ ;  $\Phi_{st}=0.15576$ ). Sin embargo, todos los valores de diferenciación genética encontrados para las diferentes comparaciones fueron bajos. Esto se le puede atribuir al hecho de que los machos mantienen ciclos migratorios más frecuentes, además de que el tamaño de la muestra para machos fue mucho más alto que el de las hembras. Es posible que los individuos realicen sus ciclos con mayor rapidez ya que el gasto de energía no es la prioridad de estos ejemplares (Valsecchi, et al., 2010).

A pesar de los datos obtenidos, no se ha registrado evidencia clara de la influencia que puede tener el sexo de los individuos dentro del análisis para las ballenas jorobadas,

pues, en estudios anteriores tampoco se han mostrado diferencias significativas influenciadas por el sexo de los individuos (Acevedo, et al., 2006; Valsecchi, et al., 2010).

#### **8.4. Comparación de los grupos de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas (2010-2014) de los meses de Julio-Agosto y Septiembre, con la Península Antártica y Estrecho de Magallanes.**

Se conocen dos grupos de alimentación para el Pacífico Sudeste, la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes, esta última ubicándose más hacia el Norte. Teniendo en cuenta las distancias desde cada zona de alimentación hacia las costas ecuatorianas, se esperaría que los primeros individuos en llegar a las costas provengan del Estrecho de Magallanes. Estos corresponderían aproximadamente a los individuos del mes de Junio. Para los meses de Julio-Agosto ya se esperaría que los individuos que visitan las costas de Esmeraldas sean aquellos que parten desde la Península Antártica (Félix & Haase, 2001; Stevick, et al., 2004).

La mayoría de muestras (73 de 81) de ballenas jorobadas obtenidas en la costa de Esmeraldas en el periodo 2010-2014, corresponde a los meses de julio-agosto. Al comparar estos individuos con ballenas jorobadas de la Península Antártica, mediante análisis de AMOVA, se pudo identificar una mínima diferenciación, confirmando el hecho de que las ballenas que visitan la costa de Esmeraldas en estos meses muestran un ciclo migratorio que ubica como zona de alimentación a la Península Antártica. Así, en estudios previos, utilizando técnicas de foto-identificación se identificó una conectividad entre la zona de Ecuador y Colombia con la Península Antártica, como resultado del reavistamiento de ejemplares en estas zonas (Stevick, et al., 2004). Las ballenas de la costa de Esmeraldas,

muestreadas en el mes de septiembre (9 muestras) para las temporadas 2010-2014 también mostraron baja diferenciación ( $F_{ST}=0.0089$ ;  $\Phi_{st}=0.11545$ ) con las ballenas de la Península Antártica, contrario a lo esperado, que era mayor conectividad con el Estrecho de Magallanes. Se le puede atribuir esta inconsistencia en los datos debido al bajo número de muestras obtenidas para este mes.

La comparación establecida entre las muestras de ballenas de Esmeraldas, colectadas los meses de julio-agosto con el Estrecho de Magallanes mostró valores de diferenciación altos para la comparación haplotípica y la nucleotídica ( $F_{ST}=-0.21374$ ;  $\Phi_{st}=0.34693$ ) (Tabla 8). Al igual que las ballenas jorobadas muestreadas en el mes de septiembre comparadas con las ballenas del Estrecho de Magallanes ( $F_{ST}=0.17552$ ;  $\Phi_{st}=0.47102$ ). Los individuos identificados en septiembre corresponden en su mayoría a hembras, lo que tiene sentido ya que estas son las últimas en dejar las zonas de reproducción, además de que en este estudio, los datos muestran una mayoría de ballenas jorobadas hembras para este mes (Anexo 3). Entonces las hembras estarían siguiendo su ciclo migratorio entre la zona de alimentación de la Península Antártica y la zona de reproducción de Esmeraldas.

Es importante recordar que las madres que se encuentran realizando esta enseñanza de ciclos migratorios a sus crías (Brown, et al., 1995), tienen como prioridad que la energía sea necesaria para migrar de un lugar a otro, al contrario de los machos que mantienen ciclos con mucho más gasto de energía y son capaces de visitar más zonas, ya sean de reproducción o alimentación, cambiando sus patrones migratorios (Valsecchi, et al., 2010). Aspectos que podrían sugerir que los individuos obedecen a su patrón migratorio, el cual se

sabe, podría ser transmitido de madres a crías como experiencia adquirida en el primer año de vida (Baker, et al. 1990, 1994; Plasboll, et al. 1995).

## **9. CONCLUSIONES**

- Existe conectividad entre la zona de alimentación ubicada en la Península Antártica y la zona de reproducción de la costa de Esmeraldas, Ecuador; mientras la conectividad con la zona de alimentación del Estrecho de Magallanes ubicado en el territorio chileno y respaldada por análisis de AMOVA, es menor.
- La diversidad genética de ballenas jorobadas en Ecuador es alta en relación a las zonas de alimentación del Hemisferio Sur (Península Antártica y Estrecho de Magallanes), pero mantiene valores cercanos en relación a la diversidad haplotípica y nucleotídica del resto de zonas que son parte del Stock G.

## **10. RECOMENDACIONES**

Se recomienda que se continúen los estudios durante más temporadas de forma que los datos que se obtengan puedan ser estadísticamente válidos, incluyendo recolección de mayor número de muestras en todos los meses (Junio- Septiembre) en los que las ballenas jorobadas visitan las costas ecuatorianas. La recolección de mayor número de muestras

además, puede ayudar a realizar análisis que relacionen de mejor manera los ciclos migratorios con el sexo, pues es necesario contar con un número considerable de muestras de cada sexo de tal forma que puedan realizarse comparaciones lógicas.

Es importante la implementación de otras técnicas moleculares como microsatélites, que permitan conocer más a fondo el parentesco que puedan tener los individuos muestreados entre sí, para comprender de mejor manera los ciclos migratorios y aportar datos para análisis de fidelidad de sitio de los individuos.

Se recomienda la toma de muestras en otras zonas del Pacífico Sudeste cercanas a las zonas de alimentación (Península Antártica y Estrecho de Magallanes) y de reproducción (Stock G) ya conocidas, pues podría aportar a confirmar los datos que se pueda obtener a partir de los estudios ya realizados.

El análisis de fidelidad de sitio de los individuos es un tema complejo que requiere de una gran cantidad de datos, por lo que se recomienda que se realicen mayor cantidad de estudios que combinen la foto-identificación con análisis molecular y estadístico. De forma que puedan obtenerse mejores resultados.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Ávalos, G. (2014). Expertos del Senamhi anuncian que fenómeno del Niño ya está afectando. PPP Noticias. Página Web. Disponible en internet desde: <http://www.grida.no/publications/vg/lacsp/page/2792.aspx>. Consulta: 26/01/2015.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM et al. (1987) Intraspecific phylogeography – the mitochondrial-DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522.
- Baker C. S., Flórez-González, L., Abernethy, B., Rosenbaum, H. C., Slade, R.W., Capella, J., & Bannister, J. L. (1998). Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among humpback whales of the Southern Hemisphere. *Marine Mammal Science*, 14(4), 721-737.
- Baker, C. S., & Palumbi, S. R. (1994). Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science, New Series*, Vol. 265, No. 5178 (Sep. 9, 1994), pp. 1538-1539.

- 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., Bannisterc 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., 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.
- Boyd, I. 2002 Antarctic Marine Mammals. Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press, San Diego.
- Brown MR, Corkeron PJ, Hale PT, Schultz KW, Bryden MM (1995) Evidence for a sex segregated migration in the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences 259:229-234
- Calambokidis J, GH Steiger, JM Straley, LM Herman, S Cerchio, DR Salden, J Urbán, JK Jacobson, O vonZiegesar, KC Balcomb, CM Gabrielle, ME Dahlheim, S Uchida, G Ellis, Y Miyamura, P Ladrón de Guevara, M Yamaguchi, F Sato, SA Mizroch, L Schlender, K Rasmussen, J Barlow & TJ Quinn II. (2001). Movements and

population structure of humpback whales in the North Pacific. *Marine Mammal Science* 17: 769-794.

Calambokidis J, Steiger GH, Straley JM, Herman LM, Cerchio S, Salden DR, Urbán R. J, Jacobson JK, vonZiegesar O, Balcomb KC, Gabrielle CM, Dahlheim ME, Uchida S, Ellis G, Miyamura Y, Ladrón de Guevara P. P, Yamaguchi M, Sato F, Mizroch SA, Schlender L, Rasmussen K, Barlow J, Quinn II TJ (2001) Movements and population structure of humpback whales in the North Pacific. *Marine Mammal Science* 17:769-794

Chittleborough RG. 1958. The breeding cycle of the female humpback whale, *Megaptera nodosa* (Bonnetterre). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 6:3-29.

Chittleborough, R.G. 1965. Dynamics of two populations of humpback whales, *Megaptera novaeangliae* (Borowski). *Aust J. Mar. Freshw. Res.* 16:33-128.

Clapham, P. J. (1996).The social and reproductive biology of Humpback Whales: an ecological perspective. *Mammal Review*, 26, 27–49.

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. J. and Mayo, C. A. 1987. Reproduction and recruitment of individually identified humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, observed in Massachusetts Bay, 1979-1985. *Can. J. Zool.* 65: 2853-63.
- Clapham, P. J., L. S. Baraff, C. A. Carlson, M. A. Christian, D. K. Mattila, C. A. Mayo, M. A. Murphy And S. Pittman. 1993. Seasonal occurrence and annual return of humpback whales in the southern Gulf of Maine. *Canadian Journal of Zoology* 71:440-443.
- Clapham, P.J. & Mattila, D.K. (1988) Observations of migratory transits of two humpback whales. *Marine Mammal Science*, 4, 59-62.
- Clapham, P.J., Palsbøll, P.J., Mattila, D.K. and Vasquez, O. 1992. Composition and dynamics of humpback whale competitive groups in the West-Indies. *Behaviour* 122(Part 3-4):182-94.
- Clark CW, Clapham PJ (2004) Acoustic monitoring on a humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) feeding ground shows continual singing into late spring. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 271:1051-1057
- 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.
- Craig AS, Herman LM (1997) Sex differences in site fidelity and migration of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) to the Hawaiian Islands. *Can J Zool* 75:1923-1933.

- 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.
- Deméré, T. 2000. *Megaptera novaengliae*. Humpback Whale, ballena jorobada. Disponible en internet desde: <http://www.oceanoasis.org/fieldguide/mega-nov-sp.html>. 01/02/2015
- Donovan, G.P. 1991. A review of IWC stock boundaries. pp 39-68. In: A.R. Hoelzel (ed.) Rep. int. *Whal. Commn*, Vol. Report of the International Whaling Commission (Special Issue 13). International Whaling Commission, Cambridge.
- Elliott, W. & Simmonds, M. (2007). Whales in Hot Water? The Impact of a Changing Climate on Whales, Dolphins and Porpoises: A call for action. WWF-International, Gland Switzerland / WDCS, Chippenham, UK.
- 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. 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. (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., 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.
- 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.
- 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.
- Fondear, S. (2005). La importancia de las ballenas en el plancton de los mares. Noticias.
- Galtier N, Jobson RW, Nabholz B, Gle´min S, Blier P (2009). Mitochondrial whims: metabolic rate, longevity, and the rate of molecular evolution. *Biology Letters*, 5, 413–416.

- Gissi C, Iannelli F, Pesole G (2008) Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101, 301–320.
- González, L. (2002). Programa de acción para la conservación de especies: ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*). Universidad Nacional Autónoma de México. Coyoacán, México. 60 Pp.
- Hostería El Acantilado. (2011). Información, Hostería “El Acantilado”, Esmeraldas Ecuador. Página Web. Disponible en internet desde: <http://www.ecostravel.com/ecuador/hosterias/esmeraldas/hosteria-el-acantilado.php>. Consulta: 01/02/2015.
- 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., Shenřrin, W.8., 2002. A biopsy system for small cetaceans: darling success and wound healing in lursiops spp. *Marine Mammal Science* 18, 863-878.
- Leviathan, C. n.d. Ballena jorobada. Centre for Marine Mammals Research. Disponible en internet desde: [http://cmmrleviathan.org/mamiferos\\_cet\\_fam2\\_sp06.htm](http://cmmrleviathan.org/mamiferos_cet_fam2_sp06.htm).25/08/2014
- Mikhalev Y. 1997. Humpback whales, *Megaptera novaeangliae* in the Arabian Sea. *Marine Ecology Progress Series* 149:13-21.

- Moritz C, Dowlin TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 269–292.
- Olavarría, C. (2008). Population structure of Southern Hemisphere humpback whales. PhD Thesis. The University of Auckland. New Zealand.
- 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.
- Pairoa-Riofrío, C. (2003). Estudio Poblacional de Ballena Jorobada. Organización para la Conservación de Mamíferos Acuáticos en Sudamérica, Yaqu Pacha.
- 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 PJ, Clapham PJ, Mattila DK, Larsen F, Sears R, Siegismund HR, Sigurjonsson J, Vasquez O, Artander P (1995) Distribution of mtDNA haplotypes in North Atlantic humpback whales: the influence of behavior on population structure. *Marine Ecology Progress Series* 116:1-10

- 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.
- Parker, J. & Haswell, W. (1987). *Zoología. Cordados. Volumen 2*. Reverté. España.
- Pomilla C, Rosenbaum HC (2006) Estimates of relatedness in groups of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on 2 wintering grounds of the Southern Hemisphere. *Mol Ecol* 15:2541–2555.
- Rasmussen, K, et al. (2007). Southern Hemisphere humpback whales wintering off Central America: insights from water temperature into the longest mammalian migration. <http://rsbl.royalsocietypublishing.org/content/3/3/302.short>. 30/01/2015.
- Rice DW. 1998. Marine mammals of the world. Systematics and Distribution. Special Publication 4, 231 pp. *The Society for Marine Mammalogy*, Allen Press Inc., Lawrence, Kansas.
- Rojas, E. (2014). 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.
- 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.
- Scheidat, M., Castro C., Denkinger, 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.
- Slatkin, M. & Maddison, W. P. (1990) *Genetics* 126, 249-260.
- 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.
- 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.

- UNEP. (2003). Repercusiones climáticas del fenómeno El Niño en América Latina y el Caribe. GRIDA. Documento en línea. Disponible en internet desde: <http://www.grida.no/publications/vg/lacsp/page/2792.aspx>. Consulta: 26/01/2015.
- 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.

## 12. TABLAS

**Tabla 1.** Número de haplotipos, diversidad de haplotipos (H) y nucleótidos ( $\pi$ ) identificados en ballenas jorobadas de las temporadas 2010-2014 en las costas de Esmeraldas, Ecuador.

Stock	Temporada (Año)	Muestras	Número de Haplotipos	H $\pm$ SD	$\pi \pm$ SD
<b>G</b>	2010	20	12	0.921 $\pm$ 0.042	0.022 $\pm$ 0.012
<b>G</b>	2011	15	7	0.867 $\pm$ 0.064	0.016 $\pm$ 0.009
<b>G</b>	2012	21	16	0.957 $\pm$ 0.029	0.023 $\pm$ 0.001
<b>G</b>	2013	13	6	0.782 $\pm$ 0.105	0.016 $\pm$ 0.009
<b>G</b>	2014	12	6	0.864 $\pm$ 0.072	0.015 $\pm$ 0.009
<b>G</b>	2010-2014	81	27	0.927 $\pm$ 0.015	0.019 $\pm$ 0.010

H $\pm$ SD: Diversidad de Haplotipos.  $\pi \pm$  SD: Diversidad de nucleótidos.

Fuente: (Datos para las temporadas 2010-2012: Dalgo 2013; Rojas, 2014)

**Tabla 2.** Diversidad de haplotipos de las ballenas jorobadas en la Costa de Esmeraldas durante las temporadas 2010-2014. Se muestra la frecuencia y porcentaje de cada haplotipo (ADNmt) por sexo.

Haplotipos	Hembras												Machos												ND		Total	
	ago-10	jul-11	jul-12	ago-12	jul-13	ago-13	sep-13	jul-14	ago-14	sep-14	2010 al 2014	%	ago-10	jul-11	jul-12	ago-12	jul-13	ago-13	sep-13	jul-14	ago-14	sep-14	2010 al 2014	%	N	%		
SP1		1									1	5.26		1		1	1						3	4.84		4	4.88	
SP6											0	0			1								1	1.61		1	1.22	
SP8											0	0	1										1	1.61		1	1.22	
SP10											0	0	2										2	3.23		2	2.44	
SP12										1	1	5.26						1			1		2	3.23		3	3.66	
SP14				1							1	5.26		2									2	3.23		3	3.66	
SP25		1									1	5.26	1										1	1.61		2	2.44	
SP32			2								2	10.5	2	2				1				1	6	9.68	1	9	11	
SP33											0	0				1							1	1.61		1	1.22	
SP43											0	0				1							1	1.61		1	1.22	
SP50	1										1	5.26			1								1	1.61		2	2.44	
SP52											0	0	1		1								2	3.23		2	2.44	
SP60			1								1	5.26											0	0		1	1.22	
SP61											0	0						1					1	1.61		1	1.22	
SP62										1	1	5.26	5		1						1		7	11.3		8	9.76	
SP63											0	0			1	1							2	3.23		2	2.44	
SP66				1							1	5.26											0	0		1	1.22	
SP68	1		1								2	10.5											0	0		2	2.44	
SP72											0	0										2	2	3.23		2	2.44	
SP73											0	0	3									2	5	8.06		5	6.1	
SP89											0	0	1										1	1.61		1	1.22	
SP90			1				3				4	21.1	1	5	3		1		2				12	19.4		16	19.5	
SP98			1								1	5.26		2									2	3.23		3	3.66	
SP100											0	0				1							1	1.61		1	1.22	
Mno03MA02											0	0	1										1	1.61		1	1.22	
Nuevo033											0	0		1									1	1.61		1	1.22	
HBA023							2				2	10.5											0	0		2	2.44	
HBA075											0	0									4		4	6.45		4	4.88	
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>19</b>	<b>100</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>62</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>82</b>	<b>100</b>	

ND: No determinado. N: Total de individuos (machos y hembras). Fuente: (Datos para los años 2010-2012 obtenidos a partir de: Dalgo, 2013; Rojas, 2014).

**Tabla 3.** Diversidad de haplotipos y nucleótidos de varias zonas del Hemisferio Sur.

<b>Hemisferio Sur</b>				
<i>Stock</i>	<b>Región</b>	<b>Ha</b>	<i>h (SD)</i>	$\pi$ (SD)
<b>A</b>	Brazil	61	0.972 (0.004)	0.025 (0.013)
<b>B</b>	Gabon	100	0.979 (0.002)	0.021 (0.011)
<b>C</b>	Madagascar	93	0.978 (0.002)	0.021 (0.010)
<b>D</b>	Noroeste de Australia	53	0.970 (0.004)	0.020 (0.014)
<b>E</b>	Nueva Caledonia	61	0.974 (0.003)	0.021 (0.018)
<b>E</b>	Tonga	48	0.962 (0.004)	0.020 (0.012)
<b>F</b>	Islas Cook	23	0.923 (0.010)	0.019 (0.010)
<b>F</b>	Polinesia Francesa	21	0.913 (0.012)	0.019 (0.010)
<b>G</b>	Colombia	27	0.900 (0.016)	0.019 (0.001)
<b>G</b>	Santa Elena	29	0.922 (0.012)	0.019 (0.009)
<i>Áreas de alimentación</i>				
<b>Área I</b>	Península Antártica	34	0.913 (0.016)	0.019 (0.001)
<b>Área II</b>	Península Antártica	31	0.916 (0.029)	0.025 (0.013)
<b>Estrecho de Magallanes</b>	Chile	4	0.339 (0.080)	0.010 (0.053)

Ha: Número de de haplotipos. *h*: Diversidad de haplotipos.  $\pi$ : Diversidad nucleotídica.

Fuente: (Olavarría, 2008; Rosenbaum, et al., 2009)

**Tabla 4.** Comparación interanual de diferenciación genética para las poblaciones de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010-2014.

Comparación interanual de haplotipos para las temporadas 2010-2014						
Temporadas	Esmeraldas 2010	Esmeraldas 2011	Esmeraldas 2012	Esmeraldas 2013	Esmeraldas 2014	Valores estadísticos
Esmeraldas 2010		0.08831	0.00320	0.0705	0.03905	<b>Fst</b>
		0.02321±0.0021	0.36104±0.0069	0.00196	0.02933	<b>valor p</b>
		0.08831	0.00320	0.14453	0.10596	<b>Φst</b>
		0.02083	0.33948	<0.00001	<0.00001	<b>valor p</b>
Esmeraldas 2011	0.08831		0.01943	-0.02846	0.08597	<b>Fst</b>
	0.02321±0.0021		0.19857±.0046	0.89443	0.00098	<b>valor p</b>
	0.08831		0.01943	0.1747	0.1348	<b>Φst</b>
	0.02083		0.19425	<0.00001	<0.00001	<b>valor p</b>
Esmeraldas 2012	0.00320	0.01943		0.00033	0.05599	<b>Fst</b>
	0.36104±0.0069	0.19857±.0046		0.43988	0.00293	<b>valor p</b>
	0.00320	0.01943		0.12516	0.0869	<b>Φst</b>
	0.33948	0.19425		<0.00001	<0.00001	<b>valor p</b>
Esmeraldas 2013	0.0705	-0.02846	0.00033		0.13394	<b>Fst</b>
	0.00196	0.89443	0.43988		<0.00001	<b>valor p</b>
	0.14453	0.1747	0.12516		0.1777	<b>Φst</b>
	<0.00001	<0.00001	<0.00001		<0.00001	<b>valor p</b>
Esmeraldas 2014	0.03905	0.08597	0.05599	0.13394		<b>Fst</b>
	0.02933	0.00098	0.00293	<0.00001		<b>valor p</b>
	0.10596	0.1348	0.0869	0.1777		<b>Φst</b>
	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001		<b>valor p</b>

FST: Diferenciación genética de haplotipos, entre dos grupos de ballenas. Φst: Diferenciación genética de nucleótidos, entre dos grupos de ballenas. Los cuadros en negro representan las relaciones que no se pueden establecer (Corresponden a la misma temporada).

Fuente: (Datos para los años 2010-2012 obtenidos a partir de: Dalgo, 2013; Rojas, 2014)

**Tabla 5.** Haplotipos compartidos entre las poblaciones de Esmeraldas (2010-2014) y otras áreas de Pacífico Sudeste.

Se incluye la comparación interanual entre las diferentes temporadas de las ballenas de la costa de Esmeraldas. M: Muestra(s).

Haplotipos Compartidos: Esmeraldas (2010-2014) Vs. Pacífico Sudeste									
Temporadas	Same, Ecuador 2014 (12M)	Same, Ecuador 2013 (13M)	Same, Ecuador 2012 (16M)	Same, Ecuador 2010 (12M)	Same, Ecuador 2011 (7M)	Santa Elena, Ecuador (29M)	Colombia (27M)	Península Antártica (34M)	Estrecho de Magallanes (4M)
Same, Ecuador 2014 (12M)		2 (SP12, SP32)	2 (SP32, SP62)	3 (SP32, SP62, SP73)	1 (SP32)	4 (SP32, SP62, SP72, SP73)	5 (SP12, SP32, SP62, SP72, SP73)	5 (SP12, SP32, SP62, SP72, SP73)	0
Same, Ecuador 2013 (13M)	2 (SP12, SP32)		3 (SP1, SP32, SP90)	2 (SP32, SP90)	3 (SP1, SP32, SP90)	4 (SP1, SP32, SP61, SP90)	5 (SP1, SP12, SP32, SP61, SP90)	5 (SP1, SP12, SP32, SP61, SP90)	1 (SP90)
Same, Ecuador 2012 (16M)	2 (SP32, SP62)	3 (SP1, SP32, SP90)		6 (SP1, SP32, SP52, SP62, SP68, SP90)	5 (SP1, SP14, SP32, SP90, SP98)	12 (SP1, SP14, SP32, SP33, SP50, SP52, SP60, SP62, SP68, SP90, SP98, SP100)	14 (SP1, SP14, SP32, SP33, SP43, SP50, SP52, SP60, SP62, SP63, SP66, SP68, SP90, SP98)	15 (SP1, SP14, SP32, SP33, SP43, SP50, SP52, SP60, SP62, SP63, SP66, SP68, SP90, SP98, SP100)	2 (SP90, SP98)
Same, Ecuador 2010 (12M)	3 (SP32, SP62, SP73)	2 (SP32, SP90)	6 (SP1, SP32, SP52, SP62, SP68, SP90)		3 (SP25, SP32, SP90)	9 (SP10, SP25, SP32, SP50, SP52, SP62, SP68, SP73, SP90)	10 (SP8, SP10, SP25, SP32, SP50, SP52, SP62, SP68, SP73, SP90)	9 (SP8, SP10, SP32, SP50, SP52, SP62, SP68, SP73, SP90)	2 (SP8, SP90)
Same, Ecuador 2011 (7M)	1 (SP32)	3 (SP1, SP32, SP90)	5 (SP1, SP14, SP32, SP90, SP98)	3 (SP25, SP32, SP90)		6 (SP1, SP14, SP25)	6 (SP1, SP14, SP25, SP32, SP90, SP98)	5 (SP1, SP14, SP32, SP90, SP98)	2 (SP90, SP98)

M: Muestras. Se indica el número de haplotipos compartidos entre cada zona o temporada y en paréntesis los haplotipos que están compartiendo. Los cuadros en negro representan las relaciones que no se pueden establecer (Corresponden a la misma temporada).

Fuente: (Datos de Esmeraldas para los años 2010-2012 obtenidos a partir de: Dalgo, 2013; Olavarría, 2008; Rojas, 2014. Datos para Santa Elena, Colombia, Península Antártica y Estrecho de Magallanes, obtenidos a partir de: Olavarría, 2008).

**Tabla 6.** Comparación interanual de ballenas jorobadas hembras de la costa de Esmeraldas, Ecuador, para las temporadas 2010-2014.

Comparación Interanual-Hembras						
Temporadas	Esmeraldas 2010	Esmeraldas 2011	Esmeraldas 2012	Esmeraldas 2013	Esmeraldas 2014	Valores estadísticos
Esmeraldas 2010		0.00001	-0.00021	0.14066	0.14286	Fst
		1	0.4868	0.10753	0.39101	valor p
		0.00001	0.02554	0.28751	0	Φst
		1	0.65298±0.01369	0.08700±0.00779	1	valor p
Esmeraldas 2011	0		-0.18003	-0.12323	-0.11111	Fst
	1		0.97654	0.82698	0.74389	valor p
	0		0.02554	0.28571	0	Φst
	1		0.64223±0.01101	0.10850±0.01040	1	valor p
Esmeraldas 2012	-0.00021	-0.18003		-0.0261	0.07052	Fst
	0.4868	0.97654		0.66178	0.33138	valor p
	0.02554	0.02554		0.19613	0.03571	Φst
	0.65298±0.01369	0.64223±0.01101		0.00098±0.00098	0.77615±0.01190	valor p
Esmeraldas 2013	0.14066	-0.12323	-0.0261		0.22	Fst
	0.10753	0.82698	0.66178		0.06354	valor p
	0.28751	0.28571	0.19613		0.4	Φst
	0.08700±0.00779	0.10850±0.01040	0.00098±0.00098		0.17595±0.01260	valor p
Esmeraldas 2014	0.14286	-0.11111	0.07052	0.22		Fst
	0.39101	0.74389	0.33138	0.06354		valor p
	0	0	0.03571	0.4		Φst
	1	1	0.77615±0.01190	0.17595±0.01260		valor p

FST: Diferenciación genética de haplotipos, entre dos grupos de ballenas. Φst: Diferenciación genética de nucleótidos, entre dos grupos de ballenas. Los cuadros en negro representan las relaciones que no se pueden establecer (Corresponden a la misma temporada).

Fuente: (Datos para los años 2010-2012, obtenidos a partir de: Dalgo, 2013; Rojas, 2014).

**Tabla 7.** Comparación interanual de ballenas jorobadas machos, de la costa de Esmeraldas, Ecuador, para las temporadas 2010-2014.

Comparación Interanual-Machos						
Temporadas	Esmeraldas 2010	Esmeraldas 2011	Esmeraldas 2012	Esmeraldas 2013	Esmeraldas 2014	Valores estadísticos
Esmeraldas 2010		0.07473	0.00416	0.03826	0.04631	<b>Fst</b>
		<0.00001	0.36559	0.08211	0.02053	<b>valor p</b>
		0.13092	0.07167	0.11792	0.12024	<b>Φst</b>
		<0.00001	0.00196±0.00136	0.00098±0.00098	<0.00001	<b>valor p</b>
Esmeraldas 2011	0.07473		0.011	-0.06448	0.08067	<b>Fst</b>
	<0.00001		0.25709	0.9912	0.00391	<b>valor p</b>
	0.13092		0.10474	0.15576	0.15634	<b>Φst</b>
	<0.00001		<0.00001	<0.00001	<0.00001	<b>valor p</b>
Esmeraldas 2012	0.00416	0.011		-0.02248	0.05074	<b>Fst</b>
	0.36559	0.25709		0.80938	0.02248	<b>valor p</b>
	0.07167	0.10474		0.08955	0.09315	<b>Φst</b>
	0.00196±0.00136	<0.00001		0.00293±0.00164	0.00098±0.00098	<b>valor p</b>
Esmeraldas 2013	0.03826	-0.06448	-0.02248		0.09071	<b>Fst</b>
	0.08211	0.9912	0.80938		0.00782	<b>valor p</b>
	0.11792	0.15576	0.08955		0.14423	<b>Φst</b>
	0.00098±0.00098	<0.00001	0.00293±0.00164		0.00098±0.00098	<b>valor p</b>
Esmeraldas 2014	0.04631	0.08067	0.05074	0.09071		<b>Fst</b>
	0.02053	0.00391	0.02248	0.00782		<b>valor p</b>
	0.12024	0.15634	0.09315	0.14423		<b>Φst</b>
	<0.00001	<0.00001	0.00098±0.00098	0.00098±0.00098		<b>valor p</b>

FST: Diferenciación genética de haplotipos, entre dos grupos de ballenas. Φst: Diferenciación genética de nucleótidos, entre dos grupos de ballenas. Los cuadros en negro representan las relaciones que no se pueden establecer (Corresponden a la misma temporada).

Fuente: (Datos obtenidos para los años 2010-2012, obtenidos a partir de: Dalgo, 2013; Rojas, 2014).

**Tabla 8.** Comparación mensual (Julio y Agosto, Septiembre) de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas (2010-2014) con la Península Antártica y el Estrecho de Magallanes respectivamente.

Zonas del Hemisferio Sur		Península Antártica	Estrecho de Magallanes	Valores Estadísticos
Esmeraldas (2010-2014)	Julio y Agosto	0.0007	0.21374	<b>FST</b>
		< 0.00001	< 0.00001	<b>p-value</b>
		0.07668	0.34693	<b>Φst</b>
		< 0.00001	< 0.00001	<b>p-value</b>
	Septiembre	0.00899	0.17552	<b>FST</b>
		0.11535	< 0.00001	<b>p-value</b>
		0.11545	0.47102	<b>Φst</b>
		< 0.00001	< 0.00001	<b>p-value</b>

FST: Diferenciación genética de haplotipos, entre dos grupos de ballenas. Φst: Diferenciación genética de nucleótidos, entre dos grupos de ballenas.

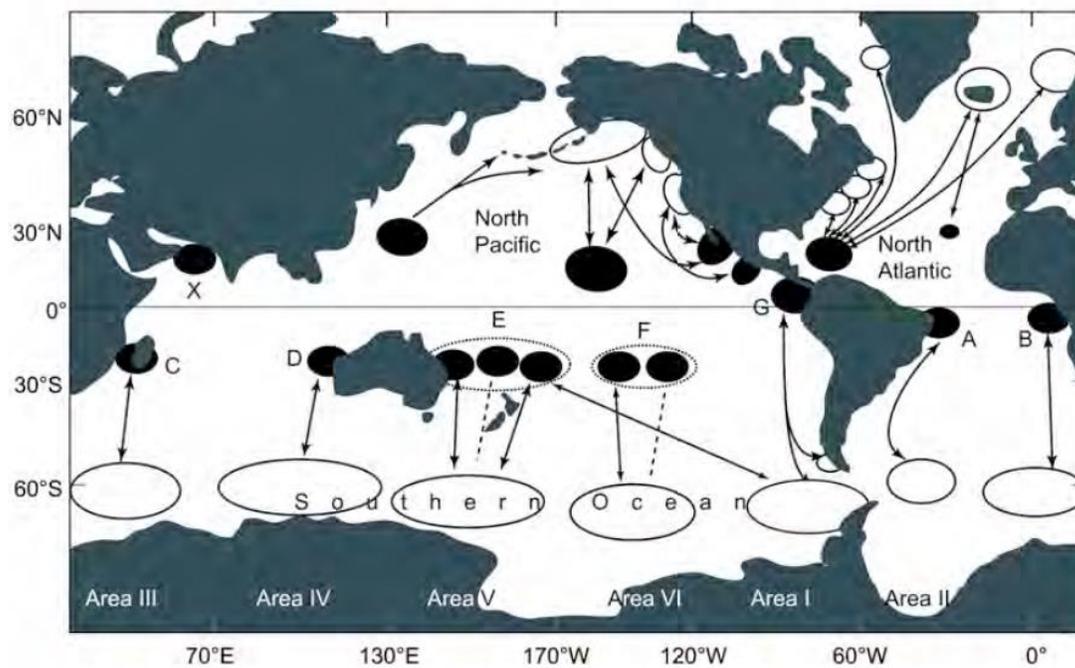
Fuente: (Datos para los años 2010-2012, obtenidos a partir de: Dalgo, 2013; Rojas, 2014).

**Tabla 9.** Diferenciación entre grupos de ballenas jorobadas de Esmeraldas y Colombia vs. Península Antártica y Estrecho de Magallanes.

Zonas de Reproducción y Alimentación		Península Antártica	Estrecho de Magallanes
Ecuador (2010-2014) y Colombia	Fst valor p	-0.00083 0.68035	0.31446 <0.00001
	$\Phi$ st valor p	0.08833 <0.00001	0.17689 <0.00001

FST: Diferenciación genética de haplotipos, entre dos grupos de ballenas.  
 $\Phi$ st: Diferenciación genética de nucleótidos, entre dos grupos de ballenas.  
 Fuente: (Datos de Esmeraldas para los años 2010-2012, obtenidos a partir de: Dalgo, 2013; Rojas, 2014. Datos de Colombia, Península Antártica y Estrecho de Magallanes, obtenidos a partir de: Olavarría, 2008).

## 13. FIGURAS



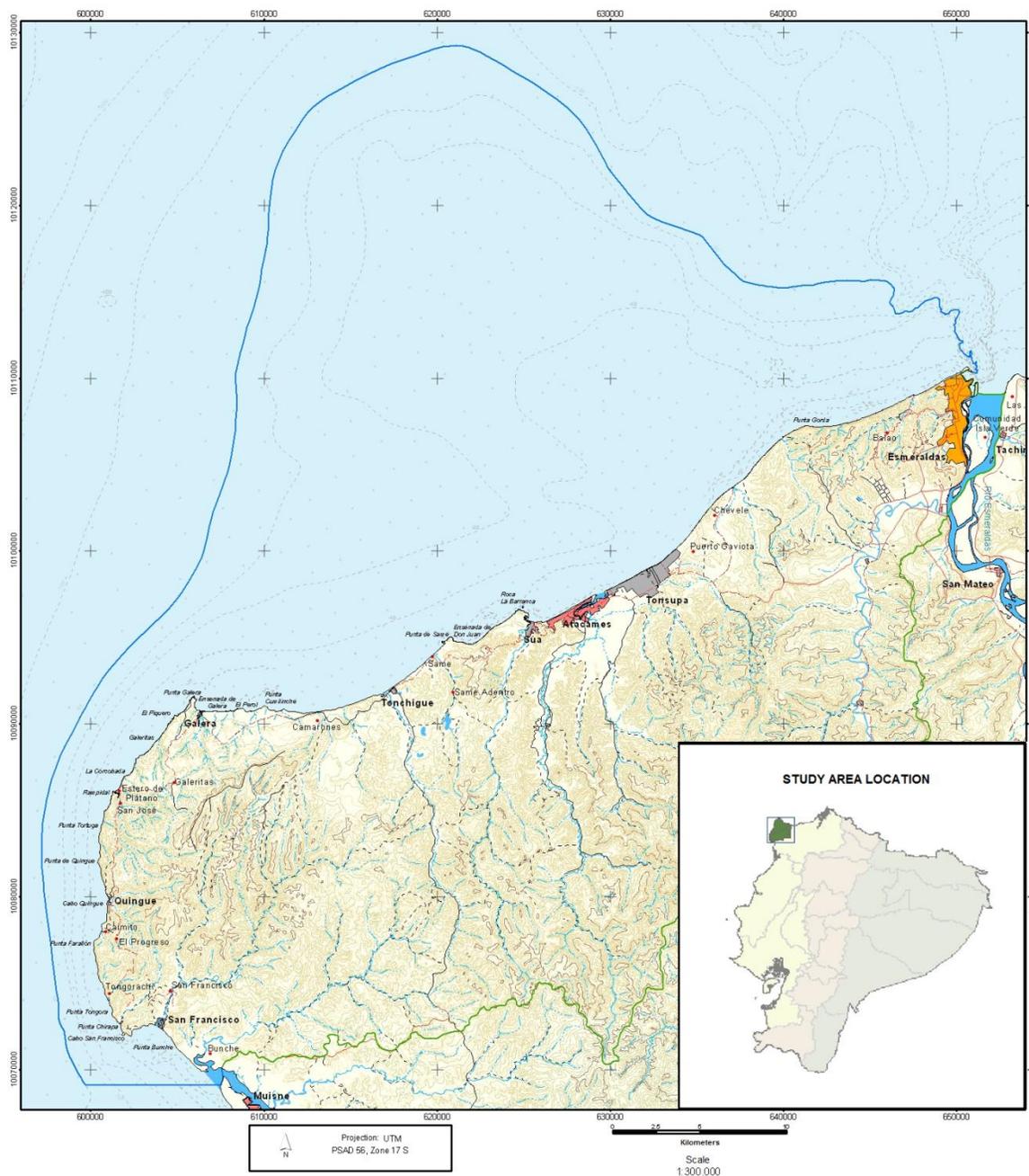
(Olavarría, 2008)

**Figura 1.** Zonas de alimentación y de reproducción de ballenas jorobadas (*M. novaeangliae*) a nivel mundial.



(Hostería El Acantilado, 2011)

**Figura 2.** Área de Estudio de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010-2014 (Playa de Same).



(Denkinger, et al., 2006)

**Figura 3.** Límites geográficos del área de estudio de ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas, para las temporadas 2010-2014.

## 14. ANEXOS

**Anexo 1.** Datos de las muestras de ballenas jorobadas recolectadas en la costa de Esmeraldas en la temporada 2010 y 2011.

Area	Sample #	Location		Collection date	Haplotype	Sex
		UTMN	UTME			
Same-Ecu	1	631313	120753	12/08/2010	SP89	M
Same-Ecu	2	611727	105596	14/08/2010	SP90	M
Same-Ecu	3	610589	109582	12/08/2010	SP8	M
Same-Ecu	4	622697	113794	13/08/2010	SP25	M
Same-Ecu	5	622697	113794	13/08/2010	SP68	F
Same-Ecu	6	631313	120753	12/08/2010	SP32	M
Same-Ecu	7	610589	109582	12/08/2010	SP62	M
Same-Ecu	8	627678	109262	13/08/2010	SP62	M
Same-Ecu	9	610589	109582	12/08/2010	SP10	M
Same-Ecu	10	617162	119409	12/08/2010	SP32	M
Same-Ecu	11	611727	105596	14/08/2010	Mno03Ma02	M
Same-Ecu	12	619801	113242	13/08/2010	SP73	M
Same-Ecu	13	626116	112144	14/08/2010	SP73	M
Same-Ecu	14	617162	119409	12/08/2010	SP62	M
Same-Ecu	15	631313	120753	12/08/2010	SP52	M
Same-Ecu	16	627140	113206	13/08/2010	SP50	F
Same-Ecu	17	630780	113893	13/08/2010	SP10	M
Same-Ecu	18	630780	113893	13/08/2010	SP62	M
Same-Ecu	19	630427	111875	13/08/2010	SP62	M
Same-Ecu	20	627140	113206	13/08/2010	SP73	M
Same-Ecu	21	0058546	08000599	06/07/2011	SP98	M
Same-Ecu	22	0059332	08000275	07/07/2011	SP32	M
Same-Ecu	23	0059874	08000004	07/07/2011	SP90	M
Same-Ecu	24	0059874	08000004	07/07/2011	SP90	M
Same-Ecu	25	0058394	08001008	07/07/2011	SP1	F
Same-Ecu	26	0100854	07953622	09/07/2011	SP90	M
Same-Ecu	27	0100854	07953622	09/07/2011	SP90	M
Same-Ecu	28	0101472	07954715	09/07/2011	SP32	M
Same-Ecu	29	0101981	07952914	09/07/2011	SP1	M
Same-Ecu	30	0101297	07951561	09/07/2011	SP14	M
Same-Ecu	31	0101297	07951561	09/07/2011	SP14	M
Same-Ecu	32	0056358	08001358	10/07/2011	SP98	M
Same-Ecu	33	0057125	08001918	10/07/2011	NUEVO	M
Same-Ecu	34	0057877	08000283	10/07/2011	SP90	M
Same-Ecu	35	0057877	08000283	10/07/2011	SP25	F

(Dalgo, 2013)

**Anexo 2.** Datos de las muestras de ballenas jorobadas recolectadas en la costa de Esmeraldas en la temporada 2012.

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

ND: No determinado.

(Rojas, 2014)

**Anexo 3.** Datos de las muestras de ballenas jorobadas recolectadas en la costa de Esmeraldas en la temporada 2013 y 2014.

Área	No. Muestra	Localización		Fecha de recolección	Haplotipo	Sexo
		UTMN	UTME			
Same-Ecu	62	98479	7994779	11/07/2013	SP32	M
Same-Ecu	63	1.02	7980593	13/07/2013	SP90	M
Same-Ecu	64	91100	8003623	19/07/2013	SP1	M
Same-Ecu	65	5030	795551	14/08/2013	SP61	M
Same-Ecu	66	5030	795552	14/08/2013	SP32	M
Same-Ecu	67	9788	7994166	16/08/2013	SP12	M
Same-Ecu	68	591980	7958315	17/08/2013	SP90	M
Same-Ecu	69	101159	7949137	18/08/2013	SP90	M
Same-Ecu	70	100202	7953022	19/08/2013	SP90	H
Same-Ecu	71	101232	7951373	19/08/2013	SP90	H
Same-Ecu	72	591980	7958315	17/09/2013	HBA023	H
Same-Ecu	73	591980	7958315	17/09/2013	SP90	H
Same-Ecu	74	591980	7958315	17/09/2013	HBA023	H
Same-Ecu	75	591980	7958315	17/08/2014	HBA075	M
Same-Ecu	76	591980	7958315	17/08/2014	HBA075	M
Same-Ecu	77	591980	7958315	17/08/2014	HBA075	M
Same-Ecu	78	591980	7958315	17/08/2014	HBA075	M
Same-Ecu	79	591980	7958315	17/08/2014	SP12	M
Same-Ecu	80	591980	7958315	17/08/2014	SP62	M
Same-Ecu	81	591980	7958315	23/09/2014	SP32	M
Same-Ecu	82	59311	56113	23/09/2014	SP62	H
Same-Ecu	83	100662	795294	23/09/2014	SP73	M
Same-Ecu	84	102457	7949463	24/09/2014	SP72	M
Same-Ecu	85	102457	7949463	24/09/2014	SP73	M
Same-Ecu	86	102457	7949463	24/09/2014	SP72	M

H: Hembra, M: Macho.