

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Análisis de la Fidelidad de Sitio de Ballenas Jorobadas
(*Megaptera novaeangliae*) en la costa de Esmeraldas, Ecuador**

Patricia Gabriela Chanabá López

Biología con concentración en Ecología Marina

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de Bióloga

Quito, 10 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Análisis de la Fidelidad de Sitio de Ballenas Jorobadas
(*Megaptera novaeangliae*) en la costa de Esmeraldas, Ecuador**

Patricia Gabriela Chanabá López

Nombre del profesor, Título académico

Elisa Bonaccorso, Ph.D.

Nombre del profesor, Título académico

Judith Denking, Ph.D.

Quito, 10 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Patricia Gabriela Chanabá López

Código: 00137344

Cédula de identidad: 1721894077

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

A los latidos de corazón que retumban desde el cielo.

RESUMEN

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) realiza migraciones anuales entre las zonas de alimentación (Ártica y Antártica) y las zonas de reproducción (aguas tropicales). Sin embargo, existen variaciones de acuerdo al sexo, lo cual está asociado a la fidelidad de sitio o filopatría. Una zona de reproducción importante para el stock “G”, una de las siete poblaciones de ballenas jorobadas reconocidas por la International Whaling Commission en el hemisferio sur, es la costa de Esmeraldas de Ecuador. El objetivo del presente estudio fue determinar la fidelidad de sitio de las ballenas jorobadas a la costa de Esmeraldas, mediante la comparación de la composición genética de los grupos migratorios de los años 2015 y 2018. Para esto, se tomaron 46 muestras de piel en ambos años, se extrajo el ADN, se identificó el sexo con técnicas moleculares y se realizó el genotipado de cada individuo utilizando seis microsatélites a través de PCR y secuenciación Sanger. Los resultados mostraron que la composición genética de los grupos de hembras no fue significativamente diferente, es decir que las hembras del 2015 y del 2018 probablemente provienen de la misma fuente genética, sugiriendo así una alta fidelidad de sitio. Resultados contrarios se obtuvieron en el caso de los machos, lo que se asoció a una baja fidelidad de sitio. Estos resultados sugieren que las ballenas jorobadas hembras del stock “G” tienden a volver al mismo sitio de reproducción cada año, mientras que los machos tienden a moverse más a lo largo de sus rutas migratorias y a cambiar de zonas de reproducción con mayor frecuencia. A pesar de que esto concuerda con patrones registrados previamente, varias de las diferencias genéticas observadas podrían deberse a los distintos tamaños muestrales, por lo que se recomienda un mayor esfuerzo de muestreo en investigaciones futuras, para comprobar este patrón. El presente estudio permitió entender las diferencias de fidelidad de sitio de machos y hembras de *M. novaeangliae* a la zona de reproducción de la costa de Esmeraldas de Ecuador, información que contribuye a entender de mejor manera la forma en que las ballenas jorobadas se desplazan a lo largo del Pacífico Este.

Palabras clave: grupo migratorio, stock, fidelidad de sitio, zonas de reproducción, composición genética.

ABSTRACT

Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) undertake annual migrations between feeding grounds (Arctic and Antarctic) and breeding grounds (tropical waters). However, there are variations according to sex, which is associated with site fidelity or philopatry. An important breeding ground for stock “G”, one of the seven humpback whale populations recognized by the International Whaling Commission in the southern hemisphere, is the Esmeraldas coast of Ecuador. The present study aimed to determine site fidelity of humpback whales to the Esmeraldas coast, by comparing the genetic composition of 2015 and 2018 migratory groups. In order to accomplish this, 46 skin samples were collected in both years, DNA was extracted, sex was identified with molecular techniques, and each individual was genotyped using six microsatellites via PCR and Sanger sequencing. Results showed that genetic composition of female groups was not significantly different, meaning that 2015 and 2018 females probably come from the same genetic source, thus suggesting high site fidelity. Contrary results were obtained in the case of males, which was associated with low site fidelity. These results suggest that female humpback whales in stock “G” tend to return to the same breeding ground each year, while males tend to move more along different migratory routes and change breeding grounds more frequently. Although this agrees with previously recorded patterns, several of the observed genetic differences could be due to the different sample sizes, so a greater sampling effort is recommended in future researches to verify this pattern. The present study helped us to understand the differences in site fidelity of males and females of *M. novaeangliae* to the breeding ground off Esmeraldas, Ecuador. This information helps to better understand humpback whale migrations and habitat use in the Eastern Pacific.

Key words: migratory group, stock, site fidelity, breeding ground, genetic composition.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
METODOLOGÍA	18
Área de estudio	18
Recolección de muestras y extracción de ADN	19
Determinación del sexo	20
Genotipado de microsátélites	20
Análisis poblacionales	21
RESULTADOS	22
Análisis general	22
Análisis por sexo	23
DISCUSIÓN	25
Proporción de machos y hembras	26
Análisis genéticos	27
Efectividad de métodos moleculares	30
Limitaciones	31
CONCLUSIONES	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXO A: DISTRIBUCIÓN DE LOS STOCKS REPRODUCTIVOS DE BALLENAS JOROBADAS EN EL HEMISFERIO SUR	44
ANEXO B: FRAGMENTOS OBTENIDOS TRAS LA DIGESTIÓN CON LA ENZIMA TAQ 1 EN LA DETERMINACIÓN DEL SEXO DE BALLENAS JOROBADAS	45
ANEXO C: SECUENCIAS DE CADA MICROSATÉLITE UTILIZADO CON SUS RESPECTIVOS FLUORÓFOROS	46
ANEXO D: PROTOCOLOS DE PCR DESARROLLADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES	47
ANEXO E: PERFILES DE TERMOCICLADOR DESARROLLADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados del análisis AMOVA para los grupos de estudio.....	25
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio. Bajos de Atacames y Reserva Marina Galera San Francisco (RMGSF), provincia de Esmeraldas	18
Figura 2. Puntos GPS de las muestras tomadas en 2015 y 2018.....	19
Figura 3. Análisis de PCA para la población total.....	23
Figura 4. Análisis de PCA para los grupos de hembras de 2015 y 2018	24
Figura 5. Análisis de PCA para los grupos de machos de 2015 y 2018.....	25

INTRODUCCIÓN

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) es una especie cosmopolita, cuyas poblaciones se encuentran en todos los océanos del mundo (Zerbini et al., 2004). Estas realizan migraciones latitudinales anuales entre las zonas de alimentación y las zonas de reproducción (Cypriano-Souza et al., 2010), y sus desplazamientos dependen del hemisferio en el que residen. Las poblaciones del hemisferio norte se dirigen hacia las zonas de alimentación en el Ártica durante el verano boreal, aproximadamente entre los meses de junio y noviembre, y hacia las zonas de reproducción en aguas de latitudes bajas durante el invierno boreal, entre los meses de diciembre y abril (Baker et al., 1986; Townsend, 1935). Las poblaciones del hemisferio sur se dirigen hacia las zonas de alimentación en la Antártida durante el verano austral, aproximadamente entre los meses de diciembre y marzo, y hacia las zonas de reproducción en aguas de latitudes bajas durante el invierno austral, entre los meses de junio y octubre (Mackintosh, 1942; Townsend, 1935).

Las zonas de alimentación son aquellas áreas situadas en aguas de latitudes altas (el Ártica o el Antártica) que se caracterizan por ser de temperatura fría y alta productividad marina, por lo que son sitios convenientes para la alimentación de adultos y crías (Vu et al., 2012). Por otro lado, las zonas de reproducción son aquellas áreas ubicadas en aguas de latitudes bajas (entre el trópico de Cáncer y el trópico de Capricornio), cuya mayor temperatura y estructura del ambiente oceánico hace que sean lugares óptimos para aparearse y dar a luz (Cartwright et al., 2012). Las ballenas jorobadas se aparean en estas zonas en las épocas de reproducción, y posteriormente (más o menos después de un año, que es el tiempo aproximado de gestación) regresan a las mismas zonas a dar luz (Mikhalev, 1997). La preferencia por estas áreas parece estar relacionada con la idoneidad del ambiente para que las crías desarrollen sus capacidades

termorreguladoras y ofrecen sitios para su protección contra depredadores (Medrano-González et al., 2001). Las migraciones entre las zonas de alimentación y las zonas de reproducción se dan a través de largas distancias, habiendo registros de rutas cubiertas de más de 8000 km (Rasmussen et al., 2007).

A pesar de que se observan estos patrones generales de migración, existen variaciones de acuerdo al sexo, lo cual está asociado con los diferentes grados de fidelidad de sitio, o filopatría, hacia las zonas donde las ballenas jorobadas se alimentan y se reproducen (Craig y Herman, 1997). Se han demostrado altas tasas de retorno a las áreas de alimentación, debido a que las ballenas jorobadas se agrupan en líneas matriarcales (Craig y Herman, 1997). Las madres enseñan las rutas migratorias a sus crías durante su primer año de vida, asegurándose que las crías puedan regresar a las áreas de alimentación por sí solas, lo cual aumenta la fidelidad de sitio de madres y crías a dichas zonas (Baker et al., 1987). Sin embargo, las tasas de retorno a las áreas de reproducción son menos marcadas y varían entre machos y hembras (Craig y Herman, 1997). Los machos tienden a dispersarse más entre diferentes stocks durante la época de reproducción, debido a que buscan hembras para aparearse (Clapham, 1996). En las zonas de alimentación, donde existe una menor dispersión de los machos, aumenta la fidelidad de sitio (Anderson et al., 2010; Wedekin et al., 2010; Ree et al., 2013). Las hembras, en cambio, suelen dispersarse menos, lo que puede explicarse, entre otros factores, por el parto, el cual podría ocurrir a lo largo de la ruta migratoria hacia las áreas de reproducción (Herman et al., 2011). Por ello, al momento de la reproducción, las hembras deben asegurarse de estar en las zonas tropicales, para garantizar el desarrollo y la protección de las crías.

Adicionalmente, las hembras pueden maximizar el tiempo usado en la alimentación en latitudes altas para lograr cubrir los gastos energéticos que suponen la gestación y la lactancia, aumentando así el éxito reproductivo (Craig y Herman, 1997).

De este modo, la fidelidad de las hembras, tanto a las zonas de latitudes altas como a las de latitudes bajas, está determinada por la necesidad de adquirir reservas energéticas para la reproducción (latitudes altas), y de tener un sitio seguro para el parto y la cría (latitudes bajas).

Según la International Whaling Commission (IWC, 2016), existen siete grupos o stocks reproductivos de ballenas jorobadas en el hemisferio sur, representados por las letras de la “A” a la “G” (Anexo A). En el Pacífico Sudeste (stock G), la migración anual inicia en las áreas de alimentación en el Sur, en la península de la Antártida y el sur de Chile, y finaliza en el Norte, en las zonas tropicales de apareamiento y reproducción en las costas del norte de Perú, Ecuador, Colombia, Panamá y Costa Rica (Acevedo et al., 2017). En el caso de Ecuador, las ballenas jorobadas llegan a sus costas entre los meses de mayo y octubre, con mayor abundancia en los meses de julio y agosto, siendo este último mes en el cual se observan la mayoría de las crías (Pairoa-Riofrio, 2003). Se ha registrado que, durante su ruta de regreso a la Antártida, las madres y sus crías tienden a distribuirse en aguas continentales de menos de 200 metros de profundidad, mientras que adultos o individuos sexualmente inmaduros se encuentran en aguas más profundas (Guzmán y Félix, 2017). Es posible que el hecho de que las madres y sus crías busquen zonas de poca profundidad para sus rutas migratorias de retorno esté asociado con el ahorro energético de las crías, en relación a dos fenómenos: En primer lugar, la temperatura más alta y la baja velocidad del viento en la superficie del mar proveen condiciones más tranquilas, lo que implica que las crías invierten menos energía en nadar y en salir a la superficie para respirar (Taber y Thomas, 1982; Cartwright et al., 2012). En segundo lugar, las corrientes marinas tienden a ser menos fuertes a profundidades más bajas, lo cual es preferido por las madres y sus crías porque se ha observado que las ballenas jorobadas nadan más rápido en corrientes más lentas (Trudelle et al., 2016). Esto

sugiere que las aguas de poca profundidad podrían servir como sitios de descanso ideal para las madres y crías, mientras que los machos no muestran preferencias de sitio aparentes (Bruce et al., 2014). Sin embargo, varios patrones de movimiento de *M. novaeangliae* no están completamente claros.

La estructura genética de las poblaciones de ballenas jorobadas es bastante compleja, mostrando patrones de estructuración estacionales durante el verano y el invierno, lo cual refleja largas migraciones entre zonas de alimentación y reproducción, con diferencias genéticas observables entre machos y hembras (Baker et al., 1994; Brown et al., 1995; Clapham et al., 1995). Una de las herramientas utilizadas para obtener información sobre los patrones de migración y la fidelidad de sitio de ballenas jorobadas son los microsatélites, regiones de ADN nuclear altamente repetitivo, distribuidas en los genomas de la mayoría de especies eucariotas (Carneiro et al., 2016). La longitud de los microsatélites varía entre 1 y 6 pares de bases, las cuales se repiten en tándem, hasta 100 veces en cada locus (Ellegren, 2004). Los microsatélites poseen mayores tasas de mutación que otras regiones de ADN, son altamente polimórficos, de naturaleza codominante, y la mayoría de ellos son no codificantes, lo que significa que las variaciones en estas porciones de ADN son independientes de la selección natural (Dardé et al., 2014). Estas propiedades hacen que los microsatélites sean marcadores moleculares ideales para el estudio de la estructura genética de las poblaciones, permitiendo identificar diferencias a distintos niveles de estudio (Abdul-Muneer, 2014).

Por otro lado, la determinación del sexo en ballenas jorobadas ha sido primordial en diversos estudios (Baker et al., 1998; Morin et al., 2005; Ree et al., 2013), pero bastante difícil de lograr en el campo debido a que esta especie carece de dimorfismos sexuales claros. A pesar de que las hembras suelen ser más grandes que los machos, resulta complicado diferenciar esta característica desde la superficie del mar (Spitz et al., 2002).

Dadas estas dificultades, se han desarrollado herramientas genéticas para determinar el sexo en distintas especies. El sistema ampliamente usado en *M. novaeangliae* es el ZFY/ZFX, que son genes determinantes del sexo en el cromosoma Y y en el cromosoma X, respectivamente (Palmer et al., 1990). Sin embargo, este análisis genético debe ser complementado con otra herramienta, debido a que, tras la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los productos amplificados aún deben ser diferenciados para identificar machos de hembras. Para esto, se utiliza una enzima de restricción, la cual genera fragmentos de diferentes tamaños entre ambos sexos, de forma que la determinación del sexo sea factible (Palsbøll et al., 1992).

JUSTIFICACIÓN

Las ballenas jorobadas, así como otras especies de ballenas, juegan un papel fundamental en el ecosistema de los océanos, pues al impedir la sobrepoblación de los peces de los que se alimentan (por ejemplo, las anchoas y las sardinas), regulan la cadena trófica y mantienen estables las poblaciones de varias especies de peces (Fleming et al., 2016). Adicionalmente, los desechos producidos por las ballenas, los cuales tienen altas concentraciones de hierro y nitrógeno, que son necesarios para el crecimiento del fitoplancton, sirven a su vez de alimento para el zooplancton y para otras especies de peces pequeños, de forma que mantienen un flujo saludable de elementos químicos en el océano (Willis, 2014). Finalmente, al realizar movimientos verticales en la columna de agua, las ballenas permiten la dispersión de nutrientes en el océano, permitiendo así el beneficio de varias especies marinas y manteniendo estable la cadena trófica (Nottestad et al., 2014). Dicho flujo de nutrientes, sumado a las largas migraciones de estos cetáceos,

contribuye a los procesos biogeoquímicos en el ecosistema marino, los cuales pueden influir a grandes escalas espaciales en distintos nichos ecológicos (Roman et al., 2014).

Así como otras especies de ballenas, *Megaptera novaeangliae* fue cazada indiscriminadamente en los años 1910–1986, lo cual provocó una considerable disminución de sus poblaciones (Tonnessen y Johnsen, 1982). Actualmente, se encuentra clasificada como en Preocupación Menor según la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza (IUCN). Esto se debe al éxito de recuperación que tuvieron sus poblaciones con la prohibición de la caza de ballenas en el año 1986 (Zerbini et al., 2019). Sin embargo, flotas pesqueras de países como Japón continúan con la caza de ballenas, y recientes declaraciones han indicado que difícilmente esta actividad será erradicada en un futuro cercano (Nishikawa, 2020). Por otra parte, cuando una ballena muere, su cadáver cae al fondo marino, donde es fuente de alimento para numerosas especies de animales bentónicos, contribuyendo así a la biodiversidad del fondo oceánico (Higgs et al., 2014).

Ecuador representa una de las zonas de reproducción y cría de ballenas jorobadas más conocidas del Pacífico suroriental (Stevick et al., 2014). Particularmente, la costa de Esmeraldas es un área de reproducción importante para el stock G (Oña et al., 2016). A pesar de que esta especie ha sido ampliamente estudiada, la distribución espacial y los movimientos migratorios en las aguas ecuatoriales del Pacífico son escasamente reportados. Es por esto que, tomando en cuenta la importancia ecológica de estos animales y su historia en el tema de la caza indiscriminada, el entendimiento de la dinámica poblacional y los patrones de movimiento, incluyendo la fidelidad de sitio de *M. novaeangliae* en la costa ecuatoriana, es crucial para desarrollar planes de conservación que permitan la estabilidad de la ballena jorobada en esta y otras regiones del mundo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la fidelidad de sitio de las ballenas jorobadas del stock G en el área de reproducción de Esmeraldas.

Objetivos específicos

Comparar la diversidad genética y la estructura poblacional de los grupos migratorios de ballenas jorobadas de los años 2015 y 2018, para determinar el nivel de retorno a la costa ecuatoriana a nivel poblacional.

Comparar la composición genética de ballenas jorobadas entre machos y hembras, para poder establecer el nivel de retorno a la costa ecuatoriana según el sexo.

METODOLOGÍA

Área de estudio

El estudio se realizó en los Bajos de Atacames, cubriendo la costa de la provincia de Esmeraldas desde el río Esmeraldas (N 0°59'54,1"; O 79°38'37,7") hasta Punta Galera (N 0°49'10.15"; O 80°02'55.67"), y en una parte de la Reserva Marina Galera San Francisco (RMGSF), cuyos límites se extienden desde Punta Galera hasta Cabo San Francisco (N 0°38'53.56"; O 0°04'59.17") (Figuras 1 y 2).

Estos sitios se caracterizan por presentar una amplia gama de climas, debido a la influencia de la corriente oceánica de Panamá y la subcorriente ecuatorial (INOCAR, 2005). En promedio, la temperatura de la superficie del mar oscila entre 24 y 26 °C a lo largo del año, y la estructura del fondo marino está compuesta de áreas con sustratos de roca y arena, paredes de roca y canales fangosos, con profundidades que varían entre 10 y 60 metros en los Bajos de Atacames, y entre 10 y 200 metros en la Reserva Marina Galera San Francisco (Denkinger et al., 2006).

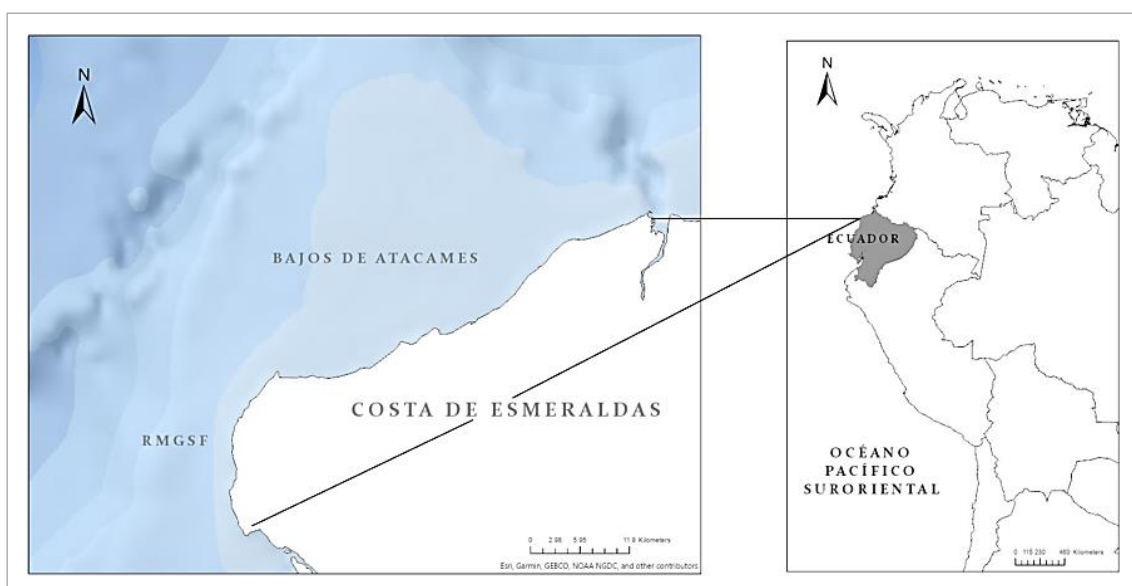


Figura 1. Área de estudio. Bajos de Atacames y Reserva Marina Galera San Francisco (RMGSF), provincia de Esmeraldas. (Basado en Oña, 2013).

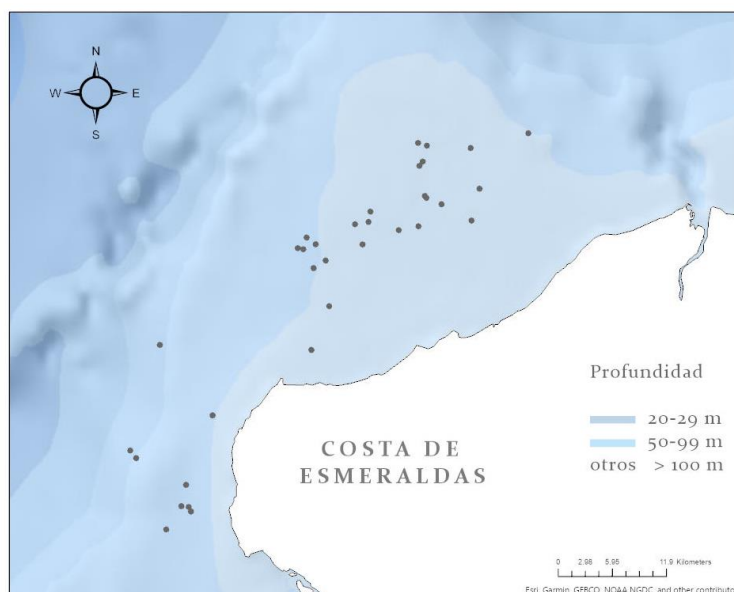


Figura 2. Puntos GPS de las muestras tomadas en 2015 y 2018. Para seis de los individuos muestreados en el 2015 no se identificó un punto GPS, sin embargo, su localización corresponde a esta misma área. (Basado en Oña, 2013).

Recolección de muestras y extracción de ADN

Durante las épocas de reproducción de los años 2015 (meses de junio, julio y septiembre) y 2018 (meses de agosto y septiembre) se obtuvo un total de 46 muestras de tejido de piel de ballenas jorobadas (2015, $n = 18$; 2018, $n = 28$) mediante el procedimiento de biopsia con dardos usando el sistema Paxarms (www.paxarms.com), desde una lancha de fibra de vidrio con motor fuera de borda. Las muestras se mantuvieron en etanol al 70% y luego se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

El ADN genómico fue extraído utilizando el protocolo de Tiocianato de Guanidina para el aislamiento de muestras biológicas (Peñafiel et al., 2019). Para el análisis de la calidad y la concentración del contenido de ADN en las muestras, cada extracción fue cuantificada con el espectrofotómetro para microplacas EpochTM (Thermo Fisher ScientificTM).

Determinación del sexo

Usando los cebadores SFY1204 (5'CATTA TGTGCTGGTTCTTTTCTG-3') y SFY0097 (5'CATC CTTTGACTGTCTATCCTTG-3') (Palsbøll et al., 1992), se realizó la reacción en cadena polimerasa (PCR) para amplificar las regiones ZFY/ZFX del genoma de ballenas jorobadas, en base al protocolo desarrollado en el Laboratorio de Biología Evolutiva (USFQ), el cual consistió en reacciones PCR con concentraciones finales de 1x Buffer, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,2 uM de cebadores, 1 U/μL de Taq polimerasa y 2 μL de ADN, para un volumen final de 25 μL. Las condiciones de amplificación incluyeron un ciclo a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto y 72 °C por 4 minutos, con un ciclo final de 72 °C por 7 minutos (Palsbøll et al., 1992). El producto amplificado fue visualizado por medio de electroforesis con gel de agarosa al 2% para confirmar la presencia del amplicón, después de lo cual fue digerido con la enzima Taq 1, siguiendo el protocolo Fast Digest Restriction Enzymes (Thermo Fisher Scientific™), y finalmente se generó un fragmento de 439 pares de bases para las hembras y dos fragmentos de 439 y 621 pares de bases para los machos (Anexo B) (Palsbøll et al., 1992).

Genotipado de microsatélites

Los polimorfismos microsatelitales fueron analizados usando seis loci diferentes: Ev1, Ev14, Ev94, Ev96 (Valsecchi y Amos, 1996), GT23 (Bérubé et al., 2001) y rw4-10 (Waldick et al., 1999). Los cebadores para la cadena adelantada de cada microsatélite fueron unidos en su extremo 5' a la secuencia M13 (5' - CACGACGTTGTAACGAC- 3'), que es usada en combinación con un cebador M13 marcado con fluorescencia (FAM, VIC y NED) (Boutin-Ganache et al., 2001) (Anexo C). Inicialmente se utilizaron los protocolos de amplificación presentados por los autores, sin embargo, numerosas modificaciones fueron necesarias para obtener los resultados

esperados, por lo que se usaron los protocolos finalmente desarrollados presentados en los anexos D y E. Los productos amplificados fueron visualizados por medio de electroforesis con gel de agarosa al 2%. Todas las muestras fueron procesadas con Exosap para degenerar DNTPs y cebadores residuales, y fueron genotipadas utilizando el secuenciador Applied Biosystems (ABI) 3730xl para medir el tamaño de los fragmentos en base a la intensidad de los productos de PCR con los cebadores marcados con fluorescencia. Las secuencias fueron posteriormente alineadas y manualmente editadas utilizando Geneious Prime 2020 (Biomatters Limited).

Análisis poblacionales

Se realizaron diversos análisis de la estructura poblacional y diversidad genética de los grupos migratorios. Para determinar la probabilidad de que los individuos muestreados en cada período de estudio no hayan sido muestreados más de una vez, se estimó la probabilidad de identidad (P_{ID}) o la probabilidad de hallar dos genotipos idénticos en el grupo de estudio. Esto se hizo en base a una ecuación que asume los sucesos que ocurrirían en poblaciones naturales (Waits et al., 2001). Para obtener una primera impresión de la estructura de los datos, se realizaron pruebas que descarten que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y en equilibrio de ligamiento de locus (LD). Los niveles de significancia ($P = 0,05$) para la desviación de HWE y LD se corrigieron con la prueba secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). Para analizar la diversidad genética de cada grupo de interés se calculó la heterocigosidad (H) junto con una prueba de T, para determinar si la diferencia entre los valores de heterocigosidad fueron significativos, además del déficit de heterocigotos, basado en el test de U (Rousset y Raymond, 1995), el cual es un indicativo de altas tasas de reproducción dentro de un mismo grupo o endogamia, de forma que la frecuencia de alelos diferentes disminuye (Wright, 1921). También se realizó un análisis de

componentes principales (PCA), que permite identificar la estructura de las poblaciones a partir de la distribución de la variación genética en la población (McVean, 2009). Finalmente, se aplicó un análisis de varianza molecular (AMOVA) en base al estadístico F_{ST} , mediante el cual es posible calcular el nivel de diferenciación genética dentro y entre distintas poblaciones (Meirmans y Liu, 2018). La probabilidad de identidad y los análisis PCA fueron ejecutados en R Studio, utilizando el paquete adegenet 2.1.0. Las pruebas de equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento de locus, así como la heterocigosidad y el déficit de heterocigotos se realizaron en la plataforma digital GenePop. Finalmente, los análisis AMOVA fueron ejecutados en el software GenAlex 6.5.

RESULTADOS

Análisis general

De las 46 muestras totales, 44 fueron genotipadas para los seis microsatélites y las 2 restantes para cinco microsatélites. Se registraron 5 hembras y 13 machos (total de 18 individuos) para el 2015, y 7 hembras y 21 machos (total de 28 individuos) para el 2018. La probabilidad de identidad (P_{ID}) calculada fue de 5.3×10^{-3} para el grupo migratorio del 2015 y de 3.4×10^{-3} para el del 2018, lo cual indica que existe una baja probabilidad de que, dentro de cada grupo, un mismo individuo haya podido ser muestreado dos veces. De acuerdo con las pruebas realizadas, tanto el grupo migratorio del 2015 como el grupo migratorio del 2018 no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, y los loci no mostraron ligamiento, lo que concuerda con lo esperado debido a que se trata de poblaciones en estado natural con alta migración y flujo génico (McRae et al., 2005). Los análisis genéticos mostraron que la heterocigosidad del grupo migratorio del 2018 ($H = 0,7661$) fue mayor que la heterocigosidad del grupo migratorio del 2015

($H = 0,7055$), y esta diferencia fue significativa ($P = 0,0072$). Además, se observó un déficit de heterocigotos en el grupo del 2018 ($P = 0,0000$) en comparación con el grupo del 2015 ($P = 0,8326$). El análisis de componentes principales (PCA) (Figura 3) mostró cierto grado de solapamiento entre los dos grupos migratorios, con agrupaciones de individuos más claras dentro del 2018 en comparación con el 2015. El análisis de varianza molecular (AMOVA) (Tabla 1) encontró una diferencia genética significativa entre los grupos de ambos años ($F_{ST} = 0,0592$, $P = 0,001$).

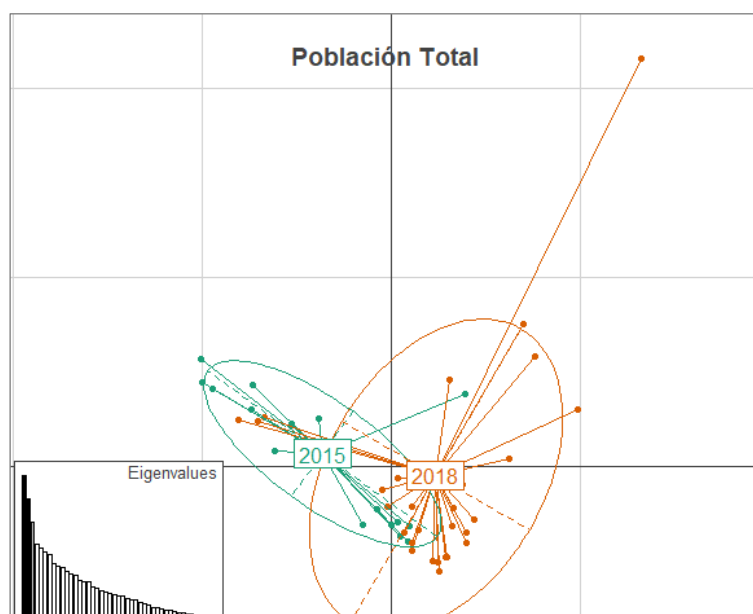


Figura 3. Análisis de PCA para la población total, incluye los grupos migratorios del 2015 y del 2018. Los porcentajes de los dos *eigenvalues* usados fueron 10,49% y 8,76%.

Análisis por sexo

En las hembras, la heterocigosidad del grupo de 2018 ($H = 0,7448$) fue mayor que la heterocigosidad del grupo de 2015 ($H = 0,6466$), y esta diferencia no fue significativa ($P = 0,0580$). Además, se observó un déficit de heterocigotos en el grupo del 2018 ($P = 0,0013$) en comparación con el grupo del 2015 ($P = 0,9880$). El análisis de PCA (Figura 4) mostró amplio solapamiento entre los dos grupos de hembras. El

AMOVA (Tabla 1) indicó que no hubo diferencia genética significativa entre los grupos de hembras de ambos años ($F_{ST} = 0,0081$, $P = 0,326$).

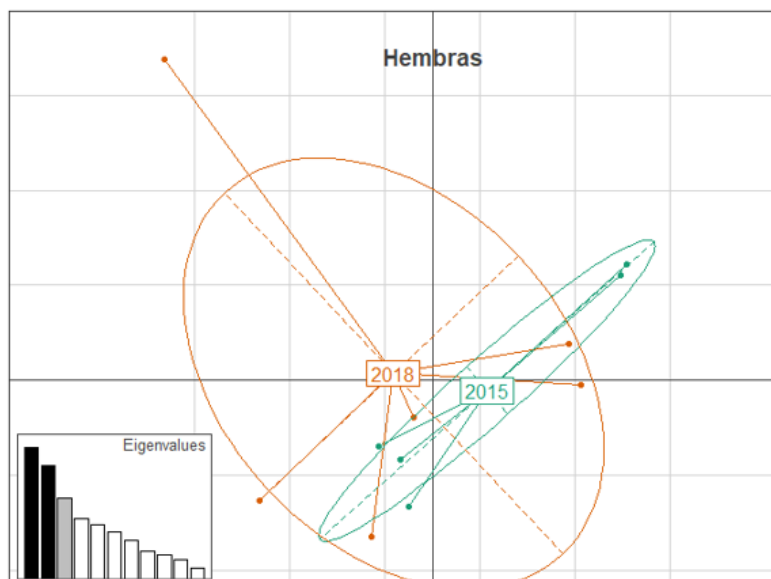


Figura 4. Análisis de PCA para los grupos de hembras de 2015 y 2018. Los porcentajes de los dos *eigenvalues* usados fueron 21,64% y 18,71%.

En los machos, la heterocigosidad del grupo de 2018 ($H = 0,7488$) fue mayor que la heterocigosidad del grupo de 2015 ($H = 0,7070$), y esta diferencia fue significativa ($P = 0,0135$). Además, se observó un déficit de heterocigotos en el grupo del 2018 ($P = 0,000$) en comparación con el grupo del 2015 ($P = 0,6640$). El análisis de PCA (Figura 5) mostró cierto grado de solapamiento entre los dos grupos de machos, con agrupaciones de individuos más claras dentro del grupo del 2018 en comparación con la del 2015. El AMOVA (Tabla 1) encontró una diferencia genética significativa entre los grupos de machos de ambos años ($F_{ST} = 0,0752$, $P = 0,001$).

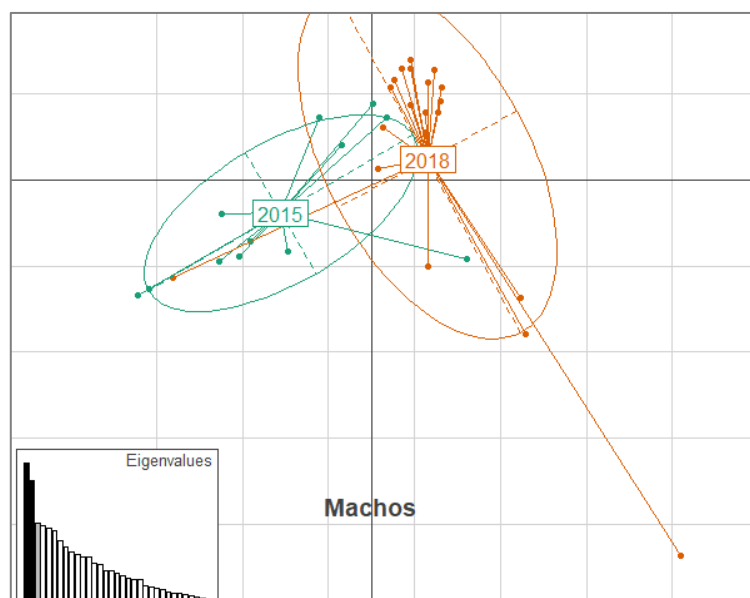


Figura 5. Análisis de PCA para los grupos de machos de 2015 y 2018. Los porcentajes de los dos *eigenvalues* usados fueron 11,91% y 10,37%.

Tabla 1. Resultados del AMOVA para las poblaciones de estudio. En “Grupos migratorios 2015 y 2018” se incluyen tanto hembras como machos de ambos años.

	Fuente de Variación			
	Entre los grupos	Dentro de los grupos	F_{ST}	P
Grupos migratorios 2015 y 2018	0,06	0,94	0,0592	0,001
Hembras 2015 y 2018	0,01	0,99	0,0081	0,326
Machos 2015 y 2018	0,08	0,92	0,0752	0,001

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el nivel de fidelidad de sitio, tanto a nivel poblacional como a nivel de individuos machos e individuos hembras, de ballenas jorobadas del stock G a la zona de reproducción de la costa de Esmeraldas en

Ecuador. Para esto, se analizó la estructura poblacional de los grupos migratorios del 2015 y del 2018 en base a su diversidad genética.

Proporción de machos y hembras

En cuanto a la relación de sexos, el número de machos y hembras observados es bastante desproporcional (13 machos y 5 hembras para el 2015, y 21 machos y 7 hembras para el 2018). Este patrón se explica porque, a diferencia de lo que ocurre en las zonas de alimentación, en las zonas de reproducción y en las rutas migratorias existe un patrón de imparidad entre ambos sexos debido a diferencias en el comportamiento o el tiempo de residencia (Craig y Herman, 1997). Por ejemplo, se ha registrado que la estructura de los grupos competitivos (grupos encontrados en las zonas de reproducción que se caracterizan por presentar una intensa competencia entre machos para acceder a las hembras (Clapham et al., 1992)) de ballenas jorobadas en la costa de Ecuador puede incluir una hembra como núcleo del grupo y hasta cinco machos que rodean a la hembra y compiten por ella (Félix y Novillo, 2015). Por esta razón, los machos son más accesibles y existe una mayor probabilidad de muestrearlos. Por otro lado, el parto en las hembras se puede producir antes o durante el trayecto de las rutas migratorias hacia las zonas de reproducción, lo cual evita completar la migración a dichos sitios (Craig y Herman, 1997). Además, el tiempo de residencia de las hembras en las áreas de reproducción es más corto y asincrónico entre ellas en comparación con los machos, resultando en un exceso de machos en esta región, lo cual indica que las hembras no migran cada año (Stevick et al., 2010; Craig et al., 2003). Finalmente, las hembras tienden a aumentar el éxito reproductivo maximizando el tiempo de estadía en las áreas de alimentación para acumular energía suficiente que será gastada en la migración y lactancia por largos períodos sin fuentes de alimento, de forma que podría disminuir el número de hembras que llegan a la zona de reproducción (Craig y Herman, 1997; Brown et al., 1995). Sin

embargo, a pesar de que el número de muestras colectadas aumente, existe evidencia que indica que, en las áreas de reproducción, el número de machos tiende a ser mayor que el número de hembras (Baker et al., 1994, 1998; Brown et al., 1995; Olavarría et al., 2007).

Análisis genéticos

Cuando se juntan los datos de machos y hembras, la diversidad genética dentro del grupo migratorio del 2018 es mayor que el del grupo migratorio del 2015. De manera general, esto podría deberse al hecho de que existió un mayor número de muestras colectadas en el 2018, lo que significa que existen más individuos contribuyendo a la diversidad genética poblacional total. Sin embargo, los valores de heterocigosidad obtenidos (2015 = 0,7055; 2018 = 0,7661) son bastante similares a la heterocigosidad observada en otras zonas de reproducción, por ejemplo, las costas de Gabón en África ($H = 0,745$; Pomilla y Rosenbaum, 2006), el noreste de Madagascar ($H = 0,751$; Pomilla y Rosenbaum, 2006), el este de Australia ($H = 0,726$; Valsecchi et al., 2002) y Nueva Caledonia ($H = 0,768$; Garrigue et al., 2004). Esto sustenta el hecho de que diferentes poblaciones reproductoras se mezclan en la zona de alimentación del hemisferio sur, de manera que se encuentran niveles de diversidad genética similares en dichas poblaciones (Schmitt et al., 2014).

Tanto en el análisis general como en el análisis por sexo, obtuve que existe un déficit de heterocigotos en el grupo migratorio del 2018. En poblaciones naturales, un déficit de heterocigotos normalmente se da al observarse el efecto Wahlund, el cual consiste en que el nivel de heterocigosidad disminuye por la subestructuración de las poblaciones, es decir, que dentro de la población principal existen subpoblaciones, las cuales tienden a reproducirse internamente en lugar de hacerlo con otras subpoblaciones (Garnier-Géré y Chikhi, 2013). Esta posibilidad concuerda con previos registros sobre la estructura de poblaciones de *Megaptera novaeangliae*, donde se ha observado una

tendencia de las áreas de reproducción del hemisferio sur (incluido el stock G de estudio) a presentar poblaciones subestructuradas (Rosenbaum et al., 2009). Sin embargo, el grupo migratorio del 2015 no presenta un déficit de heterocigotos, lo cual puede explicarse por la diferencia en el número de individuos muestreados en los dos años: al tener casi el triple de individuos en el 2018, la posible subestructuración poblacional es más clara.

Los análisis de PCA y AMOVA para el total de los individuos del 2015 y del 2018 (Figura 3 y Tabla 1), así como la diversidad genética basada en la heterocigosidad, indican que existe una diferencia significativa en la composición genética entre los dos grupos migratorios. Sin embargo, esta tendencia general se debe a que la mayor contribución de la información genética para ambos años viene de los machos y, en efecto, existen diferencias significativas entre los machos de ambos años, como se explica a continuación.

Los análisis de PCA y AMOVA de los machos del 2015 y del 2018 (Figura 5 y Tabla 1), así como la diversidad genética basada en la heterocigosidad, indican una diferencia significativa en la composición genética entre los dos grupos migratorios, sugiriendo que algunos de los machos de cada año podrían estar proviniendo de subpoblaciones, o inclusive “stocks”, diferentes. Este resultado coincide con estudios que muestran que los machos, en general, no tienen fidelidad de sitio; es decir, no vuelven a reproducirse en las mismas áreas donde nacieron (Anderson et al., 2010).

La ausencia de fidelidad de sitio en los machos puede estar relacionada con la alta competencia entre machos, que induce a una mayor dispersión entre diferentes zonas de reproducción en busca de oportunidades para aparearse con una hembra (Craig et al., 2002). Esto también implica que el mayor flujo génico está determinado por los machos (Medrano-González et al., 2001). Además, la separación de los individuos observada en el análisis PCA (Figura 5), ratifica la posible subestructuración planteada previamente, y

es consistente con patrones registrados en los que existe un incremento en la dispersión de los machos a través de la migración entre las subpoblaciones dentro de una misma zona de reproducción, o entre diferentes zonas de reproducción (Rosenbaum et al., 2009). Adicionalmente, existen individuos del 2018 que son mucho más diferentes que el resto (Figura 5), especialmente el individuo más lejano. La diferencia bastante clara de este individuo, conjuntamente con otros individuos fuera de la periferia de la similitud genética de los otros grupos, podría sugerir que se trata de individuos pertenecientes a otras poblaciones reproductoras. Esto es congruente con observaciones previas del intercambio de individuos entre las poblaciones de ballenas jorobadas, especialmente en el caso de los machos, los cuales tienden a moverse más en sus rutas migratorias (Anderson et al., 2010). Particularmente en el hemisferio sur, el hecho de que las zonas de alimentación sean circumpolares facilita la mezcla de individuos de diferentes poblaciones reproductoras en las aguas antárticas (Chittleborough, 1961; Dawbin, 1966; Robbins et al., 2011; Schmitt et al., 2014). Este comportamiento sugiere que existe la posibilidad de que individuos de poblaciones genéticamente diferentes se hayan desplazado a la zona de reproducción de Esmeraldas. No obstante, se necesitan estudios que incluyan abundante material comparativo para identificar la posible población de la que estos individuos provienen.

Por otro lado, al examinar las hembras (Figura 4 y Tabla 1), tanto el análisis de PCA, como el AMOVA y la diversidad genética basada en la heterocigosidad, indican que no existe una diferencia significativa entre los grupos de hembras del 2015 y del 2018. Es decir que, si bien existe cierta diferencia genética, no es lo suficientemente alta como para tratarse de dos grupos migratorios distintos, sugiriendo una alta fidelidad de sitio. Es decir, es altamente probable que las poblaciones de hembras se parezcan porque nacieron en esa zona de reproducción, a la que han vuelto como adultas. De hecho, la

distribución más uniforme de las hembras muestra que la similitud genética es mayor que en los machos. Los resultados concuerdan con el patrón general de que la dispersión de las hembras en el Pacífico Sur es limitada, a pesar de que no existan barreras geográficas, debido a la fuerte filopatría a los destinos migratorios, en este caso al área de reproducción de la costa de Esmeraldas (Olivarría et al., 2007). Esta fidelidad de sitio de las hembras podría deberse al ahorro energético, pues resulta costoso utilizar la energía almacenada en las áreas de alimentación en la exploración de otros sitios desconocidos, en lugar de realizar la migración a un sitio que resulta más familiar para las hembras y redirigir esa energía al parto y la lactancia (Derville et al., 2018).

Adicionalmente, las hembras podrían preferir el área de reproducción de la costa de Esmeraldas debido a la baja profundidad de las aguas (menor a 50 m), lo cual corrobora lo mencionado inicialmente sobre que las zonas de poca profundidad proveen condiciones más tranquilas para el desplazamiento de las crías (Taber y Thomas, 1982; Cartwright et al., 2012), además de que resultan ser un ambiente más seguro para las crías debido a que en estas zonas existen menos riesgos de depredación, como por ejemplo la presencia de orcas o tiburones (Medrano-González et al., 2001; Corkeron y Connor, 1999).

Efectividad de métodos moleculares

Al comparar los datos de campo y la información obtenida en el laboratorio, se evidencia que la determinación del sexo aplicando el sistema ZFY/ZFX es bastante efectivo, pues es una técnica altamente sensitiva e inequívoca. Esto hace que la técnica sea muy útil especialmente en casos en los que determinar el sexo en el campo es complicado, debido al difícil acceso a los animales de interés o a la ausencia de un claro dimorfismo sexual que permita identificarlos (Morin et al., 2005).

El uso de microsátélites para obtener información sobre la diversidad es un método ampliamente usado en genética de poblaciones, sin embargo, se debe tomar en

cuenta el tipo de microsatélite analizado, pues dependiendo de la naturaleza polimórfica del mismo, existirán diferentes grados de información obtenida (Carneiro et al., 2016). En el caso del presente estudio, varios de los microsatélites empleados han demostrado presentar un alto contenido de información polimórfica en otros estudios de ballenas jorobadas (Valsecchi et al., 1997; Anderson et al., 2010). Sin embargo, se recomienda aumentar el número de microsatélites usados para incrementar el grado de discriminación entre individuos y lograr mayor especificidad de los movimientos migratorios. Además, en el futuro, sería ideal poder estudiar el sistema utilizando polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, por sus siglas en inglés).

Limitaciones

Si bien los patrones de la proporción de machos y hembras explicados anteriormente pueden ser difíciles de modificar, es claro que el número total de individuos aquí analizados es bajo en comparación con otros estudios. Por esta razón, se recomienda mejorar el esfuerzo de campo para tener un mayor tamaño muestral total en futuras investigaciones.

La identificación de individuos con mayor diferencia genética podría sugerir la posible proveniencia de una población distinta como se mencionó previamente. Sin embargo, otro tipo de enfoques (por ejemplo, a través de ADN mitocondrial (Baker et al., 1998)) son necesarios para esclarecer estas dudas. Esto se debe principalmente a que los estudios publicados con microsatélites no muestran sus matrices de datos, mientras que los que están basados en ADN mitocondrial, publican las secuencias analizadas en GenBank, proveyendo una gran base de datos comparativos a nivel mundial.

CONCLUSIONES

El presente estudio determinó la estructura poblacional y la diversidad genética de los grupos migratorios de ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) de los años 2015 y 2018 en la costa de Esmeraldas en Ecuador. Se observó que no existe una variación en la composición genética de los grupos de hembras de ambos años, contrario a los machos, que sí mostraron dicha variación. Estos resultados sugirieron que las hembras presentan una alta fidelidad de sitio, es decir, que vuelven a la misma zona de reproducción con mayor frecuencia que los machos, los cuales tienden a dispersarse más entre diferentes zonas de reproducción. La zona de reproducción de Esmeraldas, particularmente, puede ser preferida por las hembras y crías por la estructura oceánica que favorece el apareamiento, el parto y la cría de ballenas jorobadas. Si bien, estos resultados coincidieron con los patrones ampliamente citados en la literatura sobre una mayor y evidente fidelidad de sitio de las hembras en comparación con los machos, estudios más completos y con mayores tamaños muestrales son necesarios para tener una aproximación más clara de los patrones de movimiento de las ballenas jorobadas en el Pacífico Sudeste.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, J., Aguayo-Lobo, A., Allen, J., Botero-Acosta, N., Capella, J., Castro, C., ... Stevick, P. T. (2017). Migratory preferences of humpback whales between feeding and breeding grounds in the eastern South Pacific. *Marine Mammal Science*, 33(4), 1035–1052.
- Abdul-Muneer, P. (2014). Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International*, 2014, 1-11.
- Amaral, A., Loo, J., Jaris, H., Olavarria, C., Thiele, D., Ensor, P., ... Rosenbaum, H. C. (2016). Population genetic structure among feeding aggregations of humpback whales in the Southern Ocean. *Marine Biology*, 163(6).
- Anderson, M., Steel, D., Franklin, W., Franklin, T., Paton, D., Burns, D., ... Olavarria, C. (2010). Microsatellite genotype matches of eastern Australian humpback whales to Area V feeding and breeding grounds. *Report (SC/62/SH7) to the Scientific Committee of the International Whaling Commission, Agadir, Morocco*, (June), 1–11.
- Baker, C., Perry, A., & Herman, L. (1987). Reproductive histories of female humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the North Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 41, 103–114.
- Baker, C., Slade, R., Bannister, J., Abernethy, R., Weinrich, M., Lien, J., ... Vasquez, O. (1994). Hierarchical structure of mitochondrial DNA gene flow among humpback whales, world-wide. *Molecular Ecology*, 3:313–327.
- Baker, C. S., L. M. Herman, A. Perry, W. S. Lawton, J. M. Straley, A. A. Wolman, G. D. Kaufman, H. E. Winn, J. D. Hall, J. M. Reinke And J. Ostman. (1986). Migratory movement and population structure of humpback whales (*Megaptera*

- novaeangliae*) in the central and eastern North Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 31:105-119.
- Baker, C., Flores-González, L., Abernethy, B., Rosenbaum, H., Slade, R., Capella, J., & Bannister, J. (1998). Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among humpback whales of the Southern Hemisphere. *Marine Mammal Science*, 14:721–737.
- Bérubé, M., Jorgensen, H., McEwing, R., & Palsbøll, P. (2001). Polymorphic dinucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*. *Molecular Ecology*, 9(12):2181-3.
- Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M., & Deschepper, C. (2001). M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*, 31: 24–28.
- Brown, M., Corkeron, P., Hale, P., Schultz, K., & Bryden, M. (1995). Evidence for a sex segregated migration in the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 259:229–234.
- Bruce, E., Albright, L., Sheehan, S., & Blewitt, M. (2014). Distribution patterns of migrating humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in Jervis Bay, Australia: A spatial analysis using geographical citizen science data. *Applied Geography*, 54:83–95.
- Carneiro, M., Santini, L., Lima, A., & De Freitas, C. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3): 312–328.
- Cartwright, R., Gillespie, B., LaBonte, K., Mangold, T., Venema, A., Eden, K., & Sullivan, M. (2012). Between a rock and a hard place: Habitat selection in

- female-calf humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) pairs on the hawaiian breeding grounds. *PLoS ONE*, 7(5).
- Chittleborough, R. (1961). Australian catches of humpback whales. CSIRO Australian Division of Fisheries, Oceanographic Reports, 34:1–12.
- Clapham, P., Palsbøll, P., Mattila, D., & Vásquez, O. (1992). Composition and Dynamics of Humpback Whale Competitive Groups in the West Indies. *Behaviour*, 122(3-4).
- Clapham, P., Bérubé, M., & Mattila, D. (1995). Sex ratio of the Gulf of Maine humpback whale population. *Marine Mammal Science*, 11:231–240.
- Clapham, P.J. (1996). The social and reproductive biology of humpback whales: an ecological perspective. *Mammal. Rev*, 26: 27 -49.
- Corkeron, P., & Connor, R. (1999). Why do baleen whales migrate? *Marine Mammal Science*, 15:1228–1245.
- Craig, A., & Herman, L. (1997). Sex differences in site fidelity and migration of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) to the Hawaiian Islands. *Canadian Journal of Zoology*, 75(11): 1923-1933.
- Craig, A. S., Herman, L. M., & Pack, A. A. (2002). Male mate choice and male-male competition coexist in the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *Canadian Journal of Zoology*, 80(4), 745–755.
- Craig, A., Herman, L., Gabriele, C., & Pack, A. (2003). Migratory timing of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the central north pacific varies with age, sex and reproductive status. *Behaviour*, 140:981 –1001.
- Cypriano-Souza, A., Fernández, G., Lima-Rosa, C., Engel, M., & Bonatto, S. (2010). Microsatellite genetic characterization of the humpback whale (*Megaptera*

- novaeangliae*) breeding ground off Brazil (Breeding Stock A). *Journal of Heredity*, 101(2), 189–200.
- Dardé, M., Ajzenberg, D., & Su, C. (2014). Molecular Epidemiology and Population Structure of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* (Second Edition), 61-97.
- Dawbin, W. (1966). The seasonal migratory cycle of humpback whales. Pages 145–170. in K. Norris, ed. Whales, dolphins and porpoises. University of California Press, Berkeley, CA.
- Denkinger, J., Suárez, C., Franco, A., & Riebensahm, D. (2006). Proyecto ESMEMAR. Informe Final. Componente Marino. p. 4-57.
- Derville, S., Torres, L., & Garrigue, C. (2018). Social segregation of humpback whales in contrasted coastal and oceanic breeding habitats. *Journal of Mammalogy*, 99(1), 41-54.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, 435–445.
- Félix, F., & Novillo, J. (2005). Structure and Dynamics of Humpback Whales Competitive Groups in Ecuador. *Animal Behavior and Cognition*, 2(1), 56-70.
- Fleming, A., Clark, C., Calambokidis, J., & Barlow, J. (2016). Humpback whale diets respond to variance in ocean climate and ecosystem conditions in the California Current. *Global Change Biology*, 22: 1214-1224.
- Garnier-Géré, P., & Chikhi, L. (2013). Population Subdivision, Hardy–Weinberg Equilibrium and the Wahlund Effect. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.) doi: DOI: 10.1002/9780470015902.a0005446.pub3.
- Garrigue, C., Dodemont, R., Steel, D., & Baker, C. (2004). Organismal and ‘gametic’ capture-recapture using microsatellite genotyping confirm low abundance and

reproductive autonomy of humpback whales on the wintering grounds of New Caledonia. *Marine Ecology Progress Series*, 274:251–262.

Geneious Prime. (2020). <https://www.geneious.com>

Guzmán, H., & Félix, F. (2017). Movements and habitat use by southeast Pacific humpback whales satellite tracked at two breeding sites. *Aquatic Mammals*, 43:139–155.

Herman, L., Pack, A., Rose, K., Craig, A., Herman, E., Hakala, S., & Milette, A. (2011). Resightings of humpback whales in Hawaiian waters over spans of 10–32 years: Site fidelity, sex ratios, calving rates, female demographics, and the dynamics of social and behavioral roles of individuals. *Marine Mammal Science*, 27:736–768.

Higgs, N., Gates, A., & Jones, D. (2014). Fish Food in the Deep Sea: Revisiting the Role of Large Food-Falls. *PLoS ONE*, 9(5): e96016.

INOCAR. (2005). Derrotero de la Costa Continental e Insular del Ecuador. 4ta edición. *International Journal of Comparative Psychology*, this issue, 121-133.

IWC. (2016). Report of the Scientific Committee of the International Whaling Commission. *Journal of Cetacean Research & Management* 17 (Supl.).

Mackintosh, N. A. (1942). The southern stocks of whalebone whales. *Discovery Reports*, 22: 197-300.

McRae, A., Pemberton, J., & Visscher, P. (2005). Modeling Linkage Disequilibrium in Natural Populations: The Example of the Soay Sheep Population of St. Kilda, Scotland. *Genetics*, 171(1): 251–258.

McVean, G. (2009). A Genealogical Interpretation of Principal Components Analysis. *PLoS Genetics*, 5(10): e1000686.

- Medrano-González, L., Baker, C. S., Robles-Saavedra, M. R., Murrell, J., Vázquez-Cuevas, M. J., Congdon, B. C., ... Villavicencio-Llamosas, K. (2001). Transoceanic population genetic structure of humpback whales in the North and South Pacific. *Memoirs of the Queensland Museum*, 47(2), 465–480.
- Meirmans, P., & Liu, S. (2018). Analysis of Molecular Variance (AMOVA) for Autopolyploids. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6:66.
- Mikhalev, Y. (1997). Humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the Arabian Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 149:13-21.
- Morin, P. A., Nestler, A., Rubio-Cisneros, N. T., Robertson, K. M., & Mesnick, S. L. (2005). Interfamilial characterization of a region of the ZFX and ZFY genes facilitates sex determination in cetaceans and other mammals. *Molecular Ecology*, 14(10), 3275–3286.
- Nøttestad, L., Sivle, L., Krafft, B., Langård, L., Anthonypillai, V., Bernasconi, M., Langøy, H., & Axelsen, B. (2014). Ecological aspects of fin whale and humpback whale distribution during summer in the Norwegian Sea. *Marine Ecology*, 35:221-232.
- Olavarría, C., Baker, C., Garrigue, C., Poole, M., Hauser, N., Caballero, S., ... Capella, J. (2007). Population structure of humpback whales throughout the South Pacific and the origin of the eastern Polynesian breeding grounds. *Marine Ecology Progress Series*, 330:257–268.
- Oña, J., & Denking, J. (2013). Humpback whale habitat preference and occurrence of songs in relation to depth and sea bottom structure off the coast of Esmeraldas, Ecuador. Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Postgrados. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/2554>

- Oña, J., Garland, E., & Denkinger, J. (2016). Southeastern Pacific humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) and their breeding grounds: Distribution and habitat preference of singers and social groups off the coast of Ecuador. *Marine Mammal Science*, 33:219-235.
- Pairoa-Riofrio, C. (2003). Estudio poblacional de ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) en Esmeraldas, Ecuador. Educación y capacitación. Organización para la Conservación de Mamíferos Acuáticos en Sudamérica, Yaqui Pacha.
- Palmer, M., Berta, P., Sinclair, A., Pym, B., & Goodfellow, P. (1990). Comparison of human ZFY and ZFX transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(5):1681–1685.
- Palsbøll, 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.
- Peñafiel, N., Flores, D. M., Rivero De Aguilar, J., Guayasamin, J. M., & Bonaccorso, E. (2019). A cost-effective protocol for total DNA isolation from animal tissue. *Neotropical Biodiversity*, 5(1), 69–74.
- Pomilla, C., & Rosenbaum, H. (2006). Estimates of relatedness in groups of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on two wintering grounds of Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 15:2541–2555.
- Rasmussen, K., Palacios, D. M., Calambokidis, J., Saborío, M. T., Dalla Rosa, L., Secchi, E. R., ... Stone, G. S. (2007). Southern Hemisphere humpback whales wintering off Central America: Insights from water temperature into the longest mammalian migration. *Biology Letters*, 3(3), 302–305.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86:248-249.

- Ree, F., Baker, C. S., Steel, D., Calambokidis, J., Falcone, E., González-peral, U., ... Yamaguchi, M. (2013). Strong maternal fidelity and natal philopatry shape genetic structure in North Pacific humpback whales. *Marine Ecology Progress Series*, 494, 291–306.
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- Rice, W. (1989). Analyzing table of statistical tests. *Evolution*, 43, 223–225.
- Robbins, J., Dalla, L., Allen, J., Mattila, D., Secchi, E., Friedlaender, A., ... Steel, D. (2011). Return movement of a humpback whale between the Antarctic Peninsula and American Samoa: A seasonal migration record. *Endangered Species Research*, 13:117–121.
- Roman, J., Estes, J., Morissette, L., Smith, C., Costa, D., McCarthy, J., ... Smetacek, V. (2014). Whales as marine ecosystem engineers. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12:377-385.
- Rosenbaum, H., Pomilla, C., Mendez, M., Leslie, M. S., Best, P. B., Findlay, K. P., ... Kiszka, J. (2009). Population Structure of Humpback Whales from Their Breeding Grounds in the South Atlantic and Indian Oceans. *PLoS ONE*, 4(10), e7318.
- Rousset, F., & Raymond, M. (1995). Testing Heterozygote Excess and Deficiency. *Genetics*, 140(4):1413–1419.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology*, 8:103-106.
- Schmitt, N., Double, M., Jarman, S., Gales, N., Marthick, J., Polanowski, A., ... Peakall, R. (2014). Low levels of genetic differentiation characterize Australian

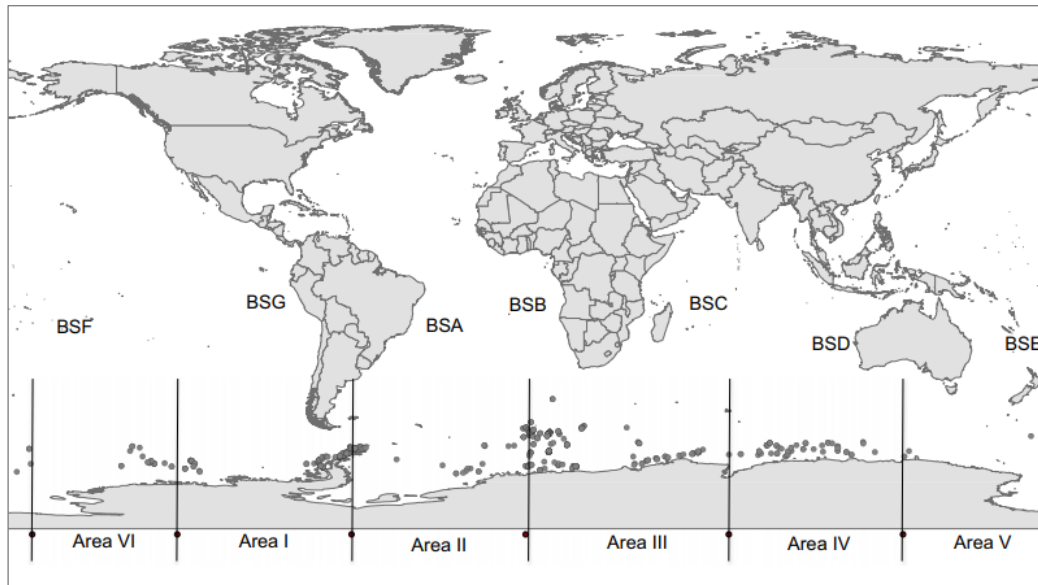
- humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) populations. *Marine Mammal Science*, 30(1), 221–241.
- Spitz, S., Herman, L., Pack, A., & Deakos, M. (2002). The relation of body size of male humpback whales to their social roles on the Hawaiian winter grounds. *Canadian Journal of Zoology*, 80(11), 1938–1947.
- Stevick, P., Neves, M., Johansen, F., Engel, M., Allen, J., Marcondes, M., & Carlson, C. (2010). A quarter of a world away: female humpback whale moves 10 000 km between breeding areas. *Biology Letters*, 7:299 – 302.
- Stevick, P., Allen, J., Engel, M., Félix, F., Haase, B., & Neves, M. (2014). Inter-oceanic movement of an adult female humpback whale between Pacific and Atlantic breeding grounds off South America. *Journal of Cetacean Research and Management*, 13(2), 159–162.
- Taber, S., & Thomas, P. (1982). Calf development and mother-calf spatial relationships in southern right whales. *Animal Behavior*, 30:1072–1083
- Tønnessen J., & Johnsen, A. (1982). The history of modern whaling. London, UK: C. Hurst and Co.
- Townsend, C. H. (1935). The distribution of certain whales as shown by logbook records of American whaleships. *Zoologica*, 19: 1-50.
- Trudelle, L., Cerchio, S., Zerbini, A., Geyer, Y., Mayer, F-X, Jung, J., Hervé, M., Pous, S., Adam, O., Charrassin, J-B, Sallée, J-B, Rosenbaum, H., Adam, O., & Charrassin, J-B. (2016). Influence of environmental parameters on movements and habitat utilization of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the Madagascar breeding ground. *Royal Society Open Science*, 3:160616
- Valsecchi, E., & Amos, W. (1996). Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology*, 5:151-156.

- Valsecchi, E., Palsbøll, P., Hale, P., Glockner-Ferrari, D., Ferrari, M., Clapham, P., ... Amos, B. (1997). Microsatellite genetic distances between oceanic populations of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *Molecular Biology and Evolution*, 14(4), 355–362.
- Valsecchi, E., Hale, P., Corkeron, P., & Amos, W. (2002). Social structure in migrating humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Molecular Ecology*, 11:507–518.
- Vu, E., Risch, D., Clark, C., Gaylord, S., Hatch, L., Thompson, M., ... Van Parijs, S. (2012). Humpback whale song occurs extensively on feeding grounds in the western North Atlantic Ocean. *Aquatic Biology*, 14(2), 175–183.
- Waits, L., Luikart, G., & Taberlet, P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: Cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10:249–256.
- Waldick, R., Brown, M., & White, B. (1999). Characterization and isolation of microsatellite loci from the endangered North Atlantic right whale. *Molecular Ecology*, 8(10), 1763–1765.
- Wedekin, L. L., Neves, M. C., Marcondes, M. C. C., Baracho, C., Rossi-Santos, M. R., Engel, M. H., & Simões-Lopes, P. C. (2010). Site fidelity and movements of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on the Brazilian breeding ground, southwestern Atlantic. *Marine Mammal Science*, 26(4), 787–802
- Willis, J. (2014). Whales maintained a high abundance of krill; both are ecosystem engineers in the Southern Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 513:51-69.
- Wright, S. (1921). Systems of mating II. The effects of inbreeding on the genetic composition of a population. *Genetics*, 6:124–143.
- Zerbini, A., Andriolo, A., da Mata, J., Simões, P., Siciliano, S., Pizzorno, J., ... VanBlaricom, G. (2004). Winter distribution and abundance of humpback

whales (*Megaptera novaeangliae*) off northeastern Brazil. *Journal of Cetacean Research and Management*, 6(1), 101–107.

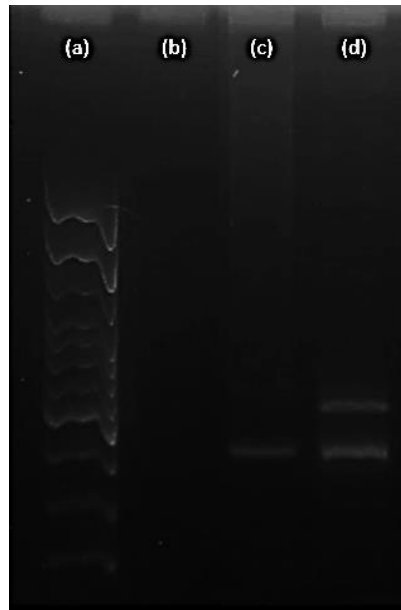
Zerbini, A., Adams, G., Best, J., Clapham, P., Jackson, J., & Punt, A. (2019). Assessing the recovery of an Antarctic predator from historical exploitation. *Royal Society Open Science*, 6:190368.

**ANEXO A: DISTRIBUCIÓN DE LOS STOCKS REPRODUCTIVOS DE
BALLENAS JROBADAS EN EL HEMISFERIO SUR**



Descripción: El mapa muestra la ubicación de los stocks reproductivos de ballenas jorobadas en el hemisferio sur, de BSA (*Breeding Stock A*) a BSG (*Breeding Stock G*). (Tomado de Amaral et al., 2016).

ANEXO B: FRAGMENTOS OBTENIDOS TRAS LA DIGESTIÓN CON LA ENZIMA TAQ 1 EN LA DETERMINACIÓN DEL SEXO DE BALLENAS JOROBADAS



Descripción: El primer carril (a) corresponde al Ladder de Invitrogen (100 bp); el segundo carril (b) corresponde a un control negativo, sin presencia de ADN; el tercer carril (c) corresponde a la muestra de una hembra, con un solo fragmento de 439 bp aproximadamente; el cuarto carril (d) corresponde a la muestra de un macho, con dos fragmentos de 439 bp y 621 bp aproximadamente.

**ANEXO C: SECUENCIAS DE CADA MICROSATÉLITE UTILIZADO CON
SUS RESPECTIVOS FLUORÓFOROS**

Primer	Secuencia del primer (5' → 3')	Fluoróforo
Ev1F	CCCTGCTCCCCATTCTC	NED
Ev1R	ATAAACTCTAATACACTTCCTCCAAC	
Ev14F	TAA ACATCAAAGCAG ACCCC	VIC
Ev14R	CCAGAGCCAAGGTCAAGAG	
Ev94F	ATCCTA'ITGGTCCITITCTGC	FAM
Ev94R	AATAGATAGTGATGATGARCACACC	
Ev96F	AATGCCTGAAAAGGCCTGAAGG	FAM
Ev96R	TCTTGACCACTCAATTCTTGCCC	
GT23F	GTTCCCAGGCTCTGCACTCTG	VIC
GT23R	CATTCCTACCCACCTGTCAT	
rw4-10F	ATGGCATTACTTCATTCTTT	VIC
rw4-10R	GCCAAACTTACCAAATTGTG	

**ANEXO D: PROTOCOLOS DE PCR DESARROLLADOS PARA LA
AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES**

Locus	Concentración final de reacciones PCR
Ev1	1x Buffer, 4 mM MgCl ₂ , 0,2 mM dNTP's, 0,15 uM Primer forward + extremo M13, 0,4 uM Primer reverse, 0,5 uM Primer M13 + fluoróforo, 1 U/μL Taq polimerasa y 2 μL ADN
Ev14	1x Buffer, 2,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM dNTP's, 0,15 uM Primer forward + extremo M13, 0,4 uM Primer reverse, 0,5 uM Primer M13 + fluoróforo, 1 U/μL Taq polimerasa y 2 μL ADN
Ev94	1x Buffer, 2,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM dNTP's, 0,15 uM Primer forward + extremo M13, 0,4 uM Primer reverse, 0,5 uM Primer M13 + fluoróforo, 1 U/μL Taq polimerasa y 2 μL ADN
Ev96	1x Buffer, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM dNTP's, 0,15 uM Primer forward + extremo M13, 0,15 uM Primer reverse, 0,4 uM Primer M13 + fluoróforo, 1 U/μL Taq polimerasa y 2 μL ADN
GT23	1x Buffer, 2,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM dNTP's, 0,15 uM Primer forward + extremo M13, 0,4 uM Primer reverse, 0,5 uM Primer M13 + fluoróforo, 1 U/μL Taq polimerasa y 2 μL ADN
rw4-10	1x Buffer, 3 mM MgCl ₂ , 0,2 mM dNTP's, 0,15 uM Primer forward + extremo M13, 0,4 uM Primer reverse, 0,5 uM Primer M13 + fluoróforo, 1 U/μL Taq polimerasa y 2 μL ADN

**ANEXO E: PERFILES DE TERMOCICLADOR DESARROLLADOS PARA LA
AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES**

Locus	Ciclo de temperaturas
Ev1	94 °C por 3 min; (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s) x35; 72 °C 10 min
Ev14	94 °C por 3 min; (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s) x35; 72 °C 30 min
Ev94	94 °C por 3 min; (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s) x35; 72 °C 30 min
Ev96	94 °C por 3 min; (94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 40 s) x35; 72 °C 30 min
GT23	94 °C por 3 min; (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s) x35; 72 °C 30 min
rw4-10	94 °C por 3 min; (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s) x35; 72 °C 10 min