

## Analysis of the site fidelity between male and female humpback whales, visiting the Esmeraldas coasts (Ecuador)

## Análisis de la fidelidad de sitio entre machos y hembras de ballenas jorobadas que visitan las costas de Esmeraldas (Ecuador)

Karla Rojas<sup>1</sup>, Judith Denkinger<sup>2</sup>, Venancio Arahana<sup>1</sup>, Denisse Dalgo<sup>1</sup> y María de Lourdes Torres<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad San Francisco de Quito USFQ, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Campus Cumbayá, Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

<sup>2</sup>Universidad San Francisco de Quito USFQ, extensión USFQ Galápagos, Galápagos Science Center, Isla San Cristóbal, Galápagos, Ecuador.

\*Autor principal/Corresponding author, e-mail: ltorres@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 05/03/2014. Aceptado/Accepted: 09/04/2014.

Publicado en línea/Published on Web: 13/06/2014. Impreso/Printed: 13/06/2014.

### Abstract

Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) migrate across the world's oceans from feeding grounds in polar waters in high latitudes to breeding grounds in tropical waters. Although this species is predictable in its areas of occurrence, there are several poorly understood aspects of its migration patterns. This study aims to evaluate the differences between site fidelity of male and female humpback whales off the coast of Esmeraldas (Ecuador) for the years 2010, 2011 and 2012. A total of 57 whale skin samples were obtained using a biopsy system. For sex determination, primers SFY1204 and SFY0097 were used. A variable section of the mitochondrial DNA control region (D-loop) was amplified by PCR and sequenced to identify haplotypes. Of the humpback whale samples analyzed, it was found that 12 corresponded to females and 44 to males, and a total of 23 different haplotypes were identified. Molecular variance analysis (AMOVA) showed that males had higher site fidelity, although a significant difference was found in the haplotype frequency and nucleotide composition between males within the 2010 and 2011 seasons. These differences were not found within the seasons of 2010-2012 and 2011-2012, which can be attributed to the fact that samples of 2010 were collected in August, when males are in resident groups, while samples of 2011 were collected in July when most males can be in transit to breeding areas further north in Costa Rica and Panama. In addition, females showed no significant differences in haplotype frequency and nucleotide composition, although between female humpback whales of the 2010 and 2012 seasons, only one haplotype was shared. These results may be due to the relatively small number of female samples. These findings may suggest that although male humpback whales disperse in the tropical breeding ground from Southern Ecuador to Northern Costa Rica, they return each year to their native breeding ground. On the other hand, females probably remain in feeding sites during alternate years, to recover from the energy expenditure of gestation and lactation.

**Keywords.** Humpback whale, mitochondrial DNA (mtDNA), reproduction areas, site fidelity.

### Resumen

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) migra en todos los océanos del mundo desde sus zonas de alimentación en aguas polares a zonas de reproducción en aguas tropicales. Aunque esta especie es predecible en sus áreas de ocurrencia, son aún poco conocidos varios aspectos de la migración de la ballena jorobada. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las diferencias de fidelidad de sitio entre machos y hembras de ballenas jorobadas que visitaron las costas de Esmeraldas (Ecuador) durante las temporadas 2010, 2011 y 2012. Un total de 57 muestras de piel de ballena se obtuvieron mediante un sistema de toma de biopsias. Para la determinación del sexo se utilizó los primers SFY1204 y SFY0097. Una sección variable de la región control del ADN mitocondrial (D-loop) se amplificó mediante PCR y secuenció para analizar los haplotipos presentes. De las muestras de ballenas jorobadas analizadas se determinó que 12 correspondieron a hembras y 44 a machos, y se identificó un total de 23 haplotipos diferentes. Al realizar un análisis de varianza molecular (AMOVA), se encontró que los machos presentaban una mayor fidelidad de sitio, a pesar de una diferencia notable en la frecuencia de haplotipos y composición de nucleótidos entre machos de las temporadas 2010 y 2011. Esta diferencia no se encontró entre las temporadas 2010 - 2012 ni 2011 - 2012, posiblemente porque las muestras del 2010 fueron recolectadas en Agosto, cuando los machos se quedan en grupos residentes, mientras que las muestras del 2011 fueron recolectados en Julio cuando la mayoría de machos están en tránsito hacia áreas de reproducción en el norte como Panamá y Costa Rica. Las hembras no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de haplotipos y composición de nucleótidos, a pesar de que en las hembras de las temporadas 2010 y 2012 se compartió un solo haplotipo. Estos resultados, pueden deberse al limitado número de muestras de ballenas jorobadas hembras. Estos hallazgos pueden sugerir que a pesar de que las ballenas jorobadas machos se dispersan desde las zonas de reproducción al sur del Ecuador hasta el norte de Costa Rica, regresan cada año a su zona de reproducción originaria. Por otro lado, las hembras posiblemente permanecen en años alternos en los sitios de alimentación para recuperarse de los gastos energéticos de la gestación y lactancia.

**Palabras Clave.** Ballena jorobada, ADN mitocondrial (DNAm), zonas de reproducción, fidelidad de sitio.

## Introducción

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) vive en las tres principales cuencas oceánicas: Océano Austral, Atlántico Norte y Pacífico Norte [1–3]. Según las conexiones migratorias entre las zonas de distribución invernal y de verano, cada población se divide en subpoblaciones [4]. Durante la época de reproducción, en invierno, las ballenas jorobadas permanecen en regiones tropicales y subtropicales, mientras que en la época de alimentación, durante el verano, permanecen en zonas de latitudes altas [5].

La fidelidad hacia las áreas de alimentación es dirigida maternalmente, ya que las madres les enseñan las rutas migratorias a sus crías durante el primer año de vida, luego de lo cual, los ballenatos regresan por sí mismos a las áreas de alimentación maternas [5, 6]. Por otro lado, en estudios realizados con ADN mitocondrial, se encontró que la fidelidad dirigida maternalmente a las zonas de alimentación y rutas migratorias es una de las posibles razones por las cuales se han mantenido hasta la actualidad las estructuras poblacionales de las ballenas jorobadas [7–9].

El flujo migratorio de las ballenas jorobadas se da por la sincronización de movimiento de hembras adultas según su estado reproductivo [10]. Este patrón migratorio parece influir en el éxito reproductivo de la especie. Las hembras pueden aumentar su éxito reproductivo, maximizando el tiempo empleado en la alimentación en latitudes altas, de tal manera que se puedan cubrir los costos energéticos de la gestación y lactancia [11]. En algunas poblaciones, los machos constituyen la mayoría de los animales migratorios, lo que indica que las hembras no migran cada año [10, 11]. Según Opzeeland *et al.* (2013) [12], ballenas jorobadas en la Península Antártica, específicamente al sur del Mar de Weddell, se quedan invernando en esta zona, en vez de completar su ciclo migratorio anual hacia el área de reproducción en la costa de África Occidental.

Las ballenas jorobadas visitan las costas ecuatorianas entre finales de Mayo y Octubre con picos de abundancia en los meses de Julio y Agosto [13–15]. La mayoría de los ballenatos nace a mediados de Agosto, y a partir de entonces las madres comienzan a buscar zonas de poca profundidad [15]. Por esta razón cuando las madres con crías comienzan su viaje a la Antártida al final de la temporada de reproducción (fines de septiembre y octubre), lo hacen bordeando la costa y es posible observarlas en muchos sitios desde la orilla [16].

En el sur y centro de Ecuador, las ballenas jorobadas muestran una fidelidad de sitio muy baja [13, 16–18]. Sin embargo en el área de reproducción de Esmeraldas y el Parque Nacional Machalilla, existe una tasa anual de retorno promedio de 49 %, lo cual demuestra una alta fidelidad de sitio [19].

El presente estudio tuvo como objetivo determinar las diferencias de fidelidad de sitio entre machos y hembras de ballenas jorobadas en las costas de Esmeraldas

(Ecuador), durante las temporadas 2010, 2011 y 2012, mediante el análisis de la región control del ADN mitocondrial (D-loop).

## Materiales y Métodos

### Área de estudio y recolección de muestras

La recolección de muestras se realizó en Agosto del 2010, Julio del 2011, y entre Julio y Agosto del 2012, en los Bajos de Atacames en la provincia de Esmeraldas (Figura 1). Esta área de reproducción se extiende desde la desembocadura del río Esmeraldas (N 0°59'54,1"–W 79°38'37,7"), hasta la desembocadura del río Muisne (N 0°37'3,9"- W 80°02'01,9"), donde la temperatura promedio del agua de mar es de 26°C [20]. Los análisis moleculares fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito.

Se recolectaron muestras de piel de 20 individuos en Agosto del 2010, 15 individuos en Julio del 2011 y 22 individuos entre Julio y Agosto del 2012, utilizando el sistema de biopsias Paxarm [21]. A fin de incrementar la representación de las hembras para la temporada 2012, el muestreo se centró al animal nuclear (hembra) en grupos competitivos. Para evitar duplicados, los individuos fueron foto- identificados. Las muestras fueron almacenadas en tubos eppendorf con etanol al 70 % a -20°C para su preservación a largo plazo.

### Determinación del sexo de las ballenas jorobadas por métodos moleculares

Se extrajo ADN genómico siguiendo el protocolo de Kieleczawa (2006) [22]. La amplificación de las regiones ZFY/ZFX del genoma de ballenas jorobadas se hizo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [23], usando los primers: SFY1204 (5' CATTATGTGCTGGTTCTTTCTG-3') y SFY0097 (5' CATCCTTTGACTGTCTATCCTTG-3') [24]. El producto amplificado fue digerido con la enzima Taq I, que generó fragmentos de 439 pares de bases (pb) para las hembras y de 439 pb y 621 pb para los machos [24].

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

A partir del ADN extraído, se amplificó un fragmento de aproximadamente 500 pb de longitud de la región control del ADN mitocondrial mediante PCR, utilizando los primers: t-Pro-whale Dlp1.5 (5' TCACCCAAAGCTGRARTTCTA-3') y Dlp8 (5' CCATCGWGATGTCTTATTAAAGRGGAA-3') [25–27]. Los productos de PCR fueron enviados a Functional Biosciences, Inc. (Madison EE.UU.), donde fueron limpiados utilizando el protocolo de Exo/Sap (Affymetrix, Inc.) y secuenciados en ambas direcciones con un secuenciador de ADN ABI 3730xl.

Las secuencias amplificadas por el primer DIP 1.5 (light strand) fueron editadas y alineadas manualmente con el

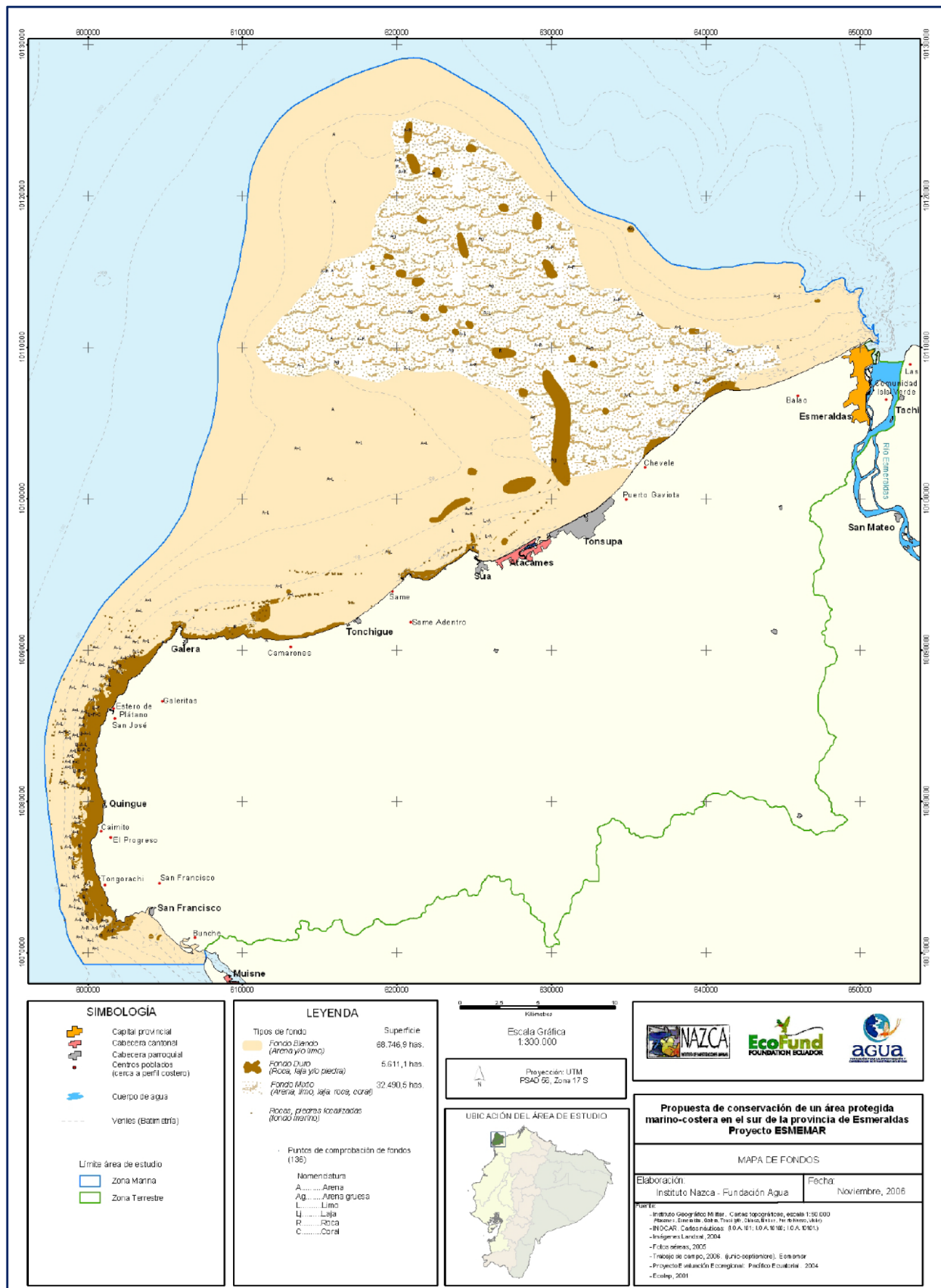


Figura 1: Mapa del área de estudio en “Bajos de Atacame” ubicado en la provincia de Esmeraldas, Ecuador. La línea azul representa los límites del área de estudio [47].

programa Mega 5 [28]. Luego fueron recortadas a 469 pb, comenzando desde la posición 6 de la secuencia referencial de la región control de la ballena jorobada (número de accesoión X72202), con el fin de coincidir con una región consenso analizada en estudios previos como el de Olavarría *et al.* (2006, 2007), Félix *et al.* (2012) y Dalgo (2013) [25, 26, 29, 30]. Con las secuencias recortadas se realizó una búsqueda en el GenBank con la opción Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) proporcionada por la página web del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). Se seleccionó el algoritmo megablast para secuencias muy similares, con el fin de identificar los haplotipos presentes en las secuencias de las ballenas jorobadas de este estudio.

### Análisis estadísticos

La estratificación por sexo y años se realizó usando un análisis de varianza molecular implementado en el programa Arlequin 3.5 [31]. Con esta opción se calcularon las diferencias en las frecuencias de haplotipos (FST) y la diferenciación de nucleótidos ( $\Phi$ ST). La significancia de los valores obtenidos se comprobó usando 5000 permutaciones aleatorias de la matriz de datos.

## Resultados y Discusión

### Relación machos/hembras

De las 57 muestras de piel de ballenas jorobadas que se analizaron, 12 fueron de hembras, 44 de machos y en 1 muestra no se pudo identificar el sexo, debido a la poca cantidad de ADN disponible. La proporción de sexos fue de 3,7:1 (machos: hembras) ( $\chi^2 = 18,28$   $p < 0,001$ ).

Como se ha reportado anteriormente para otras áreas de reproducción de las ballenas jorobadas, la proporción de sexos en este estudio fue sesgada hacia los machos (Tabla 1) [25, 26, 32, 33]. Debido a que la conformación y estructura del sistema de apareamiento de las ballenas jorobadas se basa en que varios machos adultos compiten por el acceso sexual a una sola hembra madura, es más fácil obtener muestras de machos que de hembras [34].

Existen diferentes patrones temporales y espaciales de migración entre hembras y machos de ballenas jorobadas [33]. En un estudio realizado por Brown *et al.* (1995) [32], se encontró que alrededor de 50 % de las hembras de la Zona Antártica V no migraban a sus zonas de reproducción cada año. Por lo que se sugiere que ciertas hembras permanecen en las zonas de alimentación durante todo el invierno. Se han observado ballenas jorobadas en zonas de alimentación durante el invierno en el Golfo de Maine [35] y en el norte de la Patagonia [36]. Puede ser ventajoso para algunas hembras no realizar este largo viaje a las zonas de reproducción, debido a los costos energéticos de la gestación y la lactancia añadido a la migración. De esta manera, algunas hembras optan por realizar la migración en años alternos para recuperarse de los costos energéticos de la reproduc-

ción. Además, las hembras inmaduras pueden maximizar su crecimiento, permaneciendo en las áreas de alimentación de la Antártida durante todo el año [32]. Por el contrario, los machos exhiben una mayor dispersión en cuanto a sus áreas de reproducción, ya que tratan de maximizar sus oportunidades de apareamiento. Por esta razón, es más común encontrar a machos en diferentes zonas de reproducción lejanas a sus zonas originarias de apareamiento [7, 11, 32, 33, 37–40]. Por ejemplo, en un estudio por Craig & Herman (2000) [41], los machos tendían a moverse más entre las diferentes islas de Hawaii mientras que las hembras preferían quedarse en una misma isla durante todo el período de reproducción.

Se ha reportado la predominancia de los machos entre las ballenas que migran [32, 33]. Por ejemplo, Brown *et al.* (1995) [32] encontraron una proporción de sexos 2,6:1 (machos: hembras) en la migración hacia la zona de reproducción del este de Australia. De esta manera, si algunas hembras se quedan en las áreas de alimentación, esto puede explicar por qué más machos son muestreados en las zonas de reproducción en los primeros meses del período de reproducción [33].

### Fidelidad de sitio por años y sexo

Se realizó una comparación de la composición de haplotipos por sexo y años para comprender si existe diferencia en los patrones migratorios entre machos y hembras de ballenas jorobadas que visitan las costas de Esmeraldas (Ecuador). Para las hembras se encontraron 2 haplotipos diferentes en 2010, 2 en el 2011 y 7 para el 2012, mientras que en los machos se encontraron 10 haplotipos diferentes para el 2010, 6 para el 2011 y 10 en el 2012 (Tabla 2).

La mayoría de los haplotipos encontrados en las hembras estaban también presentes entre los haplotipos de los machos (SP1, SP14, SP25, SP32, SP50, SP90 SP98). Sin embargo, algunos haplotipos estuvieron más representados en machos que en hembras. Por ejemplo, los haplotipos SP90 y SP32 fueron más comunes en machos que en hembras con 88,9 y 50 % respectivamente.

En diferentes estudios realizados en el Ecuador, se ha encontrado que algunas ballenas jorobadas no se quedan durante todo el período de reproducción en la misma área. Scheidat *et al.* (2000) [14] encontró, en el Parque Nacional Machalilla, que varias ballenas pasan solo hasta 5 días en la misma zona y que sólo alrededor del 10 % de ellas se quedan más de 2 semanas. Por lo que se sugirió que varios individuos sólo están en tránsito en esta región. En otro estudio realizado por Félix & Haase (2001) [17], en la misma zona, a pesar de tener pocos avistamientos interanuales, los mismos mostraban sincronía, por lo que se sugirió que había un uso cíclico mas no residente por parte de algunas ballenas jorobadas que visitan las costas ecuatorianas. Sin embargo Gladek *et al.* (2013) [19], determinaron que en las áreas de reproducción de Esmeraldas y el Parque Nacional Machalilla el 31,84 % de las ballenas son reavistadas

Referencia	Sitio de recolección de muestras	Individuos muestreados	Machos	Hembras	Sexo sin determinar	Proporción
Brown et al. 1995	Australia Este	180	127	53	0	2.4 : 1
Olavarría et al. 2007	Aus O, NC, PF, Tg, IC, Col	1112	705	361	46	1.9 : 1
Valsecchi et al. 2010	Australia Este	135	91	44	0	2.1 : 1
Félix et al. 2012	Santa Elena - Ecuador	103	66	25	12	2.6 : 1
Proyecto Cetacea USFQ	Esmeraldas - Ecuador	57	44	12	1	3.7 : 1

Tabla 1: Cuadro resumen de la proporción de sexos encontrada en diferentes estudios de ballenas jorobadas realizados en el Hemisferio Sur. Aus O= Australia Oeste, NC= Nueva Caledonia, PF= Polinesia Francesa, Tg= Tonga, IC= Islas Cook, Col= Colombia.

Haplotipo	Hembras				Machos				Sexo sin identificar	Total N (machos & hembras)
	Agosto 2010	Julio 2011	Julio y Agosto 2012	2010, 2011 y 2012	Agosto 2010	Julio 2011	Julio y Agosto 2012	2010, 2011 y 2012		
SP1		1		1		1	1	2		3
SP6				0			1	1		1
SP8				0	1			1		1
SP10				0	2			2		2
SP14			1	1		2		2		3
SP25		1		1	1			1		2
SP32			2	2	2	2		4	1	7
SP33				0			1	1		1
SP43				0			1	1		1
SP50	1			1			1	1		2
SP52				0	1		1	2		2
SP60			1	1						1
SP62				0	5		1	6		6
SP63				0			2	2		2
SP66			1	1						1
SP68	1		1	2						2
SP73				0	3			3		3
SP89				0	1			1		1
SP90			1	1	1	5	3	9		10
SP98			1	1		2		2		3
SP100				0			1	1		1
Mno03Ma02				0	1			1		1
Nuevo033				0		1		1		1
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>44</b>		<b>57</b>

Tabla 2: Haplotipos de las ballenas jorobadas de la costa de Esmeraldas para las temporadas 2010, 2011 y 2012. La frecuencia de cada haplotipo (ADNmt) se muestra por sexo y año. La N corresponde al total de individuos (machos y hembras) de cada haplotipo.

más de una vez, mientras que 68,16 % de las ballenas jorobadas han sido observadas una sola vez, sugiriendo que la mayor cantidad de ballenas están en tránsito por esta área de reproducción.

Al comparar los haplotipos entre los machos, se encontró que entre los machos del 2010 y 2011 se compartieron 2 haplotipos (SP32 y SP90), mientras que entre los del 2010 y 2012 se compartieron 3 haplotipos (SP52, SP62 y SP90), y finalmente para los machos del 2011 y 2012 se compartieron 2 haplotipos (SP1 y SP90). Al realizar el AMOVA, se encontraron diferencias significativas tanto en la frecuencia de haplotipos así como la composición de nucleótidos sólo entre los machos del 2010 con los del 2011 (FST= 0.0969, ΦST= 0.0969, p=0.0230) (Tablas 3 y 4). Las diferencias encontradas

tanto en la frecuencia de haplotipos así como la composición de nucleótidos para los años de estudio del 2010 y 2011, pueden deberse principalmente a que las muestras del 2010 fueron recolectadas en Agosto, cuando los machos ya no están en tránsito y se quedan como grupos residentes [17]. Mientras que las muestras del 2011 fueron tomadas en Julio, cuando la mayoría de machos posiblemente se encontraban aún en tránsito hacia las áreas de reproducción en el norte como Colombia, Panamá y Costa Rica [42]. Según Félix et al. (2009) [43], 4 individuos registrados en Ecuador en 4 años diferentes (1996, 2002, 2005 y 2008) fueron avistados en Costa Rica-Panamá en el 2007 y sugiere que están en tránsito [26, 44].

Ninguno de los haplotipos de las hembras del 2010 es-

	H 2010		H 2011		
	Fst	valor-p	Fst	valor-p	
H 2011	0.0000	0.6667 ± 0.0061			
H 2012	-0.0002	0.5578 ± 0.0073	-0.1800	0.8675 ± 0.0053	
		M 2010		M 2011	
M 2011	0.0969	0.0240 ± 0.0021			
M 2012	0.0093	0.3053 ± 0.0056	0.0432	0.1238 ± 0.0046	

Tabla 3: Valores del análisis de varianza molecular entre años y por sexo, se muestra la diferencia a nivel de frecuencias de haplotipos (FST), así como la significancia estadística (p). La significancia de los valores obtenidos se comprobó usando 5000 permutaciones aleatorias de la matriz de datos. La M corresponde a machos y la H a hembras.

	H 2010		H 2011		
	Φst	valor-p	Φst	valor-p	
H 2011	0.0000	0.6760			
H 2012	-0.0002	0.5470	-0.1800	0.8611	
		M 2010		M 2011	
M 2011	0.0969	0.0230			
M 2012	0.0093	0.3052	0.0432	0.1276	

Tabla 4: Valores del análisis de varianza molecular entre años y por sexo, se muestra la diferencia a nivel de la composición de nucleótidos (Φst), así como la significancia estadística (p). La significancia de los valores obtenidos se comprobó usando 5000 permutaciones aleatorias de la matriz de datos. La M corresponde a machos y la H a hembras.

tuvo presente en los haplotipos de las hembras del 2011, lo cual se repitió en la comparación de las hembras del 2011 y 2012. Las hembras del 2010 y 2012 compartieron un haplotipo (SP68). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los valores de FST y Φst entre los diferentes años de estudio (AMOVA, Tablas 3 y 4), posiblemente debido a las pocas muestras de hembras en los primeros años de estudio (2010 y 2011). Al comparar los haplotipos correspondientes para cada año usando el software Arlequin, no se encontró diferencias, debido a que los mismos difieren principalmente en uno o dos nucleótidos [45], y a que el programa toma en cuenta la frecuencia con la que se presenta cada haplotipo para comparar las poblaciones correspondientes y en el presente estudio, la frecuencia fue igual a 1.

En la Península de Santa Elena, Ecuador, en estudios similares se encontró que entre los años del 2006, 2007 y 2008 las diferencias más altas tanto en la frecuencia de haplotipos así como la composición de nucleótidos fueron entre las hembras, mientras que los machos compartieron la mayoría de haplotipos y sus frecuencias por lo que mostraron diferencias menores [26]. En un estudio realizado en el Atlántico Sudeste y Océano Índico, se sugirió que debido al reducido número de muestras de hembras, los haplotipos más comunes aumentan en frecuencia, reduciendo el número de haplotipos raros o poco frecuentes, lo que resulta en distancias significativamente más bajas entre los haplotipos disponibles [46]. Lo reportado en el estudio de Rosenbaum *et al.* (2006) [46] es similar a lo encontrado en esta investigación.

En conclusión, se encontró que las ballenas jorobadas macho mostraron mayor fidelidad de sitio que las hembras, aunque se propone que varios individuos pueden estar en tránsito hacia las áreas de reproducción más hacia el norte en Panamá y Costa Rica. Por otro lado, las pocas diferencias en la frecuencia de haplotipos y composición de nucleótidos al comparar las muestras de

hembras pueden deberse al limitado número de muestras. Para futuros estudios de fidelidad de sitio y proporción de individuos por sexo y año, se deberían tomar un número equitativo de muestras tanto de machos como de hembras entre los diferentes años y en la misma temporada para poder entender claramente cuál es el comportamiento de los individuos de ambos sexos.

[47]

### Agradecimientos

Este estudio fue realizado como parte del proyecto CE-TACEA, Ecuador. Queremos agradecer a Javier Oña, Ljudmila Gladek, y nuestros voluntarios por las observaciones en el campo. A nuestro capitán Jose Mojarrango por hacer posible el exitoso muestreo y a la Hosteria El Acantilado por darnos hospedaje. Un especial agradecimiento a Gabriel Muñoz por su apoyo en la identificación de sexo de ballenas de las temporadas 2010 y 2011, y a Bernardo Gutiérrez por revisiones en el manuscrito. El proyecto fue financiado por la Universidad San Francisco de Quito USFQ (Ecuador)-Galápagos Academic Institute for the Arts and Sciences (GAIAS) (2010, 2011, 2012 Grants) y el Rufford Grant 2011 de Javier Oña.

### Referencias

- [1] 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.
- [2] Baker, C.; Perry, A.; Bannister, J.; Weinrich, M.; Abernethy, R.; Calambokidis, J.; Lien, J.; Lambertsen, R.;

- Vasquez, O.; Clapham, P.; Alling, A.; O'Brien, S.; Palumbi, S. 1993. "Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8239 – 8243.
- [3] González, L. 2002. "Programa de acción para la conservación de especies: ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*)". *Universidad Nacional Autónoma de México. Coyoacán, México*: 60.
- [4] Baker, C.; L., H.; Perry, A.; Lawton, W.; Straley, J.; Wolman, A.; Kaufman, G.; Winn, H.; Hall, J.; Reinke, J.; Ostman, J. 1986. "Migratory movement and population structure of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the central and eastern North Pacific". *Marine Ecology Progress Series*, 31:105 – 119.
- [5] Baker, C.; Perry, A.; L., H. 1987. "Reproductive histories of female humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the North Pacific". *Marine Ecology Progress Series*, 41:103 – 114.
- [6] Olavarría, C. 2008. "Population structure of Southern Hemisphere humpback whales". *PhD Thesis. The University of Auckland. New Zealand*.
- [7] Pomilla, C.; Rosenbaum, H. 2005. "Against the current: an inter-oceanic whale migration event". *Biol. Lett.*, 1: 476 – 479.
- [8] Baker, C.; Clapham, P. 2004. "Modelling the past and future of whales and whaling". *Trends in Ecology and Evolution*, 19:365 – 371.
- [9] Baker, C.; Palumbi, S.; Lambertsemm, R.; Weinrichj, M.; Calambokidis, J.; OŠBrien, S. 1990. "The influence of seasonal migration on the distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales". *Nature*, 344:238 – 240.
- [10] Stevick, P.; Neves, M.; Johansen, F.; Engel, M.; Allen, J.; Marcondes, M.; Carlson, C. 2010. "A quarter of a world away: female humpback whale moves 10 000 km between breeding areas". *Biol. Lett.*, 7:299 – 302.
- [11] 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.
- [12] Opzeeland, I.; Parijs, S.; Kindermann, L.; Burkhardt, E.; Boebel, O. 2013. "Calling in the Cold: Pervasive Acoustic Presence of Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*) in Antarctic Coastal Waters". *PLoS ONE*, 8:1 – 7.
- [13] 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, Yaqu Pacha*.
- [14] Scheidat, M.; C., C.; Denkinge, J.; González, J.; Adlung, D. 2000. "A breeding area for humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) off Ecuador". *J. Cetacean Res. Manage*, 2(3):165 – 171.
- [15] Félix, F.; Haase, B. 2005. "Distribution of humpback whales along the coast of Ecuador and management implications". *J. Cetacean Res. Manage*, 7(1):21 – 31.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Félix, F.; Haase, B. 1998. "La investigación de la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) alrededor de la isla de la Plata, Manabí, durante 1995". *Acta Oceanográfica del Pacífico. INOCAR, Ecuador*, 9(1).
- [19] Gladek, L. 2013. "Abundance and site fidelity of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) population in Esmeraldas, Ecuador". *Tesis de Maestría. University of Kiel/Universidad San Francisco de Quito*.
- [20] Fernández, S. 2009. "Preferencia de Hábitat de la Ballena Jorobada (*Megaptera novaeangliae*) en la costa de Esmeraldas, Ecuador". *Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito*.
- [21] Krützen, M.; Barré, L.; Möller, L.; Heithaus, M.; Simms, C.; Shenrin, W. 2002. "A biopsy system for small cetaceans: darling success and wound healing in lursiopsspp". *Marine Mammal Science*, 18:863 – 878.
- [22] Kieleczawa, J. 2006. "DNA sequencing II: optimizing, preparation and cleanup". *Ontario: Jones and Bartlett Publishers*: 49 – 53.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Olavarría, C.; Baker, C.; Garrigue, C.; Poole, M.; Hauser, N.; Caballero, S.; Florez-González, 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". *MarEcolProgSer*, 330:257 – 268.
- [26] Félix, F.; Caballero, S.; Olavarría, 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.
- [27] Baker, C.; Flórez-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(4):721 – 737.



- [28] 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.
- [29] Olavarria, C.; Aguayo, A.; Acevedo, J.; Medrano, L.; Thiele, D.; Baker, C. 2006. "Genetic differentiation between two feeding areas of the Eastern South Pacific humpback whale population". *Update on SC/57/SH3, Report SC/A06/HW29*.
- [30] 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*.
- [31] Excoffier, L.; Lischer, L. 2010. "Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows". *Molecular Ecology Resources*, 10:564 – 567.
- [32] Brown, M.; Corkeron, P.; Hale, P.; Schultz, K.; Bryden, M. 1995. "Evidence for a Sex-Segregated Migration in the Humpback Whale (*Megaptera novaeangliae*)". *Proc. R. Soc. Lond. B*: 259.
- [33] 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*, 398:275 – 286.
- [34] Clapham, P. 2000. "The Humpback whale: Seasonal feeding and breeding in a baleen whale. Cetacean Societies: Field studies of dolphins and whales". *University of Chicago Press*, 7:173 – 196.
- [35] Clapham, P. 1996. "The social and reproductive biology of Humpback Whales: an ecological perspective". *Mammal Review*, 26:27 – 49.
- [36] Hucke-Gaetea, B.; Harob, B.; Torres-Florez, J.; Montecinos, Y.; Viddia, F.; Bedriñana-Romano, I.; Neryb, M.; Ruiz, D. 2013. "A historical feeding ground for humpback whales in the Eastern South Pacific revisited: the case of northern Patagonia, Chile". *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst. Update on SC/65a/Forinfo01*.
- [37] Stevick, P.; Allen, J.; Berube, M.; Clapham, P.; Katona, S.; Larsen, F.; Lien, J.; Mattila, D.; Palsboll, P.; Robbins, J.; Sigurjonsson, J.; Smith, T.; Oien, N.; Hammond, P. 2003. "Segregation of migration by feeding ground origin in North Atlantic humpback whales (*Megaptera novaeangliae*)". *J. Zool. Lond*, 259:231 – 237.
- [38] Acevedo, J.; 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*, 41:11 – 19.
- [39] Stevick, P.; Allen, J.; Engel, M.; Felix, F.; Haase, B.; Neves, M. 2011. "First record of inter-oceanic movement of a humpback whale between Atlantic and Pacific breeding grounds off South America". *Updated:SC/63/SH4*: 5.
- [40] 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*, 75:1923 – 1933.
- [41] Craig, A.; Herman, L. 2000. "Habitat preferences of female humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the Hawaiian Islands are associated with reproductive status". *Marine Ecology Progress series*, 193:209 – 216.
- [42] Palacios-Alfaro, J.; Martínez-Fernández, D.; Sánchez-Godínez, C.; Venegas-Li, R. 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*: 8.
- [43] Félix, F.; Rasmussen, K.; Garita, F.; Haase, B.; 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*.
- [44] Acevedo, J.; Rasmussen, K.; Félix, F.; Castro, C.; Llano, M.; Secchi, E.; Saborio, M.; Aguayo-Lobo, A.; Haase, B.; Scheidat, M.; Dalla-Rosa, L.; Olavarria, C.; Forestell, P.; Acuña, P.; Kaufman, G.; Pastene, L. 2007. "Migratory destination of humpback whales from the Magellan Strait feeding ground, Southeast Pacific". *Marine Mammal Science*, 23:453 – 463.
- [45] Shane, S. 2005. "Shane's Simple Guide to F-statistics". *University of Auckland*: 21.
- [46] 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.; Nguesso, S.; Vely, M.; Kiszka, J. 2009. "Population Structure of Humpback Whales from Their Breeding Grounds in the South Atlantic and Indian Oceans". *PLoS ONE*, 4:1 – 11.
- [47] Denkinger, J.; Suárez, C.; Franco, A.; Riebenschahm, D. 2006. "Informe Final Componente Marino". *Proyecto Esmemar*.