



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA  
INDOAMÉRICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS**

**TEMA:**

---

**FIDELIDAD DE SITIO DE REPRODUCCIÓN DE BALLENAS JROBADAS EN LAS  
COSTAS ECUATORIANAS**

---

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos

**Autor(a)**

Mena Oña Dennys Liliana

**Tutor(a)**

PhD. Bonaccorso Sánchez Elisa Angélica

QUITO – ECUADOR

2021

## **AUTORIZACIÓN POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL, Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TRABAJO DE TÍTULACIÓN**

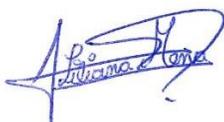
Yo, Mena Oña Dennys Liliana, declaro ser autora del Trabajo de Investigación con el nombre “FIDELIDAD DE SITIO DE REPRODUCCIÓN DE BALLENAS JOROBADAS EN LAS COSTAS ECUATORIANAS”, como requisito para optar al grado de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos y autorizo al Sistema de Bibliotecas de la Universidad Tecnológica Indoamérica, para que con fines netamente académicos divulgue esta obra a través del Repositorio Digital Institucional (RDI-UTI).

Los usuarios del RDI-UTI podrán consultar el contenido de este trabajo en las redes de información del país y del exterior, con las cuales la Universidad tenga convenios. La Universidad Tecnológica Indoamérica no se hace responsable por el plagio o copia del contenido parcial o total de este trabajo.

Del mismo modo, acepto que los Derechos de Autor, Morales y Patrimoniales, sobre esta obra, serán compartidos entre mi persona y la Universidad Tecnológica Indoamérica, y que no tramitaré la publicación de esta obra en ningún otro medio, sin autorización expresa de la misma. En caso de que exista el potencial de generación de beneficios económicos o patentes, producto de este trabajo, acepto que se deberán firmar convenios específicos adicionales, donde se acuerden los términos de adjudicación de dichos beneficios.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Quito, a los 8 días del mes de febrero de 2021, firmo conforme:

Autor: Liliana Mena



Firma:

Número de Cédula: 1727163188

Dirección: Pichincha, Quito, La Magdalena.

Correo electrónico: dennys.lili@outlook.com

Teléfono: 0983209913

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En mi calidad de Tutora del Trabajo de Titulación “FIDELIDAD DE SITIO DE REPRODUCCIÓN DE BALLENAS JOROBADAS EN LAS COSTAS ECUATORIANAS” presentado por Dennys Liliana Mena Oña, para optar por el Título de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos.

### **CERTIFICO**

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Quito, 8 de febrero de 2021



Elisa Angélica Bonaccorso Sánchez, PhD.

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Quien suscribe, declaro que los contenidos y los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, como requerimiento previo para la obtención del Título de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos, son absolutamente originales, auténticos y personales y de exclusiva responsabilidad legal y académica del autor.

Quito, 8 de febrero de 2021



Dennys Liliana Mena Oña  
1727163188

## APROBACIÓN LECTORES

El trabajo de Integración Curricular ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, sobre el Tema: FIDELIDAD DE SITIO DE REPRODUCCIÓN DE BALLENAS JOROBADAS EN LAS COSTAS ECUATORIANAS, previo a la obtención del Título de Ingeniera en Biodiversidad y Recursos Genéticos, reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la sustentación del trabajo de titulación.

Quito, 18 de febrero de 2021

Dr. David Salazar



Lector 1

Dra. Mónica Páez



Lector 2

## **DEDICATORIA**

A mis padres, abuelos y hermana.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de una manera especial a Elisa por la paciencia, tiempo y conocimientos transmitidos, por brindarme su apoyo, valiosos consejos y comentarios a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A Nora y profesores de la carrera por ayudarme a lo largo de mi aprendizaje con su conocimiento y dedicación.

Finalmente, quiero agradecer a mis padres, abuelos y hermana por su amor y apoyo incondicional.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA .....	i
AUTORIZACIÓN POR PARTE DEL AUTOR .....	ii
APROBACIÓN DEL TUTOR .....	iii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD .....	iv
APROBACIÓN LECTORES .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
RESUMEN EJECUTIVO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Diferencias entre zonas de alimentación y zonas de reproducción .....	2
1.2 Fidelidad a sitios de alimentación y reproducción .....	4
1.3 Estructura poblacional y conservación .....	5
1.4 Ballenas jorobadas en las costas ecuatorianas.....	6
1.5 Conservación de las ballenas jorobadas .....	8
1.6 Justificación y objetivos .....	8
2. MÉTODOS.....	9
2.1 Sitio de estudio .....	9
2.2 Recolección de muestras.....	11
2.3 Análisis de laboratorio.....	12
2.3.1 Extracción de ADN.....	12
2.3.2 Microsatélites.....	12
2.3.3 ADN mitocondrial .....	14

2.3.4 Determinación de sexo .....	14
2.4 Análisis de datos.....	15
2.4.1 Análisis de fidelidad.....	15
2.4.2 Análisis de fidelidad entre sexos.....	16
2.4.3 Análisis de foto-identificación.....	16
3. RESULTADOS ESPERADOS .....	17
3.1 Fidelidad de sitio.....	17
3.2 Fidelidad de sitio con respecto al sexo.....	18
3.3 Conservación.....	18
4. PRESUPUESTO.....	19
5. CRONOGRAMA.....	21
6. LITERATURA CITADA.....	23

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 (Cebadores (primers) para cada loci de microsatélites) .....	13
Tabla No. 2 (Presupuesto para el desarrollo del proyecto).....	19
Tabla No. 3 (Cronograma de actividades del año 1).....	21
Tabla No. 4 (Cronograma de actividades del año 3).....	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 (Distribución de las poblaciones de ballenas jorobadas a nivel mundial, su relación entre zonas de alimentación y zonas de reproducción y sus posibles rutas migratorias) .....	6
Figura No. 2 (Área de estudio de fidelidad de sitio de las ballenas jorobadas en la costa de Esmeraldas) .....	10

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE**  
**CARRERA DE BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS**

**TEMA: FIDELIDAD DE SITIO DE REPRODUCCIÓN DE BALLENAS JROBADAS EN  
LAS COSTAS ECUATORIANAS**

**AUTOR:** Dennys Liliana Mena Oña

**TUTOR:** Elisa Angélica Bonaccorso Sánchez, PhD.

**RESUMEN EJECUTIVO**

Las ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) son una especie cosmopolita que realiza grandes migraciones entre sus áreas de alimentación (ubicadas en latitudes altas) y sus áreas de reproducción (ubicadas en latitudes bajas). La estructura poblacional de la especie está dividida en “stocks” (Stock A hasta Stock G), o poblaciones delimitadas geográficamente. La población que arriba a las costas de Ecuador, especialmente a Esmeraldas y Manabí pertenece al Stock G o población reproductora del Pacífico Sudoriental, cuya zona de alimentación se encuentra en la Antártica. A pesar de que las ballenas jorobadas han sido de gran interés, se han realizado pocos estudios de sus poblaciones en el Pacífico sudamericano, por lo que existe un conocimiento limitado acerca de su hábitat, comportamiento, tamaño y estructura poblacional en la región. En este proyecto se estudiarán las ballenas jorobadas que llegan a las costas de Esmeraldas durante su período reproductivo, para poner a prueba dos hipótesis. En primer lugar, se plantea que las ballenas vuelven a las costas de Esmeraldas para reproducirse de manera anual, o interanual; o sea, que son fieles a su sitio de reproducción. En segundo lugar, que las hembras tienen mayor fidelidad de sitio que los machos. Estas hipótesis se pondrán a prueba utilizando principalmente identificación individual molecular basada en 15 loci de microsatélites. Este análisis será complementado con análisis basados en ADN mitocondrial, foto-identificación y sexado molecular. El estudio se realizará en las costas de Esmeraldas por 3 años consecutivos, esperando contar con un muestreo de 40 individuos por año. Se espera que los resultados de este proyecto contribuyan al manejo adecuado de áreas marinas protegidas para la conservación de cetáceos en Ecuador.

**DESCRIPTORES:** Ballenas jorobadas, Conservación, Fidelidad, Sitios de reproducción.

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE**  
**CARRERA DE BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS**

**THEME:** FIDELITY ON HUMPBACK WHALES REPRODUCTION SITE IN ECUADORIAN COASTS.

**AUTHOR:** Dennys Liliana Mena Oña

**TUTOR:** Elisa Angélica Bonaccorso Sánchez, PhD.

**ABSTRACT**

Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) are cosmopolitan species that make long migrations between their feeding areas (located in high latitudes) and their reproduction areas (located in low latitudes). The population structure of the species is divided in “stocks” (Stock A until Stock G) or geographically delimited populations. The population that arrives to the Ecuadorian coast, especially to Esmeraldas and Manabí, belongs to Stock G or breeding population of the Southeast Pacific; their feeding area is located in Antarctica. Although humpback whales have been of great interest, few studies of their populations in the South American Pacific have been conducted. Thus, there is only limited knowledge about their habitat, behavior, size, and population structure in the region. This project will study the humpback whales that arrive to Esmeraldas coast during their reproductive period, to test two hypotheses. The first states that these whales return to Esmeraldas coast to breed annually or interannually, which means that they are faithful to their reproduction site. The second states that females have a higher site fidelity than males. These hypotheses will be tested using individual molecular identification based on 15 microsatellites loci. This analysis will be complemented with analyzes based on mitochondrial DNA, photo-identification, and molecular sexing. This study will be conducted in Esmeraldas coast for 3 consecutive years, hoping to gather a sampling of 40 individuals per year. The results of these project are expected to contribute to appropriate handling of marine protected areas for the conservation of cetaceans in Ecuador.

**KEYWORDS:** Humpback whales, Conservation, Fidelity, Reproduction sites

**REVIEWED BY:** MSc. Roilys Jorge Suárez Abrahante



## 1. INTRODUCCIÓN

Las ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) son consideradas una especie cosmopolita, la cual se encuentra distribuida en los océanos principales a nivel mundial, desde las regiones polares y subpolares hasta el ecuador, siendo menos comunes en la zona Ártica (Clapham, 1996; González, 2002). Esta especie habita con mayor frecuencia las tres principales cuencas oceánicas: Pacífico Norte, Océano Austral y Atlántico Norte (Flórez-González et al., 2007). La distribución geográfica de las ballenas jorobadas está influida por la época de reproducción (invierno) en donde se mantienen en zonas subtropicales y tropicales, y la temporada de alimentación (verano) donde acuden a áreas en altas latitudes (Baker y Perry, 1987).

Las ballenas son organismos oportunistas. Su dieta consiste principalmente de pequeños peces que habitan aguas a mediana profundidad o cerca de la superficie, así como macro zooplancton también conocido como “krill” (Remili et al., 2020), la presa más frecuentemente encontrada en la región Antártica (NMFS, 1991; Baker et al., 1985; Mackintosh, 1970; Nemoto, 1970). El estudio de la dieta de las ballenas jorobadas ha sido limitado, pero las presas mayormente conocidas son copépodos (*Calanus* sp.), congrio de arena (*Ammodytes americanus*), arenque y sardina (*Clupea* sp.), camarones (*Eualus* sp., *Pandalus* sp.), anfípodos pelágicos (*Parathemisto* sp.), capelín (*Mallotus villosus*), anchoveta (*Engraulis* sp.), jurel (*Scomber scombrus*) y especies diferentes de krill (*Thysanoessa* sp., *Nyctiphanes* sp. y *Euphausia* sp.) (Clapham y Mead, 1999; NMFS, 1991).

Los individuos se alimentan con frecuencia a profundidades de hasta 40 m; sin embargo, registros de sonar han demostrado que pueden bucear a profundidades de hasta 200 m persiguiendo a sus presas (Krieger, 1987). Las ballenas jorobadas se alimentan embocando grandes cantidades de agua con el alimento que será ingerido; los individuos pueden ensanchar la garganta por los pliegues ventrales que poseen. Luego de eso, el agua ingerida es expulsada mediante sus barbas. También se ha evidenciado que pueden capturar a sus presas mediante una red de burbujas (que se forman al liberar aire de los pulmones) y, posteriormente nadan en círculos alrededor de los cardúmenes y los ingieren (Parker y Haswell, 1987).

### *1.1 Diferencias entre zonas de alimentación y zonas de reproducción*

La “época de alimentación” de la especie, en la que acumulan energía suficiente para la época de reproducción, se da en latitudes altas (entre los 40° y 75°) durante la época de verano, en zonas localizadas sobre la plataforma continental donde existen profundidades menores a 200 m. En estas zonas hay una gran variación en la temperatura, siendo usualmente bajas (de 2°C a 10°C) (NMFS, 1991). La productividad primaria y la concentración de alimento en estas zonas es abundante durante la temporada de verano (Brodie et al., 1978). Los grupos de individuos se forman con el propósito de optimizar el consumo común de alimento (Flórez-González et al., 2007; Valsecchi et al., 2002).

En el hemisferio norte, las áreas de alimentación se encuentran en: el Mar de Barents, Golfo de Alaska, Bahía de California, Mar de Chuckchi, Estrecho de Bering, costas de Islandia y Noruega, Golfo de Maine, Labrador y Golfo de Saint, Mar Árabe, Terranova y Lawrence (Mackintosh, 1965). En el hemisferio sur, la zona de alimentación está ubicada alrededor de la Antártica y está dividida en seis áreas: Pacífico oriental, Atlántico occidental, Atlántico oriental e Índico occidental, Índico oriental, Pacífico occidental y Pacífico central (Mackintosh, 1965).

Durante el tiempo de reproducción (invierno), los individuos optan por regiones subtropicales y tropicales. En estas zonas, la temperatura del agua se encuentra entre los 24°C y 28°C (con frecuencia áreas entre los 05° y 35° de latitud). La profundidad dentro de estas regiones es limitada y prefieren aguas entre 20 y 60 m de profundidad en la plataforma continental (Félix y Van Waerebeek., 2005) alrededor de islas y bahías (Acevedo et al., 2007). El período de reproducción se extiende entre 4 y 5 meses (Kaufman y Forestell, 2003). Sin embargo, durante la migración se puede dar el proceso de apareamiento (Clapham, 1996). Dentro de las zonas de reproducción se han evidenciado principalmente los comportamientos de apareamiento y crianza por parte de las hembras (Kaufman y Forestell, 2003; Mobley y Herman, 1985).

En general, los machos alcanzan su madurez sexual entre los 7 y 12 años, mientras que en las hembras ocurre entre los 4 y 9 años. El sistema de apareamiento es promiscuo/poligámico, debido a su estructura grupal (Ávila, 2000). Las ballenas jorobadas podrían tener una cría cada 2 o 3 años; sin embargo, se han reportado hembras que han tenido crías durante años consecutivos (Baker y Perry, 1987; Clapham, 1996; González, 2002; Flórez-González et al., 2007). El proceso de gestación dura entre 10 y 12 meses, y las crías alcanzan su independencia completa al año de haber nacido (Baker y Perry, 1987; Clapham 1996).

Dentro de las poblaciones de ballenas jorobadas existe una secuencia, tanto de arribo como de partida, a las áreas de reproducción. En primera instancia arriban las crías con sus madres para propiciar el proceso de destete. A continuación, arriban los individuos subadultos, posteriormente los ejemplares adultos y finalmente las hembras preñadas. La secuencia que se produce para el abandono del sitio de reproducción es el siguiente: en primer lugar, las hembras preñadas, seguidas de individuos inmaduros, luego los individuos maduros y por último las hembras con crías recién nacidas (Dawbin, 1966).

La ausencia de depredación en hábitats tropicales produce preferencia de sitio y otorga libertad a los individuos, haciendo innecesaria la formación de grupos de defensa común o vigilancia (Clapham, 1996; 2000). Así, las zonas de reproducción se caracterizan por la presencia de pequeños grupos y asociaciones breves entre individuos (Clapham, 1996; 2000).

Las zonas de reproducción conocidas en el hemisferio norte son Hawái, algunas islas de México, las islas Bonin y Ryukyu ubicadas cerca de Japón, Baja California, República Dominicana, Costa Rica, norte del Océano Índico, Panamá y Antillas Menores (Van Waerebeek, 2003). En el hemisferio sur, las áreas reconocidas son: Nueva Caledonia, Polinesia Francesa, Australia y Nueva Zelanda (Olavarría et al., 2007), Brasil (Siciliano, 1994), África y Madagascar (Rosenbaum et al., 1997), Colombia (Flórez-González, 1991) y las costas de Ecuador (Félix y Haase, 2001; Scheidat et al., 2000).

Las áreas de reproducción no sirven de zonas de alimentación para las ballenas jorobadas (Dawbin, 1966; Nishiwaki, 1966; Baracho-Neto et al., 2012), aunque existen estudios que muestran registros inusuales de ballenas solitarias que sí se alimentan en zonas tropicales (Gendron y Urban, 1993; Salden, 1989; Baraff et al., 1991). Más aún, en la población del Mar Árabe los individuos usan la misma área tanto para su reproducción como para su alimentación (Papastavrou y Van Waerebeek, 1998).

### *1.2 Fidelidad a sitios de alimentación y reproducción*

En general, las ballenas jorobadas han mostrado cierta fidelidad a sus zonas de alimentación y de reproducción, ubicadas en diferentes partes del mundo. Según Seton et al. (2002) la tasa de re-avistamiento es más alta en las áreas de alimentación en comparación a las áreas de reproducción. Estos datos están sustentados con fotografías tomadas en el Atlántico Norte (zona de alimentación), donde en el Golfo de Maine la tasa de re-avistamiento fue de un 58%. Otro ejemplo se da en el Golfo de Saint Lawrence, ha registrado un porcentaje de re-avistamiento del 42% (Seton et al., 2002).

La razón principal por la cual los individuos presentan mayor fidelidad hacia las áreas de alimentación, es que las crías son orientadas por sus madres hacia esas zonas, proporcionando un mecanismo directo de fidelidad (Craig y Herman, 1997). Durante su primer año de vida las progenitoras les muestran las diferentes rutas migratorias, facilitando así que las crías vuelvan a las zonas de alimentación por sí mismos (Baker y Perry, 1987). Esta experiencia materna temprana forma parte de la base de la herencia cultural del destino migratorio (Clapham y Mead, 2008).

Durante su migración, las poblaciones de ballenas jorobadas son dirigidas por las hembras adultas. La estadía en la zona de alimentación es aprovechada mayormente por las hembras con el propósito de adquirir mayor cantidad de energía para la lactancia y la gestación, facilitando así el éxito reproductivo de la población (Craig y Herman, 1997).

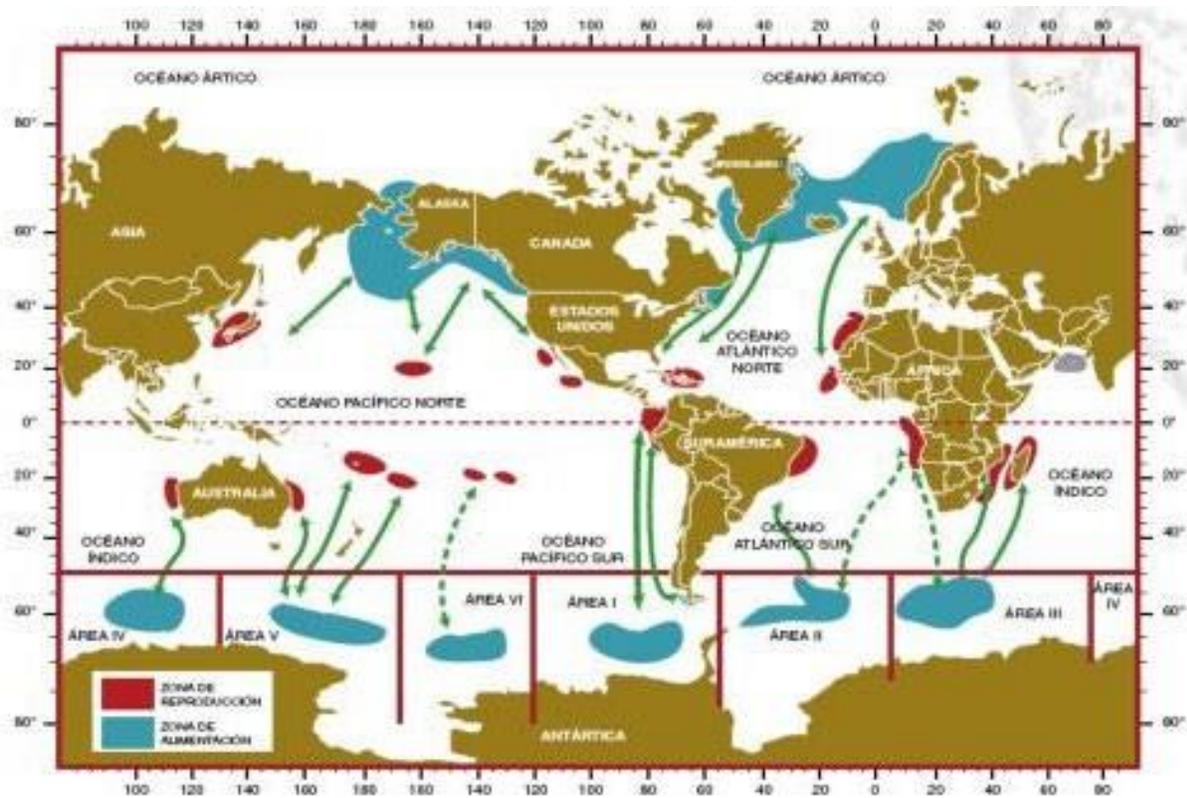
Dentro de las poblaciones de ballenas jorobadas, los machos tienden a ser totalmente migratorios, mientras que las hembras tienden a migrar durante años consecutivos (Craig y Herman, 1997). Potencialmente, para dirigirse hacia las áreas de reproducción, los individuos tanto hembras como machos emplean diferentes rutas migratorias (Salden et al., 1999). Además, el apareamiento no se da únicamente en las áreas de reproducción, sino también en las áreas de alimentación o a lo largo de la ruta migratoria (Herman et al., 2010). Esto evitaría que las hembras completen su ciclo migratorio (Herman et al., 2010).

### *1.3 Estructura poblacional y conservación*

Dentro de la estructura poblacional de las ballenas jorobadas existen subdivisiones establecidas llamadas “stocks”, las cuales son poblaciones delimitadas geográficamente que en su mayoría se encuentran aisladas pudiendo darse entre ellas flujo génico (González, 2002; Baker et al., 1986). A nivel mundial se conocen siete subpoblaciones de individuos reproductores (Stock A hasta Stock G) (IWC, 2005). De igual modo, se han identificado seis zonas de alimentación alrededor de la Antártica (I-VI; Comisión Ballenera Internacional (IWC, 2005). La población que acude a las costas ecuatorianas corresponde al Stock G, población reproductora del Pacífico Sudoriental, la cual acude a costas de Panamá, Costa Rica, Ecuador y Colombia. Su zona de alimentación corresponde a la I ubicada en la Antártica (Mar de Bellingshausen y los alrededores de las islas Shetland del Sur) (Flórez-González et al., 2007; Olavarría, 2008).

Las poblaciones de ballenas jorobadas realizan migraciones de manera estacional, entre las zonas de alimentación las cuales se encuentran en latitudes altas (Figura 1) y las zonas de reproducción ubicadas en latitudes bajas (Rice, 1998). La migración puede variar en gran medida dependiendo de las zonas geográficas en las que se produce la migración, los individuos y las condiciones del ambiente (Clapham y Mattila, 1988). Las rutas exactas que siguen las ballenas jorobadas en su migración son desconocidas (Mate et al., 1998). Sin embargo, se ha podido trazar una ruta entre Hawái y Alaska mediante transmisores satelitales colocados en los ejemplares (Mate et al., 1998). Además, existen ciertas diferencias entre las poblaciones migratorias debido a su preferencia. Algunas prefieren atravesar el océano abierto, mientras otras prefieren tomar rutas costeras, las

cuales pueden ser apreciadas desde las diferentes orillas (Aguayo et al., 1998; Ávila, 2000; Félix y Van Waerebeek, 2005).



**Figura 1.** Distribución de las poblaciones de ballenas jorobadas a nivel mundial, su relación entre zonas de alimentación y zonas de reproducción y sus posibles rutas migratorias (Flórez-González et al., 2007).

#### 1.4 Ballenas jorobadas en las costas ecuatorianas

Los estudios de ballenas jorobadas dentro de Ecuador comenzaron en los años 90, principalmente en torno a la Isla de la Plata (Félix y Haase, 2001; Scheidat et al., 2000), mientras que en Esmeraldas se dieron a inicios del 2000 (Barragan, 2003; Brtnik et al., 2003) y finalmente en Salinas en el 2003 (Félix y Haase, 2005). Las ballenas jorobadas acuden a la zona de reproducción correspondiente a las costas ecuatorianas entre los meses de mayo y octubre, observando mayor presencia de individuos entre julio y agosto. En base a estos registros se ha establecido que el mes

de agosto es cuando se da la mayor cantidad de nacimientos (Acevedo, 2007; Pairoa-Riofrio, 2003; Félix y Haase, 2001; Flórez-González et al., 2007; Scheidat et al., 2000). Durante el proceso del nacimiento, las progenitoras optan por sitios con las condiciones favorables para los ballenatos, especialmente temperaturas cálidas y profundidades bajas (Félix, 2003).

En las costas ecuatorianas la fidelidad de las poblaciones de ballenas jorobadas varía según el sitio. Las zonas con menos fidelidad son aquellas frente a Puerto López, la Isla de la Plata, Puerto Cayo y el Bajo de Cantagallo. En estos sitios se ha reportado baja cantidad de recapturas en los individuos, tanto durante años seguidos como en la misma temporada reproductiva (Pairoa-Riofrio, 2003; Félix y Haase, 1998; Félix y Haase, 2001; Félix, 2003). Se ha propuesto que la escasez de re-avistamientos de ballenas jorobadas, se produce porque los individuos no se mantienen por largos periodos de tiempo en las áreas de estudio, debido a su preferencia hacia aguas menos profundas y mayormente calientes (Félix y Haase, 1998; Félix y Haase 2001).

Sin embargo, dentro del Parque Nacional Machalilla y Esmeraldas (zonas identificadas de reproducción), a partir de los años 1996 hasta el 2012, se ha podido evidenciar mediante análisis de foto-identificación que dentro de la población perteneciente a la costa de Esmeraldas, la tasa anual de retorno al mismo sitio de reproducción es de un promedio de 49% (Gladek, 2013). Debido a estas cifras se propone que los individuos que acuden a las costas de Ecuador muestran una fidelidad alta de sitio, contrario a lo reportado en estudios previos. Es importante mencionar también que durante 1996 y 2004 los ejemplares permanecían en las áreas de reproducción un promedio de 17 días, siendo el tiempo de ocupación más alto encontrado dentro de las poblaciones (Pairoa-Riofrio, 2003; Félix y Haase, 2001, 2005; Scheidat et al., 2000).

Estudios genéticos realizados en la población tanto del Ecuador continental como de Galápagos han evidenciado la existencia de panmixia con la población presente en Colombia. Adicionalmente, estudios genéticos han demostrado que la Península Antártica es la zona principal de alimentación para los individuos que arriban al país, (Félix et al., 2007, 2012).

### *1.5 Conservación de las ballenas jorobadas*

Durante la década de los 70's y 80's las ballenas jorobadas fueron consideradas una especie en peligro de extinción, causado principalmente por la caza indiscriminada. Debido al crítico estado de las poblaciones, se originaron diversos planes de conservación a nivel mundial (Bettridge et al., 2015). Actualmente según la Unión Mundial para la Conservación (UICN), se encuentra catalogada como en Preocupación Menor (LC). De acuerdo a esta categoría su peligro de extinguirse es mínimo, es abundante en el mundo y cuenta con una distribución amplia (Reilly et al, 2008). A pesar de ello, la acción humana y los cambios que produce siguen generando amenaza de conservación para la especie (Nieto García, 2019).

### *1.6 Justificación y objetivos*

Las ballenas jorobadas se han estudiado de manera extensiva en algunas zonas reproductivas como Hawái (Herman y Antinaja, 1977). Sin embargo, dentro del Pacífico sudamericano se han realizado pocos estudios. Por esta razón, se conoce poco acerca del uso de hábitat, comportamiento, tamaño y estructura poblacional de las ballenas jorobadas en esta región (Scheidat, 2001).

Además, es importante entender y evaluar la fidelidad que presentan los organismos hacia las aguas ecuatorianas. A pesar de que las costas de Ecuador constituyen la zona de reproducción más importante dentro del Pacífico sudeste tropical, las costas de la provincia de Esmeraldas siguen siendo poco estudiadas (Oña, 2013). Estudios más profundos, podrían determinar si el sitio es de alto interés para las ballenas del Stock G.

Con el desarrollo de la presente propuesta se busca determinar la fidelidad de sitio de reproducción de las ballenas jorobadas (*Megaptera novaengliae*) en la zona costera de Esmeraldas, y si esta se da durante años consecutivos. Se busca también determinar si existen diferencias entre sexos en

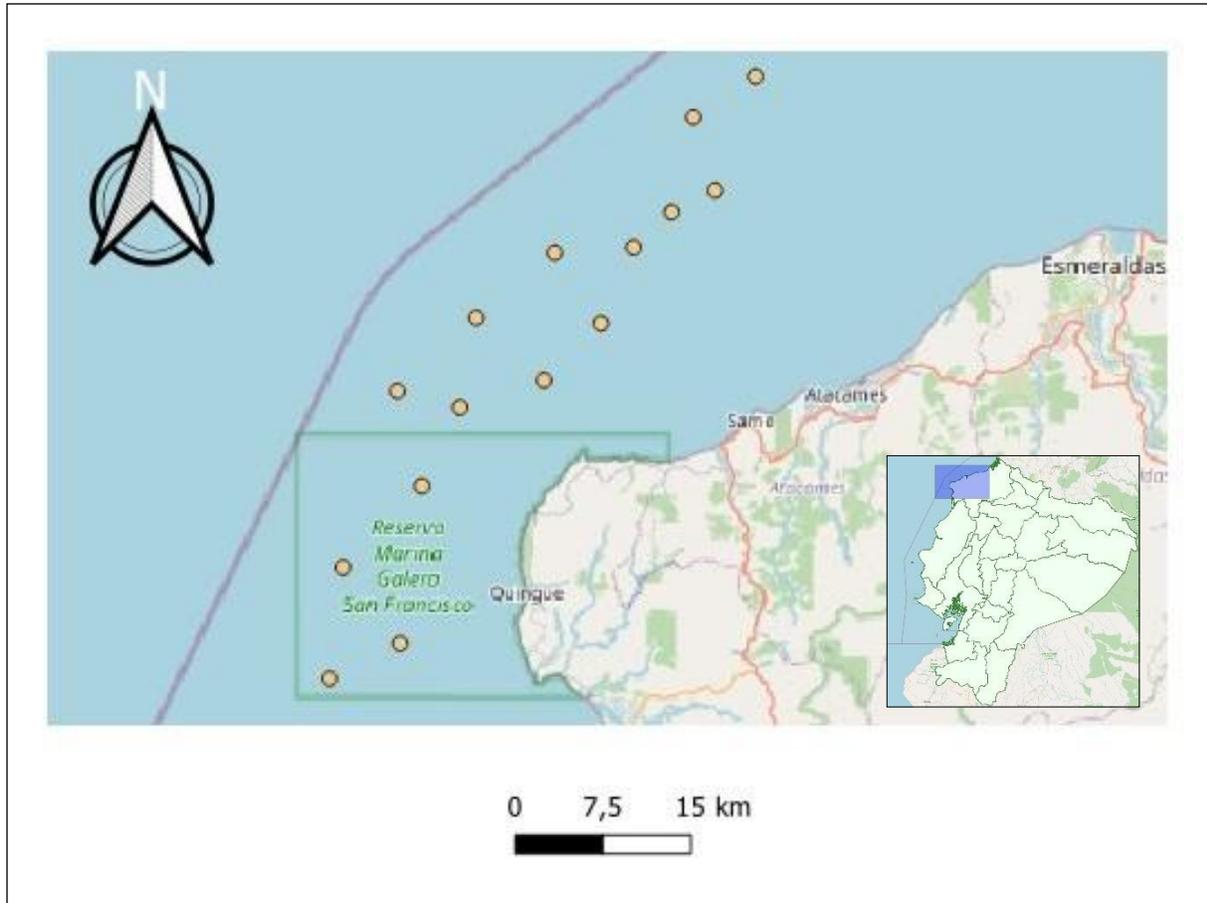
cuanto a la fidelidad a los sitios de reproducción. La información producida en el estudio servirá para contribuir al manejo de áreas marinas protegidas para la conservación de cetáceos en Ecuador.

Se esperaría que el estudio genético de las ballenas de esta población confirme que las ballenas que llegan a la costa de Esmeraldas vuelven al mismo sitio de reproducción. Además, es más probable que vuelvan pasando un año y no en años consecutivos (Baracho-Neto et al., 2012). Estudios anteriores (Gladek, 2013) sugieren que, en general, las ballenas hembra son más fieles a sus sitios de reproducción que los machos. Por esta razón, se esperaría que también sea similar en el caso de las ballenas de la costa de Esmeraldas.

## **2. MÉTODOS**

### *2.1 Sitio de estudio*

El estudio se realizará en las costas de la provincia de Esmeraldas ubicada en la zona noroccidental del país. Se establecerán puntos estratégicos para la colección de muestras, cuya ubicación aproximada se encuentra en la Figura 2.



**Figura 2.** Área de estudio de fidelidad de sitio de las ballenas jorobadas en la costa de Esmeraldas.

La zona costera de la provincia está caracterizada por poseer temperaturas que oscilan entre los 24°C y 26°C a lo largo de todo el año (Brtnik et al., 2003; Oña, 2013). Una de las principales características que posee la zona es la presencia de corrientes inter-tropicales las cuales provienen del norte aportando de esta manera gran diversidad marina en la zona y la presencia de rutas migratorias de varias especies como manta rayas, ballenas jorobadas, aves marinas, entre otros (Brtnik et al., 2003).

El clima del área está clasificado como subtropical y cuenta con dos subestaciones bastante definidas. Durante la época de invierno (junio a noviembre) la precipitación es más baja que el verano (diciembre a abril) (Cruz, 2012). En la zona de Esmeraldas las temperaturas más bajas se experimentan durante el mes de diciembre y las más altas durante el mes de mayo (CPPS, 2014).

## 2.2 Recolección de muestras

El estudio se realizará por 3 años consecutivos. El trabajo de campo se realizará en julio y agosto, que son los meses de mayor presencia de ballenas jorobadas (Scheidat et al., 2000), para aumentar la probabilidad de muestrear la mayor cantidad de individuos. Se espera poder contar con un muestreo de 40 individuos por año. Esto se logrará, por medio del sistema de biopsias Paxarm (Krützen et al., 2002), siguiendo los parámetros, recomendaciones y observaciones indicadas en la Guía de Observación de Ballenas Jorobadas (Félix, 2003). Para la obtención de las 40 muestras por año, se trabajará en campo por un promedio de 27 días por año, contando con las condiciones climáticas oportunas. Para tomar las muestras durante 27 días se deberían capturar tres individuos cada 2 días.

Para la obtención de las muestras se contratará una lancha que cuente con las condiciones necesarias (motor de 75 caballos de fuerza y la tripulación pertinente), la cual servirá de transporte para cada salida. Para la toma de muestras se necesitará estar a una distancia no mayor de 300 m del individuo, por un período no superior a 5 min; con estas medidas se busca no causar malestar en los individuos. Cuando la distancia sea mayor a 300 m, el encuentro será considerado como avistamiento, pero no se intentará tomar la muestra. La ubicación de los individuos se basará principalmente en la observación, donde el animal nuclear usualmente es la hembra y los ejemplares que se encuentran a su alrededor son los machos, también conocidos como escoltas (Rojas López, 2014).

La recolección de muestras se realizará de la siguiente manera: al observar un individuo se disparará con un rifle calibre 0.22 (sistema de biopsias Paxarm, New Zealand Ltd.) un dardo de biopsia de policarbonato liviano con dirección a la región flanqueante del individuo (región cercana a la aleta posterior del individuo). El impacto del dardo penetrará la piel y retendrá una muestra de más o menos 3 cm, la cual finalmente será recolectada manualmente del agua. La punta del dardo obtendrá muestras de tejido adiposo y epitelial que se colocará en tubos *ependorf* con

etanol al 95%. Por último, durante el proceso de recolección de muestras se obtendrá una fotografía del individuo (foto-identificación) de las aletas dorsales y caudales, con el propósito de evitar analizar muestras duplicadas de un mismo ejemplar durante el trabajo de campo.

### *2.3 Análisis de laboratorio*

#### *2.3.1 Extracción de ADN*

Para el proceso de extracción de ADN, se utilizará un protocolo eficaz en términos de cantidad y calidad del material genómico aislado, y de bajo costo (Peñafiel et al., 2019). Este se basa en precipitación de proteínas con Tiocianato de Guanidina, precipitación de ADN con isopropanol y limpieza final con etanol. Para la verificación de una extracción exitosa, se medirá la concentración y calidad del ADN en un espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek).

#### *2.3.2 Microsatélites*

Para determinar la fidelidad de sitio de los individuos en la muestra, utilizaremos microsatélites. Estos son marcadores moleculares repetitivos de ADN, constituidos por secuencias cortas de bases de nucleótidos (González, 2003). Por su tasa elevada de polimorfismo, estos aportan con información bastante útil para estudios poblacionales y de conservación (Bruford y Wayne, 1993).

En todas las muestras se examinarán 15 loci de microsatélites polimórficos que se listan (junto a sus cebadores correspondientes) en la Tabla 1. Los productos de PCR serán limpiados de cebadores y nucleótidos no incorporados con ExoSAP-IT (Applied Biosystems) y serán analizados en MacroGen (Corea del Sur). Los cromatogramas serán examinados y los microsatélites codificados en Geneious 11.1.5 (Biomatters Ltd., Kearsse et al., 2012). Adicionalmente los cebadores de cada microsatélite serán unidos a un marcador con fluorescencia (Boutin-Ganache et al., 2001).

**Tabla 1.** Cebadores (primers) para cada loci de microsatélites.

<b>Locus</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>
<b>EV1</b>	EV1a	CCCTGCTCCCCATTCTC	Valsecchi y Amos (1996)
	EV1b	ATAAACTCTAATACACTTCCTCCA AC	
<b>EV14</b>	EV14a	TAAACATCAAAGCAGACCCC	Valsecchi y Amos (1996)
	EV14b	CCAGAGCCAAGGTCAAGAG	
<b>EV21</b>	EV21a	CAATAATTGGACAGTGATTTCC	Valsecchi y Amos (1996)
	EV21b	CGCTGAAGGTGTGCCC	
<b>EV37</b>	EV37a	AGCTTGATTTGGAAGTCATGA	Valsecchi y Amos (1996)
	EV37b	TAGTAGAGCCGTGATAAAGTGC	
<b>EV94</b>	EV94a	ATCGTATTGGTCCTTTTCTGC	Valsecchi y Amos (1996)
	EV94b	AATAGATAGTGATGATGATTCAC ACC	
<b>EV96</b>	EV96a	AAGATGAGTAGATTCACTACACG AGG	Valsecchi y Amos (1996)
	EV96b	CCACTTTTCCTCTCACATAGCC	
<b>EV104</b>	EV104a	TGGAGATGACAGGATTTGGG	Valsecchi y Amos (1996)
	EV104b	GGAATTTTTATTGTAATGGGTCC	
<b>rw4-10</b>	rw4-10f	GCCTCCCTCGCGCCAATGGCATT CTTCATTCTTT	Waldick et al. (1999)
	rw4-10r	GCCAAACTTACCAAATTGTG	
<b>rw48</b>	rw48f	GCCTCCCTCGCGCCACCAATGACT TTCCCTGTA	Waldick et al. (1999)
	rw48r	GATACCGCAGTGTGTCTG	
<b>GT211</b>	GT211f	GCCTCCCTCGCGCCACTGCTCTAT TCTATGAAAGCA	Bérubé et al. (2000)
	GT211r	CTCCAGTATACCTATCTTGTC	
<b>GT23</b>	GT23f	GCCTCCCTCGCGCCAGTTCCCAGG CTCTGCACTCTG	Bérubé et al. (2000)
	GT23r	CATTTCTACCCACCTGTCAT	
<b>GT575</b>	GT575f	GCCTCCCTCGCGCCATATAAGTGA ATACAAAGACCC	Bérubé et al. (2000)
	GT575r	ACCATCAACTGGAAGTCTTTC	
<b>GATA417</b>	GATA417f	CTGAGATAGCAGTTACATGGG	Palsboll et al. (1997)
	GATA417r	TCTGCTCAGGAAATTTCAAG	
<b>GATA28</b>	GATA28f	CGCTGATAGATTAGTCTAGG	Palsboll et al. (1997)
	GATA28r	AAAGACTGAGATCTATAGTTA	
<b>GATA98</b>	GATA98f	TGTACCCTGGATGGATAGATT	Palsboll et al. (1997)
	GATA98r	ATGTCTCTCTCACACCTCACC	

### 2.3.3 ADN mitocondrial

Se amplificará un fragmento de aproximadamente 500 pares de bases de la región de control del ADN mitocondrial mediante PCR (Saiki et al., 1988). Para el procedimiento se utilizarán los cebadores: t-Pro-whale Dlp1.5 (5'TCACCCAAAGCTGRARTTCTA-3') y Dlp8 (5'CCATCGWGATGTCTTATTTAAGRGGAA-3') (Baker et al., 1998; Olavarría et al., 2007; Félix et al., 2012). Para verificar la amplificación se realizará una electroforesis en gel de agarosa al 1%. La purificación de productos de PCR se realizará de la misma manera que para los microsatélites. El ADN de las reacciones de PCR será secuenciado en Macrogen en ambas direcciones.

La inspección y edición de cronogramas se realizará en Geneious 11.1.5 (Biomatters, Ltd., Kearse et al., 2012). Para la alineación de las secuencias amplificadas se utilizará el sistema "ClustalW" del programa Mega 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2011), donde las muestras se alinean progresivamente hasta obtener una alineación global (Thompson et al., 1994).

### 2.3.4 Determinación de sexo

Para la determinación de sexo, se amplificarán las regiones SFY/SFX mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto, se usarán los cebadores: SFY1204 y SFY0097 (Palsboll et al., 1992). Los productos de PCR serán examinados con 3 unidades de endonucleasas de restricción Tag1 (New England BioLabs Inc.). Posteriormente los fragmentos de restricción serán separados y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 4% (Palsboll et al., 1992).

Una vez realizado el PCR las muestras serán colocadas en un gel de agarosa al 3%, donde se determinará el sexo de acuerdo con los patrones de los fragmentos de restricción. Según Palsboll et al. (1992), el control positivo se diferencia debido a que presenta un patrón de fragmentación

similar al esperado para individuos machos, generando dos bandas de aproximadamente 439 y 621 pares de bases. En cambio, para individuos hembras se identificará un patrón de una sola banda de aproximadamente 439 pares de bases.

## 2.4 Análisis de datos

### 2.4.1 Análisis de fidelidad

Se evidenciará la presencia de alelos nulos en el programa MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Además, se calculará el número de alelos por locus, la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg, la heterocigocidad observada, la heterocigocidad esperada, y el desequilibrio de ligamiento (LD) en GENEPOP v.4.7 (Rousset y Rainmod, 1995, Rousset, 2008).

Para conocer si existe fidelidad de sitio por parte de las ballenas jorobadas hacia las costas de Esmeraldas, se identificarán individualmente las muestras tomadas cada año mediante el análisis de microsatélites. Para identificar las muestras a nivel individual se usará el programa CERVUS (Marshall et al., 1998), limitando el criterio de búsqueda de coincidencias (*matching*) a un mínimo de 9 loci de microsatélites. Adicionalmente, las identificaciones individuales serán confirmadas inspeccionando la secuencia de haplotipos (100% de coincidencias en la región de control), el sexo del individuo (determinado genéticamente) y la foto-identificación (realizada en campo). Este análisis de identificación se realizará comparando los muestreos por año: año 1 contra año 2, año 1 contra año 3 y año 2 contra año 3. De esta manera se evaluará si la fidelidad de sitio se da a año seguido, o pasando un año.

Sin embargo, existe la posibilidad que el tamaño muestral o que el número de microsatélites analizados no permitan probar fidelidad de sitio a nivel individual. Debido a esta limitante potencial, se espera poner a prueba la hipótesis de fidelidad a nivel poblacional, es decir que, en general, individuos genéticamente relacionados tienden a regresar a las mismas zonas de reproducción, al mismo tiempo. Por ello, se comparará la composición genética las muestras

tomadas cada año, utilizando un análisis de varianza molecular (AMOVA) en Arlequin 3.5 (Excoffier et al., 1992). Este análisis se realizará tanto con los datos obtenidos de microsatélites, como con los datos de la región de control mitocondrial, comparando los muestreos por año: año 1 contra año 2, año 1 contra año 3 y año 2 contra año 3. Al igual que se plantea con la identificación individual, esta comparación permitirá evaluar si la fidelidad de sitio se da a año seguido, o pasando un año. Si existiera cierta fidelidad de sitio a nivel poblacional, se esperaría que no se encontraran diferencias significativas en la composición genética de los individuos entre años consecutivos, o pasando un año.

Adicionalmente, utilizando los datos de microsatélites se realizará un análisis de componentes principales (PCA) para observar si existe una agrupación de las muestras de acuerdo con el año en que fueron muestreados. Al existir fidelidad de sitio a nivel poblacional, se esperaría que no se generaran agrupaciones claras porque las muestras obtenidas año tras año, provienen (en gran proporción) de individuos de la misma población. Si no existiera fidelidad de sitio, se esperaría que cada año pudiera identificarse en el PCA como un grupo genético diferente o con algo de mezcla entre grupos (representando algunos pocos individuos que vuelven cada año o a año seguido).

#### *2.4.2 Análisis de fidelidad entre sexos*

Para poner a prueba la hipótesis de fidelidad de las ballenas jorobadas de acuerdo a su sexo se repetirán los mismos análisis de identificación individual y de fidelidad a nivel poblacional, sin embargo, en esta parte los datos serán separando por sexo.

#### *2.4.3 Análisis de foto-identificación*

El uso de foto-identificación nos servirá para identificar individuos a través de sus marcas naturales, mediante tres criterios: observación de cicatrices y marcas naturales, patrón de pigmentación y la forma de la hendidura de la parte media de la aleta caudal (Katona et al., 1979). Para estos análisis se utilizará el programa I<sup>3</sup>S Contour (Interactive Individual Identification

System) (Hartog y Reijns, 2011), el cual mediante un algoritmo de trazado semiautomático analiza el contorno de las aletas dorsales o caudales para identificar individuos de manera automática.

### **3. RESULTADOS ESPERADOS**

#### *3.1 Fidelidad de sitio*

Se conoce que las ballenas jorobadas muestran mayor fidelidad hacia las áreas de alimentación en comparación a las áreas de reproducción (Seton et al., 2002). Sin embargo, se esperaría que los individuos presenten cierta fidelidad hacia el sitio de reproducción ubicado en la costa de Esmeraldas.

Flórez-González et al. (2007) mencionan que alrededor del 26% de los individuos vuelven a las costas colombianas, al ser poblaciones relativamente cercanas se esperaría una tasa de retorno similar o incluso mayor a la señalada. Sin embargo, este porcentaje puede variar debido a la diferente composición de los grupos sociales presentes en la zona costera colombo-ecuatoriana (Flórez-González, 1991).

Con el apoyo de los análisis genéticos y los datos obtenidos con foto-identificación se conocerá si los individuos retornan o no al sitio de reproducción de la costa de Esmeraldas durante años consecutivos. Según Brown et al. (1995), se evidenció que aproximadamente el 50% de las hembras de la zona Antártica no migraban a sus zonas de reproducción cada año, por lo que se cree que ciertas hembras permanecen en las zonas de alimentación durante todo el invierno debido principalmente a los costos energéticos. Por esta razón algunas hembras prefieren realizar la migración en años alternos para recuperarse de los costes energéticos (Brown et al., 1995).

### *3.2 Fidelidad de sitio con respecto al sexo*

En cuanto a fidelidad con respecto al sexo se esperaría encontrar mayor proporción por parte de hembras a comparación con machos (Rizzo y Schulte, 2009). Debido principalmente a que las madres y las crías al preferir zonas poco profundas su nivel de fidelidad sería más alto hacia la zona costera de Esmeraldas por sus características óptimas (Félix y Haase, 2001). Una posible explicación para la baja fidelidad de los machos es que presentan mayor dispersión en cuanto a los sitios de reproducción, debido a que tratan de maximizar sus oportunidades de apareamiento, por ello es mayormente común encontrar machos en diferentes áreas de reproducción lejanas a sus zonas originarias de apareamiento (Pomilla y Rosenbaum, 2005; Brown et al., 1995; Valsecchi et al., 2010).

### *3.3 Conservación*

Para promover la conservación y manejo de las poblaciones de ballenas jorobadas es importante comprender aspectos relevantes sobre la especie, tales como la biología, la demografía, y la composición poblacional. Por ello, los estudios basados en fidelidad de sitio tanto para áreas de alimentación como para áreas reproductivas, son importantes debido a que influyen en el manejo y diseño óptimo de áreas marinas protegidas para la conservación de cetáceos. Es el caso de la costa de Esmeraldas, donde al ser una importante zona de residencia para la especie y evidenciar la numerosa presencia de ballenas jorobadas, se podría promover un manejo oportuno, como por ejemplo la ampliación de la Reserva Marina Galera San Francisco. De esta manera se podría conservar mejor a la especie contribuyendo al mantenimiento de una importante área de reproducción en el país.

#### 4. PRESUPUESTO

Para la toma de muestras de piel de las ballenas jorobadas en la fase de campo, se contará con el material de toma de biopsias Paxarm empleado en el Proyecto CETACEA Ecuador. De igual manera, se emplearán los equipos fotográficos del proyecto para generar la foto-identificación de los individuos. La fase de laboratorio será desarrollada en el laboratorio de la Universidad San Francisco de Quito y se contará con los equipos existentes en ese laboratorio.

**Tabla 2.** Presupuesto para el desarrollo del proyecto.

ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	TIPO DE RECURSO	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
Fase de campo	Recolección de muestras	Lancha	81 salidas	150,00	12,150
		Hospedaje	81 días	20,00	1,620
		Alimentación	3 veces por día	5,00	1,215
	Mantenimiento de las muestras	Tubos eppendorf	1000 unidades	0,012	12,00
		Parafilm	1 rollo	40,00	40,00
		Etanol 95%	1 galón	13,00	13,00
Fase de laboratorio	Extracción	Bisturí	100 hojas	0,05	5,00
		Cloro 5%	1 litro	2,46	2,46
		NaCl 100 mM	500 gramos	24,00	24,00
		Proteinasa K+	2 paquetes de 100 mg c/u	170,00	170,00
		RNasa	10 mL 20ug/uL	198,00	198,00
		Solución de acetato de sodio	100 mL 3M	55,00	55,00
		Guantes	2 cajas	8,90	17,80

		Puntas blancas	10 paquetes de 1000 unidades	0,008	80,00
		Puntas azules	1000 unidades	0,013	13,00
		Puntas amarillas	10 paquetes de 1000 unidades	0,012	120,00
	Visualización	Agarosa Ultra Pura	100 gramos	210,00	210,00
		SyberGreen	500 uL	404,00	404,00
		Blue Juice	10X	64,00	64,00
	PCR	Agua destilada	500 ml	25,00	25,00
		Kit de PCR (Taq, MgCL2 y Buffer)	8 kits	160,00	1,280
		dNTPs	5 unidades	160,00	800,00
		Primers para ADN microsatélites	15 pares (30 nucleótidos c/u)	9,00	270,00
		Primers con fluoróforos-microsatélites	3 primers (FAM, VIC, NED)	70,00	210,00
		Primers para ADN mitocondrial	1 par de primers (30 nucleótidos c/u)	8,00	16,00
		ExoSAP	4 paquetes de 500 reacciones c/u	178,00	712,00
	Secuenciamiento o genotipado-Macrogen Inc. (Corea del Sur)	Placas y tapas para enviar	10 placas y tapas	24,70	247,00
		Secuenciamiento en placas	2 placas (96 muestras)	299,00	598,00
		Genotipado de microsatélites en placas	12 placas (96 muestras)	250,00	3,000
<b>TOTAL</b>					<b>\$ 23,571.26</b>

## 5. CRONOGRAMA

El proyecto ha sido planteado para ser realizado en el transcurso de 3 años, por ello se plantean cronogramas tanto para el año 1 como para el año 3, dando a conocer que durante el año 2 las actividades serán similares a las del año 1.

**Tabla 3.** Cronograma de actividades del año 1.

ETAPA	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	AÑO 1															
			Bimestre 1		Bimestre 2		Bimestre 3		Bimestre 4		Bimestre 5		Bimestre 6					
Fase de campo	Toma de muestras	Recolección de muestras																
Fase de laboratorio	Análisis moleculares	Extracción de ADN																
		Amplificación																
		Análisis de microsatélites																
		Determinación de sexo																
		Análisis de ADN mitocondrial																

**Tabla 4.** Cronograma de actividades del año 3.

ETAPA	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	AÑO 3													
			Bimestre 1		Bimestre 2		Bimestre 3		Bimestre 4		Bimestre 5		Bimestre 6			
Fase de campo	Toma de muestras	Recolección de muestras	■	■												
Fase de laboratorio	Análisis moleculares	Extracción de ADN			■											
		Amplificación			■	■										
		Análisis de microsátélites					■									
		Determinación de sexo						■								
		Análisis de ADN mitocondrial								■						
		Secuenciamiento (Macrogen Inc.)								■	■	■				
	Análisis estadísticos	Análisis de fidelidad												■	■	■
		Análisis de fidelidad entre sexos												■	■	■

## 6. LITERATURA CITADA

- Acevedo, J., Rasmussen, K., Félix, F., Castro, C., Llano, M., Secchi, E., Saborio, M.T., Aguayo-Lobo, A., Haase, B., Scheidat, M., Dalla-Rosa, L., Olavarría, C., Forestell, P., Acuña, P., Kaufman, G. y Pastene, L. (2007). Migratory destination of humpback whales from the Magellan Strait feeding ground, Southeast Pacific. *Marine Mammal Science*, 23(2), 453-463. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2007.00116.x>
- Aguayo, A., Torres, D. y Acevedo, J. (1998). Los mamíferos marinos de Chile: I. Cetácea. *Serie científica*, 48, 19-159.
- Ávila, I. (2000). Algunos aspectos en el comportamiento superficial de la ballena jorobada *Megaptera novaeangliae* en los diferentes grupos conformados alrededor del par madre-cría en el Pacífico colombiano. [Tesis de pregrado, Universidad del Valle] Programa Académico de Biología, Cali.
- Baker, C., Herman, L., Perry, A., Lawton, W., Straley J.M. y Straley, J.H. (1985). Population characteristics and migration of summer and late-season humpback whales *Megaptera novaeangliae* in southeastern Alaska. *Marine Mammal Science*, 1(4), 304-323. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1985.tb00018.x>
- Baker, C., Herman, L., Perry, A., Lawton, W., Straley, J., Wolman, A., Kaufman, G., Winn, H., Hall, J., Reinke J. y 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. <https://doi.org/10.3354/meps031105>
- Baker, C. y Perry, A. (1987). Reproductive histories of female humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the North Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 41, 103-114. <https://doi.org/10.3354/meps041103>

- Baker, C., Flórez-González, L., Abernethy, B., Rosenbaum, H., Slade, R., Capella, J. y Bannister, J. (1998). Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among humpback whales of the Southern Hemisphere. *Marine Mammal Science*, 14(4), 721- 737. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1998.tb00758.x>
- Baracho-Neto, C., Neto, E., Rossi-Santos, M., Wedekin, L., Neves, M., Lima, F. y Faria, D. (2012). Site fidelity and residence times of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on the Brazilian coast. *Marine Biological Association of the United Kingdom. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(8), 1783. <https://doi.org/10.1017/S0025315411002074>
- Baraff, L., Clapham, P., Matilla O. y Bowman, R. (1991). Feeding behavior of a humpback whale in low-latitude waters. *Marine Mammal Science*, 7(2), 197-202. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1991.tb00567.x>
- Barragan, M. (2003). Desplazamientos de las ballenas jorobadas *Megaptera novaeangliae*, (Borowski, 1781) (Cetacea: Balaenopteridae) entre zonas de reproducción en el Ecuador. [Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. Repositorio Institucional – Pontificia Universidad Católica, Quito.
- Bettridge, S., Baker, C., Barlow, J., Clapham, P., Ford, M., Gouveia, D., Mattila, D., Pace, R., Rosel, P., Silber, G. y Wade, R. (2015). Status review of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) under the endangered species act. *NOAA Technical Memorandum*, 130-240.
- Bérubé, M., Jorgensen, H., McEwing, R. y Palsboll, P. (2000). Polymorphic di-nucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*. *Molecular Ecology*, 9, 2155–2234. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.105315.x>

- Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M. y Deschepper, C. (2001). M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*, 31(1), 25-28.  
<https://doi.org/10.2144/01311bm02>
- Brodie, P., Saneoto, D. y Sheldon, R. (1978). Population densities of euphausiids of Nova Scotia as indicated by net samples, whale stomach contents and sonar. *Limnology and Oceanography*, 23, 1264-1267. <https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.6.1264>
- Brown, M., Corkeron, P., Hale, P., Schultz, K. y Bryden, M. (1995). Evidence for a sex-segregated migration in the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *Proceedings of the Royal Society of London.*, 259(1355), 229-234.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0034>
- Brtnik, P., Denkinger, J. y Ojeda de la Cruz, M. (2003). Conservación de los arrecifes de Atacames a través de la observación de ballenas. (Informe final de la Fase I). Proyecto de Pequeñas Donaciones, Esmeraldas-Ecuador.
- Bruford, M. y Wayne, R. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Genetics and Development*, 3, 939-943.  
[https://doi.org/10.1016/0959-437X\(93\)90017-J](https://doi.org/10.1016/0959-437X(93)90017-J)
- Clapham, P. y Mattila, D. (1988). Observations of migratory transits of two humpback whales. *Marine Mammal Science*, 4, 59-62.  
<https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1988.tb00182.x>
- Clapham, P. (1996). The social and reproductive biology of humpback whales: an ecological perspective. *Journal of Mammalogy*, 26, 27-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1996.tb00145.x>

- Clapham, P. y Mead, J. (1999). *Megaptera novaeangliae*. *Mammalian Species*, 604, 1-9.
- Clapham, P. (2000). The humpback whale, seasonal feeding and breeding in a baleen whale in Mann, J., R.C. Connor, PL. Tyack y H. Whitehead (Ed.), *Cetacean Societies: field studies of dolphins and whales* (pp. 173-196). The University of Chicago, Chicago.
- Clapham, P. y Mead, J. (2008). *Megaptera novaeangliae*. *American Society of Mammalogist*, (604), 1-9.
- CPPS. (2014). Estado del Medio Ambiente Marino y Costero del Pacífico Sudeste. Comisión Permanente del Pacífico Sur - CPPS. Guayaquil, Ecuador. Serie Estudios Regionales, 4, 244 p.
- Craig, A. y 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. <https://doi.org/10.1139/z97-822>
- Cruz, M. (2012). Preferencia y rangos de tolerancia a la temperatura y salinidad de los Pterópodos y Heterópodos frente a la costa ecuatoriana. *Acta Oceanográfica del Pacífico*, Ecuador, 17(1).
- Dawbin, W. (1966). The seasonal migratory cycle of humpback whales in Norris, K. S. (Ed.), *Whales, dolphins and porpoises* (pp. 145-170) Univ. Calif. Press, Berkeley, California.
- Excoffier, L., Smouse, P. y Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Félix, F. y 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*, Ecuador, 9(1).

- Félix, F. y 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.  
<https://doi.org/10.4067/S0718-19572001000100006>
- Félix, F. (2003). Guía de campo para la observación de ballenas jorobadas en la costa de Ecuador. Fundación Ecuatoriana para el Estudio de Mamíferos Marinos (FEMM). Guayaquil, Ecuador. 28 Pp.
- Felix, F. y Haase, B. (2005). Distribution of humpback whales along the coast of Ecuador and management implications. *Journal of Cetacean Research and Management*, 7(1), 21.
- Félix, F. y Van Waerebeek, K. (2005). Whale mortality from ship strikes in Ecuador and West Africa. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 4(1), 55-60.  
<https://doi.org/10.5597/lajam00070>
- Félix, F., Caballero, S. y Olavarría, C. (2007). A preliminary assessment of the genetic diversity in humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from Ecuador and population differentiation with other Southern Hemisphere breeding grounds and feeding areas. In 59<sup>th</sup> IWC *Scientific Committee Meeting*, SC/59/SH11.
- Félix, F., Caballero, S. y Olavarría, C. (2012). Genetic diversity and population structure of humpback whales *Megaptera novaeangliae* from Ecuador based on mitochondrial DNA analyses. *Journal of Cetacean Research and Management*, 12(1), 71–77.
- Flórez-González, L. (1991). Humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the Gorgona Island, Colombian Pacific breeding waters: population and pod characteristics. *Memoirs of the Queensland Museum*, 30(2), 291-295.
- 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. y 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.

Gendron, D. y Urban, J. (1993). Evidence of feeding by humpback whale *Megaptera novaeangliae* in the Baja California breeding ground. *Marine Mammal Science*, 9(1), 76-80. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1993.tb00428.x>

Gladek, L. (2013). Abundance and site fidelity of hump-back whales (*Megaptera novaeangliae*) population in Esmeraldas, Ecuador [Tesis de Maestría. Universidad de Kiel y Universidad San Francisco de Quito] Repositorio Institucional – Universidad San Francisco de Quito, Quito.

González, L. (2002). Programa de acción para la conservación de especies: ballena jorobada *Megaptera novaeangliae*. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

González, E. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3), 377-388. <https://doi.org/10.3989/graellsia.2003.v59.i2-3.253>

Hartog, J., y Reijns, R. (2011). I3S contour manual: interactive individual identification system. I3S Contour. Recuperado el 06 de febrero del 2021 de <https://reijns.com/i3s/i3s-contour/>

Herman, L. y Antinaja, R. (1977). Humpback whales in the Hawaiian breeding waters: Population and pod characteristics. *Whales Research Institute*, 29, 59-85. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1993.tb00428.x>

Herman, L., Pack, A., Rose, K., Craig, A., Herman, E., Hakala, S. y Milette, A. (2010). 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(4), 736-768.

<https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2010.00441.x>

IWC. (2005). Report of the Scientific Committee. *Journal of Cetacean Research and Management*, 7, 235-246.

Katona, S., Baxter, B., Brazier, O., Kraus, S., Perkins, J., y Whitehead, H. (1979). Identification of humpback whales by fluke photographs. (Ed.) *Behavior of marine animals* (pp. 33-44). Springer, Boston.

Kaufman, G. y Forestell, P. (2003). Hawaii's humpback whales: A complete whale watchers guide. Island Heritage (Ed). *Pacific Whale Foundation*, Honolulu.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C. y Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

Krieger, K. (1987). Hydroacoustic monitoring of humpback whale prey. Seventh Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Univ. Miami. Miami, FLA. 80p.

Krützen, M., Barré, L., Möller, L., Heithaus, M., Simms, C. y Sherwin, W. (2002). A biopsy system for small cetaceans: darting success and wound healing in *Tursiops* spp. *Marine Mammal Science*, 18(4), 863-878. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01078.x>

Mackintosh, N. (1965). The stocks of whales. *Buckland Foundation Book*, London. 232p.

Mackintosh, N. (1970). Whales and krill in the twentieth century. *Antarctic Ecology*, 1, 195-212.

- Marshall T., Slate J., Kruuk L. y Pemberton J.M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639–655. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x>.
- Mate, B., Gisiner, R. y Mobley, J. (1998). Local and migratory movements of Hawaiian humpback whales tracked by satellite telemetry. *Canadian Journal of Zoology*, 76, 863-868. <https://doi.org/10.1139/z98-008>
- Mobley, J. y Herman, L. (1985). Transience of social affiliations among humpback whales *Megaptera novaeangliae* on the Hawaiian wintering grounds. *Canadian Journal of Zoology*, 63, 762-772. <https://doi.org/10.1139/z85-111>
- National Marine Fisheries Service (NMFS). (1991). Recovery plan for the humpback whale *Megaptera novaeangliae*. *National Marine Fisheries Service*, Silver Spring, Maryland. 105 p.
- Nemoto, T. (1970). Feeding pattern of baleen whales in the ocean. In Steele, J. H. (Ed.), *Marine food chains* (pp. 241-252). Oliver y Boyd, Edimburgo.
- Nieto García, M. (2019). Guía sobre la vida de la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) y su paso por el pacífico colombiano. [Tesis de pregrado, Universidad Santo Tomás] Repositorio institucional, Bogotá D.C.
- Nishiwaki, M. (1966). Distribution and migration of the larger cetaceans in the north Pacific as shown by Japanese whaling results. In Norris, K.S. (Ed.), *Whales, dolphins, and porpoises* (pp. 171-191). Universidad de California, Berkeley, California.
- Olavarría, C., Baker, C., Garrigue, C., Poole, M., Hauser, N., Caballero, S., Flórez-Gonzalez, L., Brasseur, M., Bannister, J., Capella, J., Clapham, P., Dodemont, R., Donoghue, M., Jenner, C., Jenner, M., Moro, D., Oremus, M., Paton, D., Rosenbaum, H. y Russell, K. (2007). Population structure of South Pacific humpback whales and the origin of the

eastern Polynesian breeding grounds. *Marine Ecology Progress Series*, 330, 257-268.  
<https://doi.org/10.3354/meps330257>

Olavarría, C. (2008). Population structure of Southern Hemisphere humpback whales. [Tesis de doctorado, Universidad de Auckland]. Nueva Zelanda.

Oña Lema, J. (2013). Humpback whale habitat preference and occurrence of songs in relation to depth and sea bottom structure off the coast of Esmeraldas, Ecuador [Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito]. Repositorio Institucional – Universidad San Francisco de Quito, Quito.

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.

Palsboll, P., Clapham, P, Mattila, D. y Vásquez, O. (1992). Composition and dynamics of humpback whale competitive groups in the West Indies. *Behaviour*, 122(3), 182-194.  
<https://doi.org/10.1163/156853992X00507>

Palsboll, P., Bérubé, M., Larsen, A., y Jorgensen, H. (1997). Primers for the amplification of tri-and tetramer microsatellite loci in baleen whales. *Molecular Ecology*, 6(9), 893-895.

Papastavrou, V. y Van Waerebeek, K. (1998). A note on the occurrence of humpback whales *Megaptera novaeangliae* in tropical and subtropical areas: the upwelling link. *International Whaling Commission*, 47, 47-945.

Parker, J. y Haswell, W. (1987). Zoología. Cordados. (Vol. 2). Reverté. España.

Peñafiel, N., Flores, D., Rivero De Aguilar, J., Guayasamin, J., y Bonaccorso, E. (2019). A cost-effective protocol for total DNA isolation from animal tissue. *Neotropical Biodiversity*, 5(1), 69-74. <https://doi.org/10.1080/23766808.2019.1706387>

- Pomilla, C. y Rosenbaum, H. (2005). Against the current: an inter-oceanic whale migration event. *Biology Letters*, 1(4), 476–479. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0351>
- Reilly, S., Bannister, J., Best, P., Brown, M., Brownell R., Butterworth, D., Clapham, P., Cooke, J., Donovan, G., Urbán, J. y Zerbini, A. (2008). *Megaptera novaeangliae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T13006A3405371.
- Remili, A., Gallego, P., Pinzone, M., Castro, C., Jauniaux, T., Garigliany, M., y Das, K. (2020). Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) breeding off Mozambique and Ecuador show geographic variation of persistent organic pollutants and isotopic niches. *Environmental Pollution*, 267, 115575.
- Rice D. (1998). Marine mammals of the world. Systematics and Distribution. *Society for Marine Mammalogy*, Allen Press Inc., Lawrence, Kansas.
- Rizzo, L., y Schulte, D. (2009). A review of humpback whales' migration patterns worldwide and their consequences to gene flow. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(5), 995.
- Rojas López, K. (2014). Análisis de la diversidad genética y conectividad de ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) del Pacífico Sudeste en la costa de Esmeraldas, Ecuador durante la temporada 2012 [Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito]. Repositorio institucional - Universidad San Francisco de Quito, Quito.
- Rosenbaum, H., Walsh, P., Razafindrakoto, M., Vely, R. y DeSalle. (1997). First description of a humpback whale breeding ground in Bale Antongil, Madagascar. *Conservation Biology*, 11(2), 312-314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007318>
- Rousset, F. y Raymond, M. (1995). Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, 140(4), 1413-1419.

- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Salden, D. (1989). An observation of apparent feeding by a sub-adult humpback whale of Maui, Hawaii. *Biology of Marine Mammals*, Pacific Grove, CA. 58 p.
- Salden, D., Herman, L., Yamaguchi, M. y Sato, F. (1999). Multiple visits of individual humpback whales *Megaptera novaeangliae* between the Hawaiian and Japanese wintering grounds. *Canadian Journal of Zoology*, 77, 504–508. <https://doi.org/10.1139/z99-005>
- Scheidat, M., Castro, C., Denking, J., Gonzalez, J., y Adelung, D. (2000). A breeding area for humpback whales *Megaptera novaeangliae* of Ecuador. *Cetacean Research and Management*, 2(3), 165-171.
- Scheidat, M. (2001). Abundance, habitat use, behaviour and management of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the Machalilla National Park, Ecuador [Tesis de doctorado, Universidad Christian Albrecht de Kiel] Kiel, Alemania.
- Seton, R., Allen, J. y Todd, S. (2002). Curation of the North Atlantic humpback whale catalogue and associated databases. Progress Report to Northeast Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service. 10 pp.
- Siciliano, S. (1994). Preliminary report on the occurrence and photo identification of humpback whales in Brazil. *International Whaling Commission*, 45, 138-140.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Thompson, J., Higgins, D., y Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Valsecchi, E. y Amos, W. (1996). Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology.*, 5, 151-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1996.tb00301.x>
- Valsecchi, E., Hale, P., Corkeron, P. y Amoss, W. (2002). Social structure in migrating humpback whales. *Molecular Ecology*, 11, 507-518. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01459.x>
- Valsecchi, E., Corkeron, P., Galli, P., Sherwin, W. y Bertorelle, G. (2010). Genetic evidence for sex-specific migratory behavior in western South Pacific humpback whales. *Marine Ecology Progress Series*, 398, 275–286. <https://doi.org/10.3354/meps08280>
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W., Wills, D. y Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, 4, 535-538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Van Waerebeek, K. (2003). A newly discovered population of Humpback whales in the northern Gulf of Guinea. *Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals Bulletin* 18, 6-7. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27013.96486>

Waldick, R., Brown, M. y White, B. (1999). Characterization and isolation of microsatellite loci from the endangered North Atlantic right whale. *Molecular Ecology*, 8(10), 1763-1765. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00723-6.x>