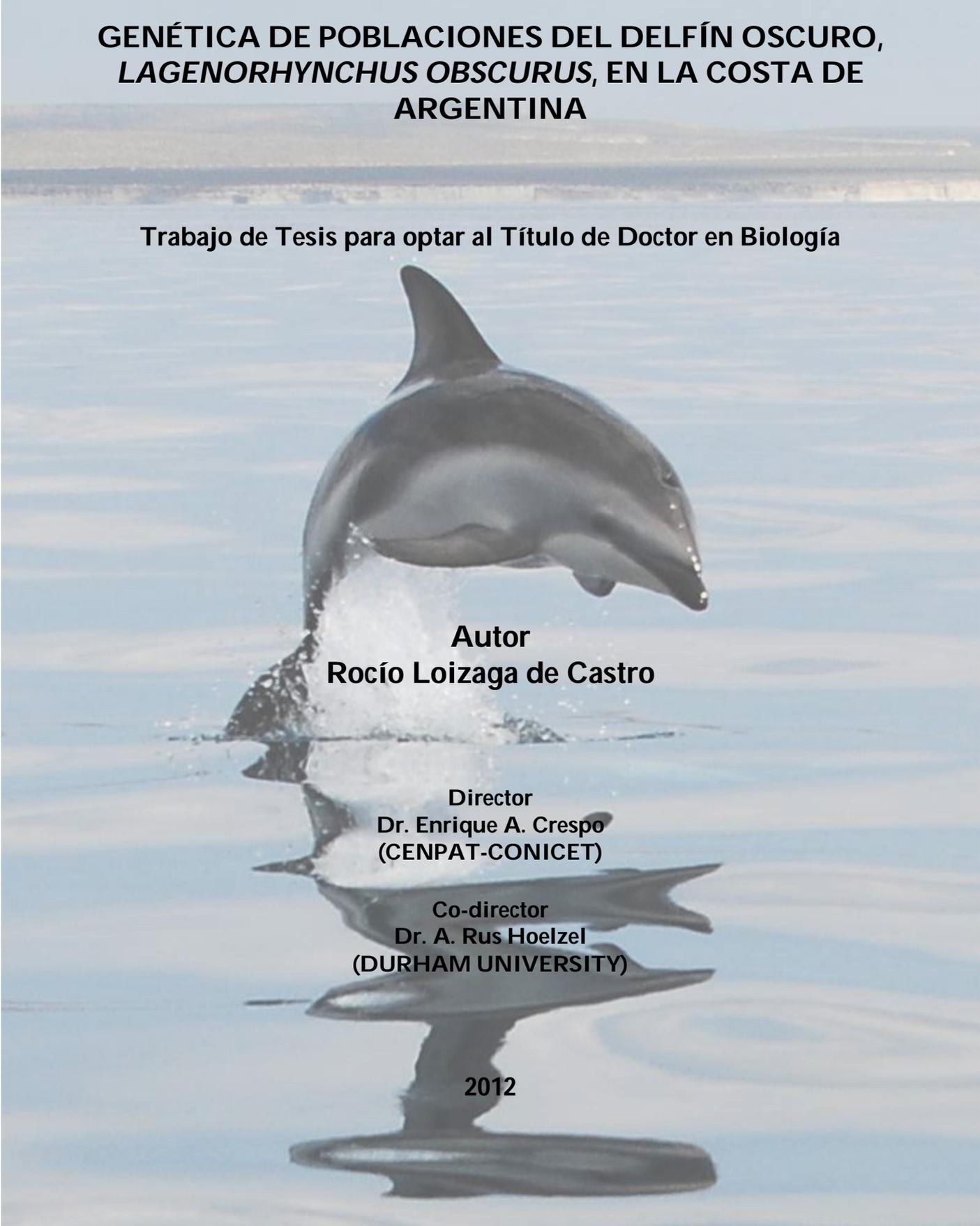




GENÉTICA DE POBLACIONES DEL DELFÍN OSCURO, *LAGENORHYNCHUS OBSCURUS*, EN LA COSTA DE ARGENTINA

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología



**Autor
Rocío Loizaga de Castro**

**Director
Dr. Enrique A. Crespo
(CENPAT-CONICET)**

**Co-director
Dr. A. Rus Hoelzel
(DURHAM UNIVERSITY)**

2012

"Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución"

T. Dobzhansky



INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	6
RESUMEN	9
SUMMARY.....	10
ESTRUCTURA DE LA TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA	11
INTRODUCCIÓN GENERAL	12
MARCO TEÓRICO.....	12
EL DELFÍN OSCURO, COMO CASO DE ESTUDIO	18
HIPÓTESIS DE ESTUDIO	24
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
ÁREA DE ESTUDIO	26
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	34
CAPÍTULO I.....	38
RESPUESTA COMPORTAMENTAL DEL DELFÍN OSCURO A LA TOMA DE BIOPSIAS MEDIANTE EL PALO DE BIOPSIA	38
INTRODUCCIÓN	38
METODOLOGÍA.....	39
Área de Muestreo	39
Muestreo de Biopsias.....	40
Análisis Estadísticos.....	46
Proporción de sexos en los delfines oscuros.....	47
RESULTADOS.....	47
Muestreo de Biopsias.....	47
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIÓN E IMPLICANCIA EN EL BIENESTAR ANIMAL	56
CAPÍTULO II	58
METODOLOGÍA DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES.....	58
MUESTRAS DE BIOPSIA Y NECROPSIAS.....	58
EXTRACCIÓN DE ADN	58
ADN MITOCONDRIAL.....	59
MICROSATÉLITES.....	61
AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DEL ADN MITOCONDRIAL.....	64
SELECCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES	66
AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES ZFX Y ZFY	69
MUESTRAS DE HUESOS Y DIENTES.....	70
EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN.....	70
CAPÍTULO III.....	72
ESTRUCTURA POBLACIONAL DEL DELFÍN OSCURO EN LA COSTA DE ARGENTINA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL Y MICROSATÉLITES	72
INTRODUCCIÓN	72
MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
Toma de muestras.....	78
Extracción y Amplificación de ADN.....	78
Análisis Estadísticos.....	79
ADN mitocondrial.....	79
Estructura poblacional	79
AMOVA	79

SAMOVA	79
Flujo génico.....	80
Prueba de Mantel	81
<i>Microsatélites</i>	81
Estructura poblacional	81
AMOVA	81
STRUCTURE.....	82
Flujo génico.....	82
Prueba de Mantel	83
RESULTADOS.....	83
<i>ADN mitocondrial</i>	83
Estructura poblacional	83
AMOVA	83
SAMOVA	86
Flujo Génico	87
Prueba de Mantel	88
<i>Microsatélites</i>	90
Estructura poblacional	90
AMOVA	90
STRUCTURE.....	90
Flujo Génico	92
Prueba de Mantel	93
DISCUSIÓN	94
CAPÍTULO IV.....	98
DIVERSIDAD GÉNICA Y DEMOGRAFÍA HISTÓRICA DEL DELFÍN OSCURO,	
LAGENORHYNCHUS OBSCURUS, EN EL LITORAL ARGENTINO	98
INTRODUCCIÓN	98
MATERIALES Y MÉTODOS.....	100
<i>Toma de muestras</i>	100
<i>Extracción, Amplificación y Alineamiento ADN mitocondrial y Microsatélites</i>	101
<i>Índices de diversidad génica</i>	101
ADN mitocondrial	101
Microsatélites	102
<i>Historia demográfica</i>	102
Pruebas de Neutralidad	102
Distribuciones de Diferencias Pareadas (Curvas de Mismatch)	104
<i>Red de Haplotipos</i>	105
<i>Curvas de Rarefacción</i>	106
<i>Determinación de sexo</i>	106
RESULTADOS.....	107
<i>Diversidad Génica</i>	107
ADNmitocondrial	107
Microsatélites	107
<i>Historia Demográfica</i>	108
Pruebas de Neutralidad	108
Distribuciones de diferencias pareadas o “Curvas de Mismatch”	109
<i>Red de Haplotipos</i>	112
<i>Curvas de Rarefacción</i>	116
<i>Determinación de sexo</i>	117
DISCUSION	118
CONSIDERACIONES FINALES.....	122
ANEXO I	125
POP-01 PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE HUESOS.....	125
ANEXO II.....	127
ANEXOIII	128
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

TRABAJO DE RESPALDO..... 158

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de muchas instituciones, organismos y personas que colaboraron a lo largo de todo su desarrollo hasta su finalización.

En primer lugar quiero dar un agradecimiento a mis directores Enrique Crespo y Rus Hoelzel, gracias por confiar en mí y por brindarme siempre su apoyo incondicional. Gracias Kike por guiarme, por el constante esfuerzo, por estar siempre a mi lado y por brindarme la oportunidad de trabajar en el mundo de los mamíferos marinos. Gracias Rus por abrirme las puertas de tu laboratorio y la oportunidad de aprender y conocer un nuevo mundo, el de la biología molecular. A los dos gracias por su paciencia, sus consejos y por todos los momentos compartidos.

Quiero agradecer a todas las instituciones que colaboraron en la realización de esta tesis doctoral, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET por brindarme una beca doctoral, al Centro Nacional Patagónico por darme lugar de trabajo y a la Universidad de Durham (Inglaterra) por darme un lugar en el laboratorio de biología molecular.

También debo agradecer a varias instituciones por su apoyo financiero: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICTs 11679, 33934, 2110), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Fundación BBVA (BIOCON 08-194/9), Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (GEF/PNUD ARG-02/018), a The Mohamed bin Zayed Species Conservation Fund y Society for Marine Mammalogy Grants in Aid of Research por la beca que me otorgaron para terminar mi tesis doctoral.

Debo agradecer al Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", por permitirme revisar la colección de mamíferos marinos, especialmente al Dr. David Flores encargado de la Colección de Mastozoología. A Gustavo Chiaramonte por darnos alojamiento en la Estación Hidrobiológica de Pto. Quequén en 3 oportunidades y sobretodo por la buena onda y suerte en el muestreo. Al Museo de La Plata por su hospitalidad durante mi visita, especialmente a Itatí Olivares, encargada de la Colección de Mastozoología.

A la Dra. R. Natalie P. Goodall, Museo Acatashún, por ceder la muestra de hueso y diente proveniente de Tierra del Fuego. A Fabiana Álvarez de la Fundación Aquarium de Mar del Plata, por las muestras de delfín oscuro que cedieron para la realización de esta tesis.

A la Dra. Larissa Rosa de Oliveira y Fernando R.V. Lopes por la extracción y amplificación de las muestras de huesos en el laboratorio de ADN antiguo de la Universidad do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS, Brasil. Especialmente a Lari por tener siempre ganas de colaborar, por su ayuda en tantos ideas y trabajos y lo más importante por la amistad forjada a lo largo de estos años.

Al Dr. Néstor Basso y Lic. Luciano Real por enseñarme los primeros pasos en un laboratorio de genética. Además por la extracción de las muestras de hueso y diente en el lab del CENPAT.

Quisiera agradecer a todos los patrones de embarcaciones: Néstor Ortiz, Hormiga, Bebote, Sergio Fernández, Chochi Owen, Rafael Benegas y Fabián Quiroga, por tantas horas compartidas arriba del bote y por hacer que las campañas sean la parte más divertida de esta tesis, gracias a todos por su buena onda.

A todos mis compañeros del LAMAMA, Marina, Barbie, Florencia, Soledad, Silvina, Damián, Griselda, Mariana, Silvana y Néstor gracias por su ayuda incondicional y por compartir tantos momentos de la vida tanto personal como laboral.

A todos los chicos del Lab 3 de la Universidad de Durham, Iris (México), George (Grecia), Dilleta (Italia), Mark (Sudáfrica), Ross (Escocia), Eulalia (Colombia), Karis (Inglaterra), Joane (Inglaterra) y Laura (Inglaterra) por ayudarme en el lab y por la amistad que hasta el día de hoy tenemos. Gracias por todo, por las peleas de a quien le tocaba poner la radio, gracias a internet por escuchar la 100!!! Gracias a ellos aprendí no solo las técnicas moleculares sino las costumbres, comidas e idiomas de todas partes del mundo. Una gran experiencia personal.

Un gracias especial a los chicos de la oficina, Dulcinea (Silvi) y el chico del medio (Dami) por tantas horas de trabajo, mates, música, libros, bebés y charlas compartidas. Por

soportarme en los últimos tiempos, buenos y malos, siempre alentándome para seguir adelante!

A Leo Tamini, Gisela Giardino y todo el personal de la Estación de Hidrobiología, por hacer muy divertidas las campañas a Puerto Quequén.

A mi gran amiga Laura Prieto por estar siempre a mi lado a pesar de los 2000 Km. que nos separan. A Lore, Nora, Merce y Lau S. por mantener esta amistad y entender la locura de ser biólogo! Las quiero y extraño.

A Yani por todos estos años compartidos de amistad, juntas superamos la tesis de licenciatura y juntas fuimos por más, por la doctoral y acá estamos las 2. Gracias por estar siempre. Vamos por más!!!

A mi querida gran amiga la Dra. Martinazzo, gracias por ayudarme siempre pero sobretodo por la semana de Mayo que te volví loca, maldito tiempo de expansión, jajaja... solo vos podes entenderlo! y Aislamiento por distancia?? No! Mil gracias! Sin tu ayuda no hubiese terminado tan tranquila!

A mi familia, papa, mamá, Vero, Nico, Deny, Lucas y Juani sin el apoyo y la confianza de todos ellos no estaría donde estoy ni sería la persona que soy. Gracias por entender y estar siempre a mi lado. Estaré eternamente agradecida por la familia que tengo, los quiero!!!

Y por último, un muy especial agradecimiento a mis grandes amores, gracias Juan por acompañarme y caminar a mi lado en esta aventura que es la vida, sobretodo gracias por la hermosa familia que estamos construyendo día a día. Esta tesis es para Allegra la alegría de mi vida, por sus sonrisas y abrazos de todos los días. Los quiero con todo mi corazón!!!!

GENÉTICA DE POBLACIONES DEL DELFÍN OSCURO, LAGENORHYNCHUS OBSCURUS, EN LA COSTA DE ARGENTINA

RESUMEN

El delfín oscuro (*Lagenorhynchus obscurus*) representa una de las especies más abundantes de pequeños cetáceos en aguas argentinas. Durante la década del 90, se han documentado importantes niveles de mortalidad incidental de delfines oscuros en pesquerías de cerco y arrastre a lo largo de la costa Argentina, a los que actualmente se han sumado impactos causados por la actividad turística. A pesar de todos los estudios realizados en la especie, se desconocía la estructura genética de la población a lo largo de la costa de Argentina. Es por esto, que el objetivo de esta tesis fue determinar el grado de aislamiento poblacional del delfín oscuro en el litoral argentino, mediante el uso de marcadores moleculares neutros, región control del ADN mitocondrial y 7 loci de microsatélites. Además se estimó la variabilidad genética de las poblaciones locales, se documentó el flujo génico entre poblaciones regionales y los cambios demográficos históricos. De 6 localidades (Buenos Aires, Golfo San Matías, Golfo San José, Golfo Nuevo, Golfo San Jorge y Ushuaia), se obtuvo un total de 33 haplotipos a partir de 119 secuencias de la región control del ADN mitocondrial, con una longitud de 413 pb. En total se genotipificaron 100 individuos de 4 localidades (Golfo San Matías, Golfo San José, Golfo Nuevo y Golfo San Jorge) para 7 loci de microsatélites. La amplia distribución geográfica de los haplotipos, la baja diversidad genética, la alta diversidad haplotípica, las distribuciones de diferencias pareadas (Curvas de Mismatch), alta heterocigocis y la ausencia de una estructura genética asociada a su distribución geográfica es congruente con lo esperado para poblaciones con una reciente historia evolutiva, las cuales son caracterizadas por una rápida expansión demográfica en el pasado a fines del Pleistoceno. Asimismo, el análisis molecular de varianza (AMOVA) para ADN mitocondrial y microsatélites como el análisis de asignación basada en individuos implementadas en el programa Structure y el método de Evanno para los loci microsatélites, mostraron que no existe diferenciación entre las poblaciones locales a lo largo del litoral argentino. Por lo que la variabilidad genética de delfín oscuro en el Océano Sudoccidental se encuentra distribuida homogéneamente y no se detecta más de una Unidad de Manejo.

**POPULATION GENETICS OF DUSKY DOLPHIN,
LAGENORHYNCHUS OBSCURUS, ALONG THE ARGENTINE COAST**

SUMMARY

The dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*) is one of the most common species of small cetaceans off the Argentina coast. During the 90's, important levels of incidental mortality for the dusky dolphin in purse seine and trawling fisheries along the Argentine coast have been documented, to which dolphin sighting activities were added recently. Despite all studies in the species, the population genetic structure along the coast of Argentina remains unknown. Therefore, the objective of this thesis was to determine the degree of population isolation of the dusky dolphin in the Argentine coast, by using neutral molecular markers, mitochondrial DNA control region and 7 loci microsatélites. In addition, genetic variability of local populations, gene flow between regional populations and demographic history were estimated. From 6 locations (Buenos Aires, Golfo San Matías, Golfo San José, Golfo Nuevo, Golfo San Jorge and Ushuaia), a total of 33 haplotypes from 119 sequences of the control region of mitochondrial DNA were obtained, with a length of 413 bp. In addition, a total of 100 individuals were genotyped at 4 locations (Golfo San Matías, Golfo San José, Golfo Nuevo, and Golfo San Jorge) for 7 microsatellite loci. The wide geographical distribution of haplotypes, the low genetic diversity, high haplotype diversity, distributions of pairwise differences (Mismatch curves), high heterozygosity and the absence of genetic structure associated with its geographic distribution is consistent with expectations for populations with a recent evolutionary history, which are characterized by a rapid population growth in the past at the end of Pleistocene. Moreover, analysis of molecular variance (AMOVA) for mtDNA and microsatellites as well as individuals based assignment test implemented in STRUCTURE software and Evanno method for microsatellite loci showed that there is no differentiation between local populations along the Argentine coast. Thus, the genetic variability of dusky dolphin in the ocean is distributed homogeneously and it was not detected more than one management unit.

ESTRUCTURA DE LA TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

Título: Genética de poblaciones del delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*, en la costa de Argentina.

Introducción General

- Contexto teórico
- El delfín oscuro, como caso de estudio
- Hipótesis de estudio
- Objetivo general
- Objetivos específicos
- Área de estudio
- Recolección de muestras

Capítulo I: Respuesta comportamental del delfín oscuro a la toma de biopsia en la costa de Argentina.

Capítulo II: Metodología en el laboratorio de biología molecular, extracción de ADN y amplificación de marcadores moleculares.

Capítulo III: Estructura poblacional del delfín oscuro en la costa de Argentina mediante el análisis de ADN mitocondrial y microsatélites.

Capítulo IV: Diversidad génica y Demografía Histórica del delfín oscuro en el litoral argentino.

Consideraciones Finales

Anexos

Referencias Bibliográficas

Trabajo de Respaldo

INTRODUCCIÓN GENERAL

MARCO TEÓRICO

Los cetáceos poseen un alto potencial dispersivo (Baker et al., 1993; Rosel et al., 1995; Bakke et al., 1996), disminuyendo de esta forma la probabilidad de diferenciarse genéticamente entre poblaciones. Por otro lado, la distancia geográfica no está necesariamente correlacionada con la divergencia genética en los cetáceos (Hoelzel 1998a). Algunos estudios de foto-identificación (Würsig & Jefferson, 1990), comportamiento y estudios de linajes de ADN mitocondrial revelaron casos de divergencia local entre poblaciones intraespecíficas (Hoelzel & Dover, 1991; Dowling & Brown, 1993; García-Martínez et al., 1995; Hoelzel et al., 1998a, b; Pichler et al., 1998). La divergencia genética puede ocurrir en pequeñas escalas geográficas estando el flujo génico limitado tanto por barreras geográficas (Dowling & Brown, 1993), heterogeneidad de recursos (Hoelzel & Dover, 1991; Hoelzel, 1998; Hoelzel et al., 1998a, b), especialización de hábitat (Pichler et al., 1998) y fidelidad al sitio de reproducción o alimentación (Shane et al., 1986; Baker et al., 1990, 1993; Duffield & Wells, 1991). Por otro lado, algunos autores (Hoelzel et al., 1998a, b; Natoli et al., 2004, 2005) sugieren que la especialización en recursos locales por medio de la consolidación de distintas estrategias de forrajeo entre grupos podría favorecer la filopatría, y progresivamente dirigir una divergencia genética.

La estructura de la población de especies marinas pelágicas pueden ser moldeadas por muchos factores, tales como las corrientes de agua, la topografía del mar, temperatura del agua, el ciclo vital y el comportamiento (por ejemplo, Block et al., 2001; Bekkevold et al., 2005; Bowen et al., 2005; Stevick et al., 2006; Fontaine et al., 2007). Sin embargo, los límites para los genes son difíciles de predecir en el medio marino. Esto es particularmente cierto para muchas especies de cetáceos, que pueden llevar a cabo migraciones a lo largo de todo un océano y pueden habitar una gran variedad de hábitats desde costeros a mar abierto en aguas tropicales, templadas y polares (Martin & Reeves 2002). Procesos históricos, en particular las glaciaciones del Pleistoceno, se han propuesto como un importante factor que condujo a la diferenciación genética entre las especies marinas, promoviendo la especialización e influyendo en la distribución de las especies en las zonas costeras (por ejemplo, Reeb & Avise 1990, Hewitt 2000; Hayano et al., 2004; Rosa et al., 2005; Adams et al.,

2006; Haney et al., 2007). Las fluctuaciones globales del clima durante el Pleistoceno y sus cambios asociados al nivel del mar han alterado las temperaturas de la superficie marina y el flujo de las corrientes oceánicas (Hewitt 1996, 2000; Clark et al., 1999). Tales acontecimientos históricos han influido en la distribución y conectividad de los organismos marinos, lo que conduce a la extinción de especies, así como también pueden actuar como conductores de biodiversidad (Hewitt 1996). Otro factor importante aparentemente en la formación de la estructura de la población en algunas especies de delfines, especialmente los que se encuentran principalmente en hábitats costeros es la dependencia del hábitat local. Los cetáceos se separaron de sus antepasados terrestres aproximadamente 53 Ma (Arnason et al., 2004). Durante su historia evolutiva, la especialización de los recursos locales mediante la consolidación de las diferentes estrategias de alimentación entre los grupos condujo a la eco-diversidad morfológica (Slater et al., 2010), así como a la evolución convergente (Natoli et al., 2004, 2006), particularmente en la familia Delphinidae, que es la familia más rica en especies (LeDuc 2009). Se ha hipotetizado que durante estos cambios climáticos los rangos de distribución de muchas especies marinas fueron restringidas debido a la creación de barreras físicas (por ejemplo, cambios en el nivel del mar y la temperatura del mar) que redujeron el flujo de genes, incluso entre poblaciones próximas, y aumentó el efecto de las fuerzas evolutivas tales como la deriva genética y la selección (Avice et al., 1998; Hewitt 1996, 2000; Haney et al., 2007). Tras el final de las glaciaciones, las poblaciones que antes estaban limitadas en áreas pequeñas y específicas probablemente se expandieron siguiendo un modelo de escalón ("Stepping Stone Model", dispersión que se produce entre demes vecinos), o experimentó una súbita expansión demográfica, que podría explicar los diferentes patrones de diversidad genética que se encuentran en las poblaciones contemporáneas (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending 1992; Austerlitz et al., 1997; Ray et al., 2003; Excoffier 2004; Wegmann et al., 2006).

Estudios recientes en especies de cetáceos han sugerido un impacto de los cambios palaeoceanográficos en la historia de la población de estos animales. Por ejemplo, un período prolongado de calentamiento global durante el Plioceno se ha sugerido como un factor desencadenante en la especiación de dos especies de ballenas minke, la ballena minke antártica, *Balaenoptera bonaerenses*, y la ballena minke común, *Balaenoptera acutorostrata*, (Pastene et al., 2007). Los autores infieren que las elevadas temperaturas de la superficie del océano pueden facilitar alopatria entre las poblaciones pelágicas debido a la reducción en las surgencias y en la fragmentación de áreas de alimentación, lo que eventualmente puede

conducir a la especiación. Igualmente, cambios en la productividad primaria durante las glaciaciones del Pleistoceno y la abundancia de presas, se cree que han dado forma a la filogeografía del delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*, (Harlin-Cognato et al. 2007). Amaral y col. (2012), también sugieren que el delfín común, *Delphinus delphis*, sufrió recurrentes expansiones demográficas concomitantes con los cambios en la temperatura superficial del mar durante el Pleistoceno y los aumentos en la disponibilidad de recursos asociados, diferentes entre el Océano Atlántico Norte y las cuencas del Océano Pacífico. Las glaciaciones también han influido en la demografía y la filogeografía de la marsopa común, *Phocoena phocoena* (Taguchi et al., 2010) y el delfín de hocico blanco, *Lagenorhynchus albirostris* (Banguera-Hinestroza et al., 2010). Lo anteriormente mencionado destaca el impacto que el cambio climático puede tener sobre la distribución y abundancia de los depredadores marinos y sus consecuencias ecológicas de los ecosistemas marinos.

El entendimiento de los procesos que causan subdivisión en las poblaciones de cetáceos es especialmente desafiante ya que muchas de estas especies habitan amplios rangos geográficos con escasas barreras. La estructura de una población en organismos marinos puede estar influenciada por características físicas del ambiente marino, por ejemplo, la concentración de clorofila, salinidad, turbidez del agua, temperatura superficial del mar, son algunas variables que pueden explicar, al menos parcialmente, los patrones genéticos. Además, las zonas de surgencias (“*upwellings*”), corrientes oceánicas, profundidad, y la pendiente del fondo marino se han identificado como factores importantes que influyen en la distribución y abundancia de los cetáceos, y puede influir en la estructura de la población y sus patrones de dispersión (Fullard et al., 2000; Davis et al., 2002). Recientemente, muchas investigaciones sobre los mamíferos marinos se encuentran dirigidas a la identificación y protección de las unidades poblacionales localmente adaptadas.

La genética de poblaciones permite la cuantificación de la variabilidad mediante la descripción de los cambios en la frecuencia alélica a través del tiempo, respecto a un carácter en particular; y el análisis de las causas que conducen a esos cambios. Es por esto que se relaciona estrechamente con la genética evolutiva dado que la evolución depende, en gran medida, de los cambios en las frecuencias génicas (Doolittle, 1987; Hartl, 1988; Hedrick, 1985). Aunque resulta prácticamente imposible inspeccionar todas las variables genéticas presentes en una población, se puede estudiar una población a través de la variación de

fenotipos individuales (descripción de ciertos rasgos morfológicos y fisiológicos) o de sus genotipos (marcadores moleculares) (Falconer & Mackay, 1996).

Una población genética es la suma de las frecuencias alélicas de todos los genes en esa población. Las poblaciones cambian o evolucionan porque sus frecuencias génicas experimentan cambios. Varios factores pueden producir cambios en la capacidad de un individuo para sobrevivir hasta que logre la reproducción. Si cambia la adaptación de un individuo, los genotipos en la generación subsiguiente no estarán directamente relacionados con las frecuencias génicas de la primera población (Doolittle, 1987; Hartl, 1988; Hedrick, 1985). Dado que los cambios en las poblaciones requieren cambios en las frecuencias génicas, es importante entender de qué manera pueden cambiar estas frecuencias. Los factores que determinan la diversidad genética son cinco: mutación, migración, recombinación, selección y deriva génica.

Las poblaciones son entidades muy complejas y difíciles de definir, teniendo en cuenta en qué paradigmas está definido el concepto de "población", el paradigma ecológico define una población como un grupo de individuos de la misma especie que co-ocurren en el espacio y el tiempo y tienen oportunidad de interactuar unos con otros por separado, por otro lado la definición de "población" dentro del paradigma evolutivo es un grupo de individuos de la misma especie que viven en estrecha proximidad suficiente que cualquier miembro del grupo potencialmente pueden aparearse con los demás miembros (Camus & Lima, 2002; Waples & Gaggiotti, 2006). Para la genética de poblaciones la unidad de estudio es la unidad local de apareamiento porque los cambios en las frecuencias alélicas ocurren dentro de estas unidades limitadas y pueden dar lugar a la evolución de los caracteres adaptativos (Doolittle, 1987; Hartl, 1988; Hedrick, 1985). Estas unidades locales se denominan generalmente poblaciones locales o subpoblaciones (Waples & Gaggiotti, 2006). En principio, el tamaño de una población no es infinitamente grande ni tampoco permanece constante. Una población puede ser considerada como una unidad. Sin embargo, en muchas especies y en numerosas circunstancias, las poblaciones se subdividen en unidades de menor tamaño. Dicha subdivisión puede ser el resultado de factores ecológicos (*e.j.*, los hábitats discontinuos) o de comportamiento. Si una población se subdivide, los vínculos entre sus partes pueden variar según el grado de flujo génico real que exista. Una población se considera estructurada si (i) hay deriva genética en algunas de sus subpoblaciones, (ii) la migración no se da uniformemente en toda la población, o (iii) el apareamiento no ocurre al

azar en toda la población. La estructura de una población afecta el grado de variación genética y los patrones de su distribución (Doolittle, 1987; Hartl, 1988; Hedrick, 1985).

El flujo génico se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra. Las poblaciones de una especie pueden intercambiar genes en mayor o menor grado, ya sea genes nucleares o genomas uniparentales como la mitocondria o el cloroplasto, debido al movimiento de gametos, semillas, individuos juveniles o adultos (en animales y en el caso de algunas plantas), así como por eventos de extinción y recolonización de poblaciones enteras (Slatkin, 1985), aunque cabe mencionar que los migrantes que no se reproducen en la población a la que migraron no contribuyen al flujo génico. El estudio del flujo génico ha sido un tema vital en biología evolutiva, ya que es un componente importante en la estructura de las poblaciones. Anteriormente se pensaba que el flujo génico en general era muy restringido y de poca importancia evolutiva (Levin, 1981). Sin embargo, se ha observado en distintas especies que los niveles estimados de flujo génico generalmente son altos (Riesberg & Burke, 2001) y que pueden actuar como una fuerza que mantiene integrada a la especie, además de influir en procesos ecológicos. Por ejemplo pueden determinar la persistencia y adaptación de poblaciones locales, las tasas de extinción de las especies, la evolución de los rangos de distribución de las especies y otras propiedades ecológicas (Whitlock & McCauley, 1999). Asimismo, si el flujo génico entre poblaciones de una especie es alto, todas ellas evolucionan de manera conjunta (a menos que sea contrarrestado por selección o deriva génica), pero si es muy bajo, empiezan a divergir, lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y al establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Slatkin, 1994).

Los problemas de conservación de los mamíferos marinos actualmente están relacionados con el cuidado y la conservación de los ambientes que ellos utilizan y de los cuales dependen para subsistir. Algunas de las mayores amenazas se encuentran en las actividades extractivas como la pesca (uso no sustentable, mortalidad incidental, etc.), competencia con la industria pesquera por los recursos, la explotación petrolera, actividades turísticas, la contaminación química, la pérdida o fragmentación de hábitat, colisiones con buques, captura para exhibición en oceanarios, enfermedades y exposición a biotoxinas, efectos del cambio climático (Reeves et al., 2003). Las especies de mamíferos marinos con rangos de distribución y uso de hábitat restringidos o especies endémicas son especialmente vulnerables a las perturbaciones inducidas por la población humana (Pichler & Baker, 2000).

El conocimiento de la estructura de la población es fundamental para evaluar los cambios en la población, interpretar tendencias poblacionales para así lograr un manejo sustentable de las poblaciones naturales (DeSalle & Amato, 2004).

En el Mar Argentino habitan 37 de especies de cetáceos y en sus costas reproducen por lo menos 3 especies de pinnípedos, sin contar aquellas de distribución cosmopolita cuyas poblaciones locales las utilizan para su alimentación o como ruta migratoria (Crespo, 2002). Sin embargo, los estudios de genética solo involucran 3 especies de pinnípedos y 6 especies cetáceos. Entre las especies de pinnípedos sobre las que se volcaron mayormente los estudios de genética de poblaciones en nuestro país, se encuentran, el elefante marino del sur, *Mirounga leonina*, (Hoelzel et al., 1993, 1999, 2001; Slade et al., 1998; Fabiani et al., 2003), el lobo marino común, *Otaria flavescens*, (Szapkievich et al., 1999; Freilich 2004; Túnez et al., 2007, 2010; Feijoo et al., 2011) y el lobo marino de dos pelos o lobo fino, *Arctocephalus australis* (Túnez et al., 2007). Entre los cetáceos, los estudios esencialmente incluyen a la ballena franca austral, *Eubalaena australis*, (Patenaude et al., 2007; Valenzuela et al., 2009) y varias especies de pequeños cetáceos como, el delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*, (Cassens et al., 2003, 2005; Harlin-Cognato et al., 2007), la tonina overa, *Cephalorhynchus commersonii*, (Robineau et al., 2007; Pimper et al., 2009, 2010; Cipriano et al., 2011), la franciscana, *Pontoporia blainvillei*, (Secchi et al., 1998, 2003; Lázaro et al., 2004; Mendez et al., 2008, 2010a,b), el delfín común, *Delphinus delphis*, (Natoli et al., 2006), la marsopa espinosa, *Phocoena spinipinis*, (Rosa et al., 2005) y la marsopa de anteojos (*Phocoena dioptrica*) (Pimper et al., 2012). Sin embargo, la información existente es fragmentaria y heterogénea por áreas y por especie. Además la mayoría de los estudios comprometen escalas globales, enfocados en la filogeografía o estudios taxonómicos, siendo los estudios a escalas locales poblacionales escasos o inexistentes para la mayoría de las especies de mamíferos marinos en Argentina. El único trabajo que puede mencionarse como ejemplo de plan integrado de manejo y conservación basados en estructura genética poblacional es la designación de unidades de manejo poblacionales, FMAs, en franciscana a lo largo de su distribución en la costa atlántica (Secchi et al., 1998, 2003; Lázaro et al., 2004; Mendez et al., 2008, 2010a, b). Por lo tanto los objetivos de los estudios genéticos a futuro deberían enfocarse en identificar las unidades poblacionales de las especies de mamíferos marinos, a fin de brindar las herramientas necesarias para su conservación y manejo a la luz de los impactos a lo largo de la costa de Argentina producidos por el hombre y ante un escenario de cambio climático.

EL DELFÍN OSCURO, COMO CASO DE ESTUDIO

El género *Lagenorhynchus* contiene 6 especies de delfines, incluyendo al delfín oscuro (*Lagenorhynchus obscurus*; Gray 1828) (Fig. 1), aunque es probable la existencia de un cambio taxonómico en un futuro cercano. Análisis moleculares de secuencias de citocromo *b* (ADN mitocondrial) por LeDuc y colaboradores (1999), mostraron las primeras evidencias de que las 6 especies incluidas en el género *Lagenorhynchus* no se encuentran cercanamente emparentadas (Fig. 1). Dos de las especies actualmente reconocidas dentro del género son el delfín de flancos blancos o delfín del Atlántico (*Lagenorhynchus acutus*) y el delfín hocico blanco (*Lagenorhynchus albirostris*), estas dos especies no se encuentran cercanamente emparentadas con las otras 4 especies del género ni entre ellas mismas (LeDuc et al., 1999). El delfín oscuro y las otras 3 especies si se encuentran cercanamente emparentadas, a pesar de estar una de ellas confinada al Océano Pacífico Norte, y las otras 3 especies solo se encuentran en los océanos del Hemisferio Sur. Sin embargo también se encuentran emparentadas a delfines que actualmente se clasifican en otros 2 géneros, dos especies del género *Lissodelphis*, *L. borealis* o delfín septentrional sin aleta en el océano Pacífico Norte, *L. peronii* o delfín liso del sur o delfín meridional sin aleta en el Hemisferio Sur y cuatro especies del género *Cephalorhynchus*, *C. commersonii* y *C. eutropia* en América del Sur, *C. heavisidii* en Sudáfrica y *C. hectori* en Nueva Zelanda. Por lo expuesto resulta claro que la resolución taxonómica del género se encuentra aun inconclusa. Recientemente, varios autores han focalizado el esfuerzo en comprender las relaciones evolutivas dentro del género (por ejemplo., LeDuc et al., 1999; Pichler et al., 2001; May-Collado & Agnarsson, 2006; Harlin-Cognato & Honeycutt, 2006), donde incluyen a todas las especies dentro de la subfamilia *Lissodelphininae*, excepto las dos especies del Atlántico Norte.

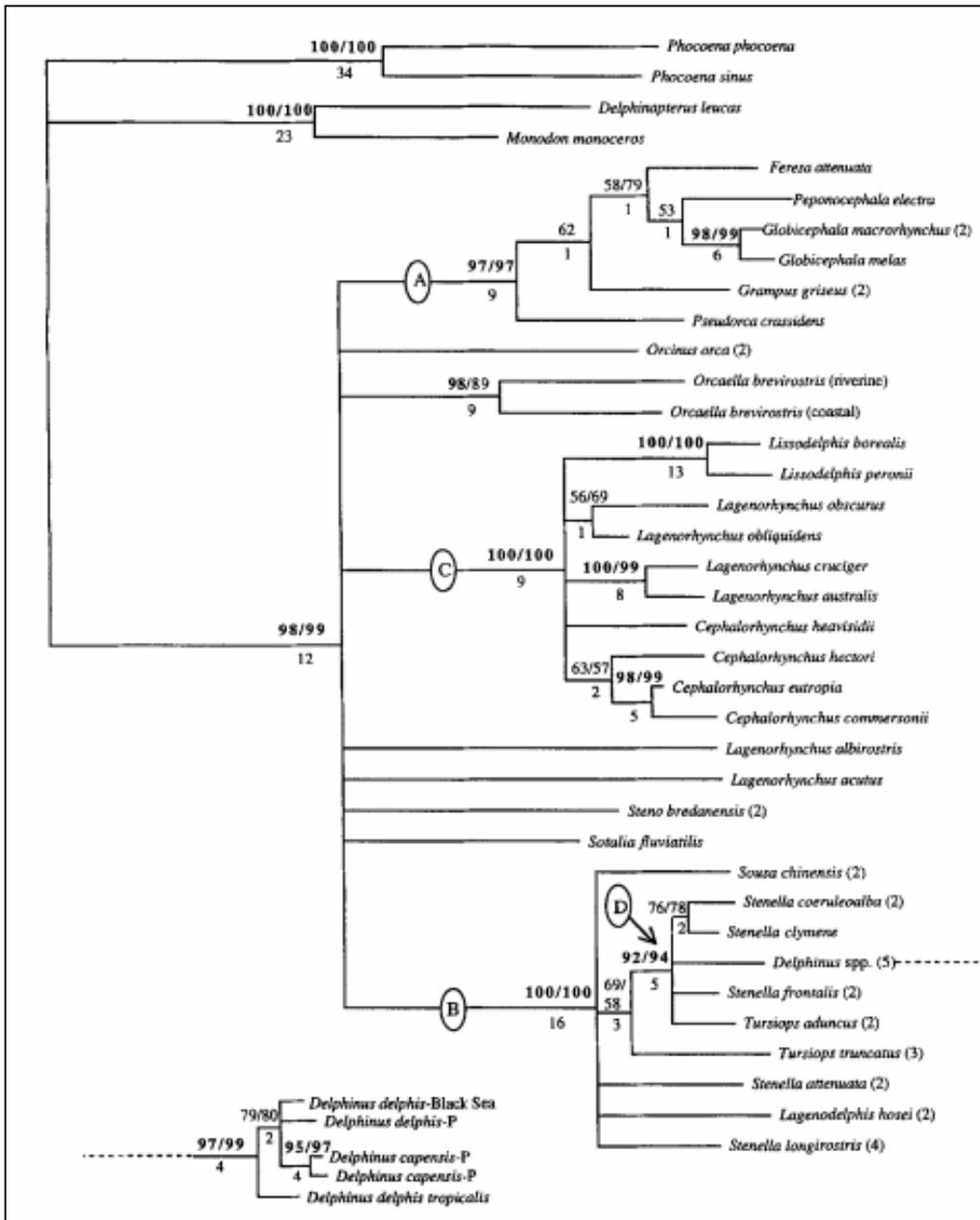


Figura 1: Árbol de consenso a partir del análisis de parsimonia no ponderado. Los números por encima nodos son los valores de bootstrap de máxima parsimonia (MP) y Vecino mas cercano (NJ) (MP / NJ), los valores de abajo son índices de Bremer (Bremer, 1988). Los números entre paréntesis después de los nombres de especies representan el número de secuencias incluidas para especies representadas por múltiples muestras. A menos que represente lo contrario, los valores de bootstrap para las especies monofiléticas son > 95% y no se muestran en la figura. Esta topología es idéntica a la de consenso estricto de todos los árboles de MP, excepto que en el último, el género *Lissodelphis* fue basal dentro del clado subfamilia. La longitud de los brazos es proporcional a la cantidad de cambios genéticos. (Extraído de Le Duc et al 1999).

El delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*, representa una de las especies más abundantes entre los pequeños cetáceos que habitan en aguas argentinas y ha sido catalogada por la UICN como “Data Deficient” (IUCN Red List Program, 2010). En cuanto a su morfología, la parte superior del cuerpo es gris oscuro y la inferior es casi blanca. En los laterales y sobre la porción oscura, presenta una franja más clara que se divide en dos franjas más finas dirigidas hacia adelante. El rostro es básicamente blanco con una mancha negra alrededor de los ojos. El pico es corto y oscuro. La aleta dorsal es prominente y más oscura en su borde anterior (Fig. 2).



Figura 2. Delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*.

El delfín oscuro, es una especie ampliamente distribuida en el Hemisferio Sur, generalmente prefiere aguas templadas profundas a lo largo de la plataforma continental (Würsig et al., 1997). Esta preferencia por aguas frías mesopelágicas dio como resultado una distribución discontinua, regional en las costas de América del Sur (Argentina, Chile y Perú), África Sudoccidental (Sudáfrica), Nueva Zelanda, esporádicamente en el sur de Australia (Crespo, 1991; Jefferson et al., 1993; Van Waerebeek et al., 1995; Würsig et al., 1997). Estos autores han mencionado la presencia de esta especie en varios archipiélagos circumpolares, como las islas Kergüelen y Campbell y el Estrecho de Magallanes (Leatherwood & Reeves, 1983; Crespo et al., 1997a). Van Waerebeek y colaboradores (1995) confirmaron registros de

delfines oscuros en las Islas Malvinas y en la isla Santa Elena (Gough), en el Océano Atlántico Sur, y en las islas Amsterdam y Prince Edward en el Océano Índico (Fig. 3).

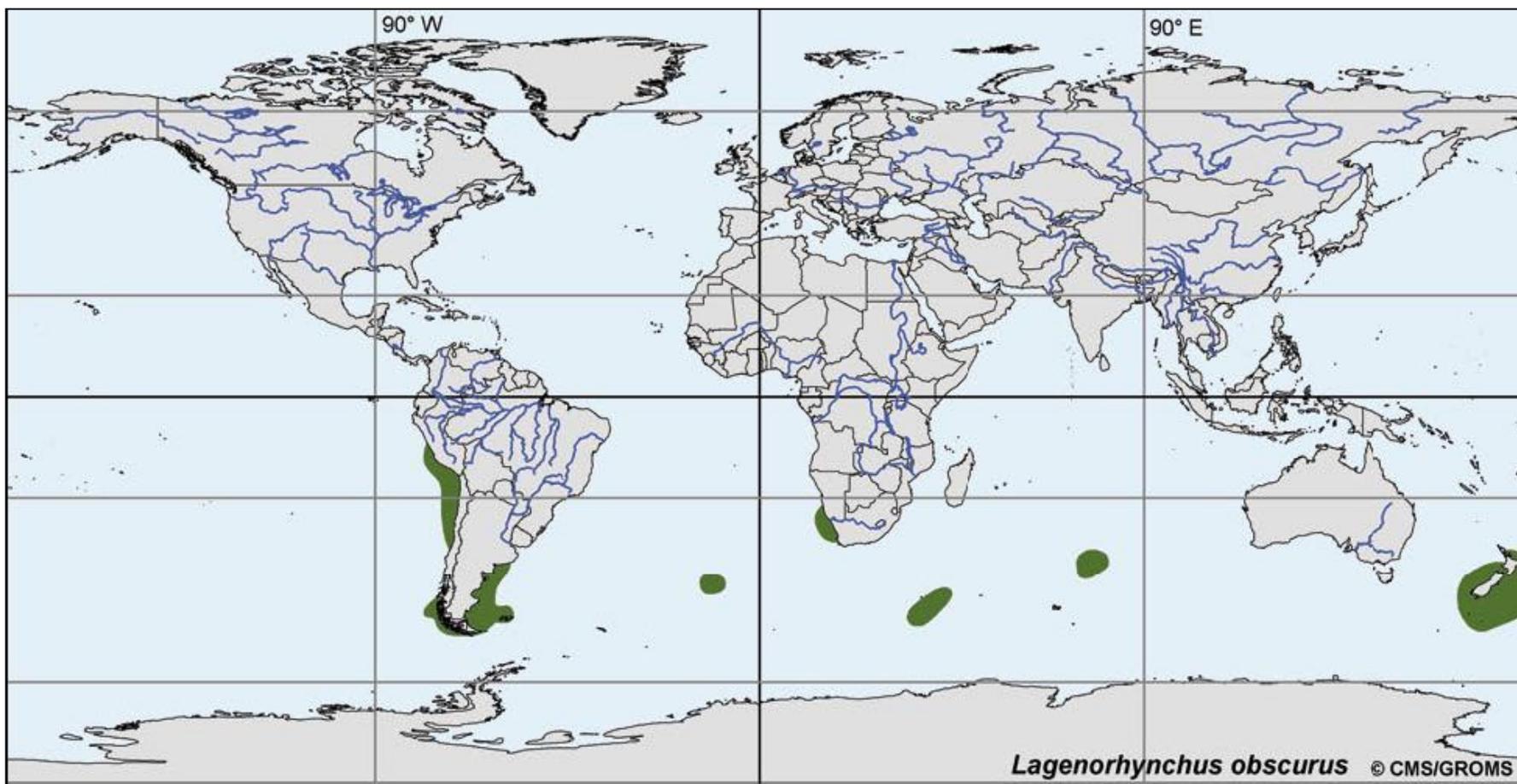


Figura 3. Distribución mundial del delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*: aguas costeras templadas de Nueva Zelanda, Sudáfrica y América el Sur (Extraída de Brownell & Cipriano, 1999; © CMS/GROMS).

Existe evidencia morfológica que indica diferenciación entre las diferentes poblaciones de delfín oscuro, posiblemente a nivel de subespecie. Diferencias en la longitud del cuerpo, presentando una longitud media de adultos de ambos sexos igual a 179.1 cm. en Nueva Zelanda, 179.9 cm. en Sudáfrica y 187.7 cm. en Perú (Van Waerebeek, 1992 a, b). Estos resultados concuerdan con observaciones de cráneos provenientes de Nueva Zelanda y Sudáfrica y sugieren que son en promedio 3.1 cm. (8.5% de longitud cóndilo basal) más cortos que aquellos cráneos provenientes de Perú y norte de Chile. Este resultado también es concordante con la carga parasitaria (por ejemplo, la presencia de *Crassicauda* sp.) (Dans, 1999b, Van Waerebeek et al., 1993). Además los especímenes de Nueva Zelanda poseen menor cantidad y mayor tamaño de dientes que aquellos provenientes de Sudáfrica (Van Waerebeek, 1993 b, c).

Sin embargo, la no existe diferenciación genética marcada entre las poblaciones del océano Atlántico y océano Pacífico, además no existe evidencia de flujo génico reciente de hembras entre el Atlántico y Pacífico (Cassens et al., 2003). Cassens y colaboradores (2005), analizaron la variación en el ADN mitocondrial (ADN_{mt}) y de marcadores nucleares (microsatélites) en delfines oscuros provenientes de Perú, Argentina, Sudáfrica y Nueva Zelanda. Los autores concluyeron que el flujo génico es mantenido por los machos entre las poblaciones de Argentina y Perú, mientras que el flujo génico mantenido entre las poblaciones de Argentina y África es escaso. A pesar de que los patrones de diferenciación son complejos y la interpretación de los detalles de esta diferenciación es difícil (como identificar la posible "población fuente" de la estructura poblacional contemporánea), la evidencia existente sugiere poco o nulo flujo génico entre Nueva Zelanda, Argentina, Sudáfrica y Perú. Existe una hipótesis probable que los delfines oscuros de Argentina y Sudáfrica recientemente se separaron (en términos evolutivos) de una población ancestral atlántica (Cassens et al., 2005). Sin embargo, no todos apoyan esta hipótesis y proponen una población ancestral perteneciente al océano Índico/Pacífico (Harlin-Cognato et al., 2007).

En Argentina, el delfín oscuro se encuentra a lo largo de la costa, el límite norte de su distribución esta considerado Mar del Plata, existen registros de avistajes en el sur de Brasil y de animales varados muertos en Uruguay (33°S) (Brownell, 1974; Mitchell, 1975; Crespo et al., 1997a), mientras que el límite sur se encuentra menos definido. Existen registros en Bahía San Sebastián y Este de Tierra del Fuego (Lahille, 1899 citado en Lichter & Hooper, 1984) y el Pasaje de Drake (Nishiwaki, 1977 citado en Van Waerebeek, 1992 a). Otros dos registros confirmados incluyen dos especímenes colectados en Tierra del Fuego (Goodall, 1989; Goodall et al., 1997) y alrededor de 200 individuos avistados 159 Km. al este de Río Grande, Tierra del Fuego (Lichter, 1986; Van

Waerebeek, 1992a). La población de delfines oscuros del litoral argentino presentan una longitud corporal con una media para los dos sexos agrupados de aproximadamente 167 cm. (Dans, 1999a).

Durante la década del '90, se han documentado importantes niveles de mortalidad incidental de delfines oscuros en pesquerías de palangre y arrastre a lo largo de la costa Argentina (Corcuera et al., 1994; Crespo et al., 1994, 1997b, 2000; Dans et al., 1997). Mas tarde se ha sugerido que la captura incidental estaría próxima al máximo nivel sustentable (Dans et al., 2003 a, b). En la última década se han sumado impactos de menor magnitud causados por la actividad turística de avistaje de cetáceos (Coscarella et al., 2003; Dans et al., 2008). Sin embargo, esta actividad se realiza a escala local en el Golfo Nuevo en el norte de Patagonia, aunque se asume que la actividad aumentará en frecuencia e intensidad a corto y largo plazo. De esta manera es crucial el conocimiento de la estructura poblacional de la especie a lo largo del litoral argentino que permanece aún sin elucidar. La única evidencia de contacto entre distintas localidades del litoral argentino ha sido la recaptura de dos individuos marcados en el Golfo San José en la década del 70, siete años más tarde frente a las costas de Mar del Plata (38°S), 800 Km. más al norte (Würsig & Bastida, 1986). Esto sugiere un potencial de dispersión de amplio rango pero se desconoce si este tipo de movimiento representa flujo génico. Varias especies de delfines muestran estructura genética similar en una escala geográfica fina (Natoli et al., 2004, 2005) revelando que la dependencia a un hábitat local tiene el potencial de aislar las poblaciones por apareamiento clasificado ("*assortative mating*") y diferenciación por deriva génica. Por lo tanto, conocer la estructura poblacional de la especie, proveerá de información crítica hacia un manejo efectivo y podrá brindar herramientas para la conservación de la especie a la luz de los impactos producidos a lo largo del litoral argentino.

HIPÓTESIS DE ESTUDIO

Los vertebrados marinos altamente móviles tales como los pequeños cetáceos poseen un alto potencial de dispersión de amplio rango, estos desplazamientos pueden generar flujo génico entre las poblaciones. Además, los patrones y niveles de dispersión sexo-específico juegan un rol importante en la determinación de la estructura génica poblacional.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura genética poblacional del delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*, en la costa de Argentina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar un dispositivo para la toma de muestras de biopsias que implique un mínimo impacto negativo en el delfín oscuro.
- Determinar el grado de aislamiento poblacional del delfín oscuro a lo largo del litoral argentino.
- Documentar el flujo génico y patrones de migración entre poblaciones putativas a lo largo del litoral argentino.
- Evidenciar cambios demográficos históricos en el delfín oscuro a lo largo de la costa argentina.

ÁREA DE ESTUDIO

El Mar Argentino se extiende entre los paralelos 35°S y 56°30'S, la línea de costa al Oeste y el borde de la plataforma continental al Este, ocupando una superficie de 940.000 Km.²; el ancho varía entre 210 Km. frente a Mar del Plata y 850 Km. a la latitud de las Islas Malvinas. La línea de costa se prolonga por 4725 Km. (IGM, 1999) y su declive es por lo general suave (2° - 4°). Puede dividirse en dos grandes sectores: el pampeano, con una superficie de unos 230.000 Km.² entre los paralelos 35°S y 41°S, que incluye el litoral y plataforma de la provincia de Buenos Aires; y el patagónico-fueguino, que abarca hasta los 55°S, e incluye la Isla de los Estados y las Islas Malvinas. Su superficie es de unos 750.000 Km.², su ancho máximo presenta unos 850 Km. (Piola 2008a). Las corrientes de Malvinas y Brasil representan las columnas vertebrales o ejes que marcan los ritmos oceanográficos y biológicos del mar Argentino (Fig. 4).

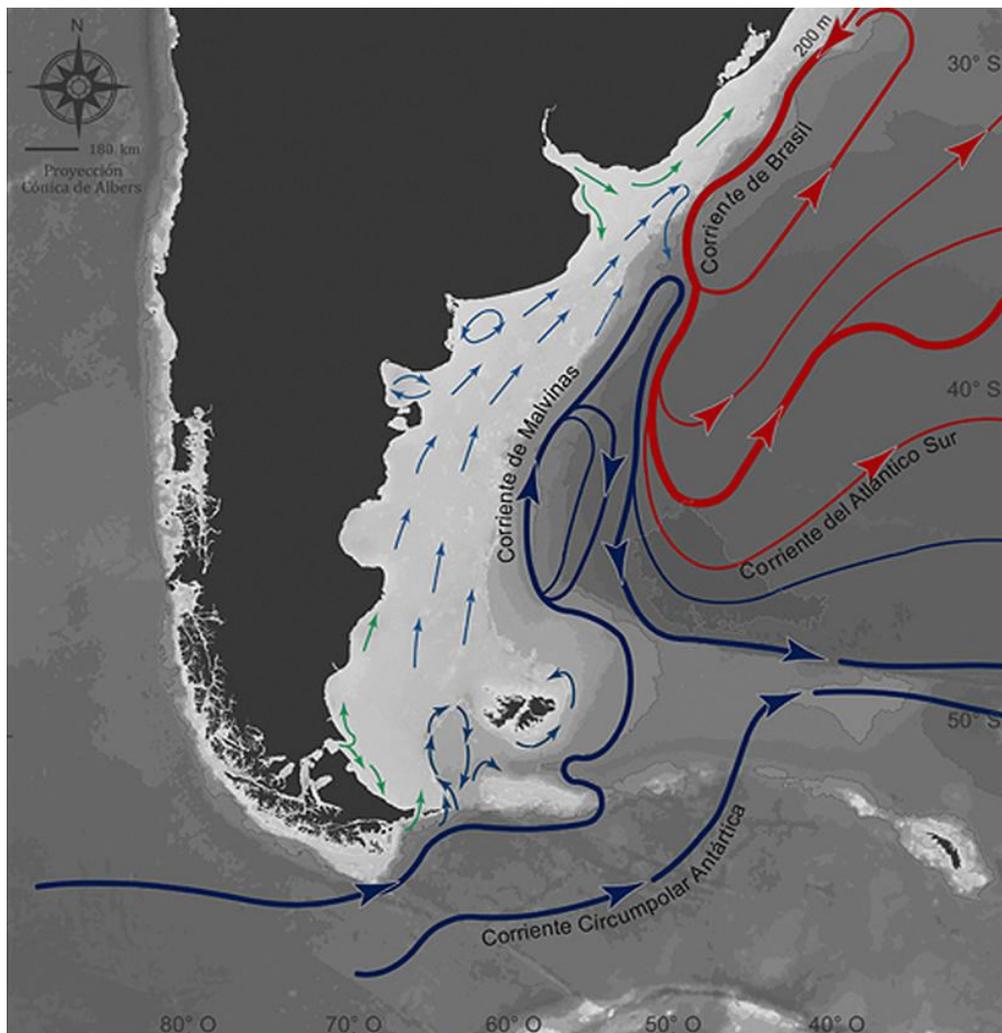


Figura 4. Corriente de Malvinas y de Brasil (Extraída de Atlas del Mar Patagónico. Especies y Espacios; adaptado de Piola y Matano (2001)).

La corriente de Malvinas, formada por aguas subantárticas, es fría (su temperatura superficial en invierno es menor a los 7°C) y de baja salinidad. Su origen se encuentra en la corriente circumpolar antártica, la cual, luego de atravesar el pasaje de Drake, rodea el banco Burdwood y conforma un patrón de circulación anticiclónica. A continuación, el flujo ascendente se separa en dos brazos, a la altura del archipiélago de Malvinas. La rama oeste, de aguas frías y de baja salinidad, debido al aporte de aguas continentales, se desplaza hacia el norte sobre la plataforma continental. La rama este rodea las islas Malvinas, también se desplaza hacia el norte, pero lo hace contorneando la topografía dibujada por el borde de la plataforma continental y sosteniendo importantes floraciones de fitoplancton. La corriente de Brasil fluye hacia el sur a lo largo del margen continental de América del Sur y constituye el límite oeste del llamado giro subtropical del Atlántico sur, cuyas aguas, de origen subtropical, son más cálidas (superan los 26°C en su superficie) y salinas que las aguas adyacentes. Ambas corrientes se encuentran cerca de los 38° de latitud sur y forman la zona de confluencia Brasil/Malvinas, una de las regiones de mayor concentración de energía de todos los océanos del mundo. En esta zona coexisten y se mezclan aguas subtropicales y subantárticas que determinan importantes gradientes físico-químicos y favorecen la presencia de altas concentraciones de nutrientes con importantes consecuencias biológicas para todo el ecosistema. A estas latitudes, entre los 38° y los 40° de latitud sur, el flujo principal de la corriente de Malvinas describe un brusco giro y forma el flujo de retorno de Malvinas que se dirige al sudeste. Este flujo de retorno genera la surgencia de aguas profundas que enriquecen el contenido de los nutrientes de las aguas superficiales. La temperatura superficial del mar Argentino aumenta a medida que las aguas avanzan hacia el norte y también varía estacionalmente; por ejemplo, en invierno entre los 45°S y 50°S es de 5°C – 7°C y en verano asciende a 8°C- 9°C (Fig. 5) (Piola, 2008a).

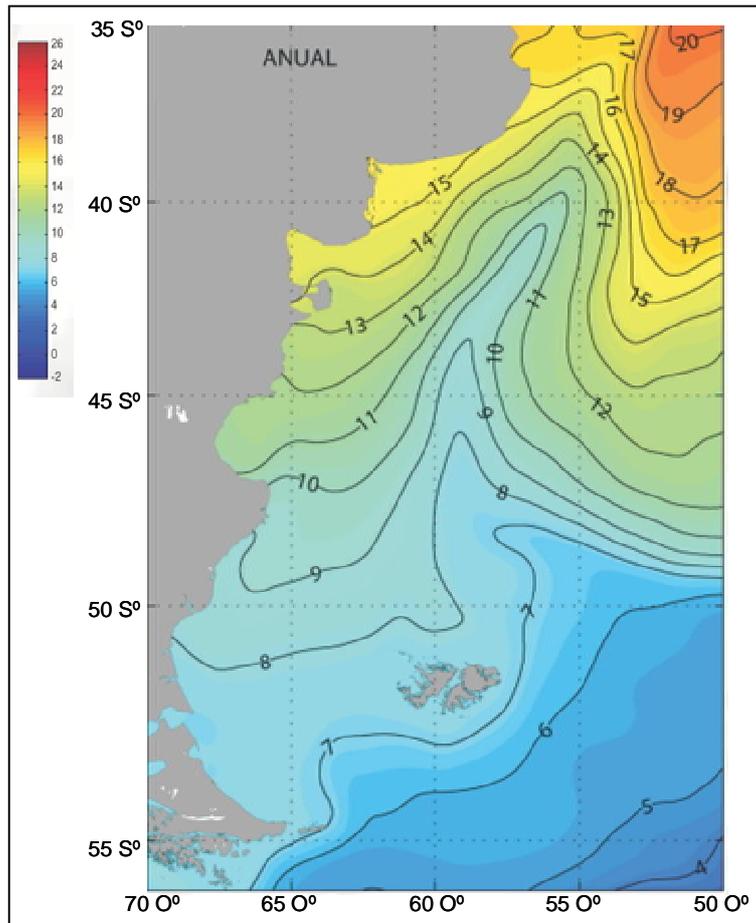


Figura 5. Distribución media anual de temperatura superficial del mar (en °C) calculada a partir de los datos climatológicos de Casey & Cornillon (1999). El intervalo entre contornos es de 1°C. Extraída de Atlas de Sensibilidad Ambiental de la costa y el Mar Argentino (Oceanografía Física, Alberto Piola, 2008).

La salinidad superficial es mayor en la plataforma externa, llegando como máximo a 34,15 UPS y disminuye hacia el continente (Fig. 6). Sin intervención de mareas eólicas, las mareas en la costa argentina varían de una amplitud de 0,60 m (en el Río de la Plata) a 12 m, entre San Julián y Cabo Vírgenes; a la altura de Río Gallegos se registran las mareas de mayor amplitud del litoral, llegando hasta 12,2 m, valor que se ubica entre los mayores del mundo (Isla & Lasta 2007).

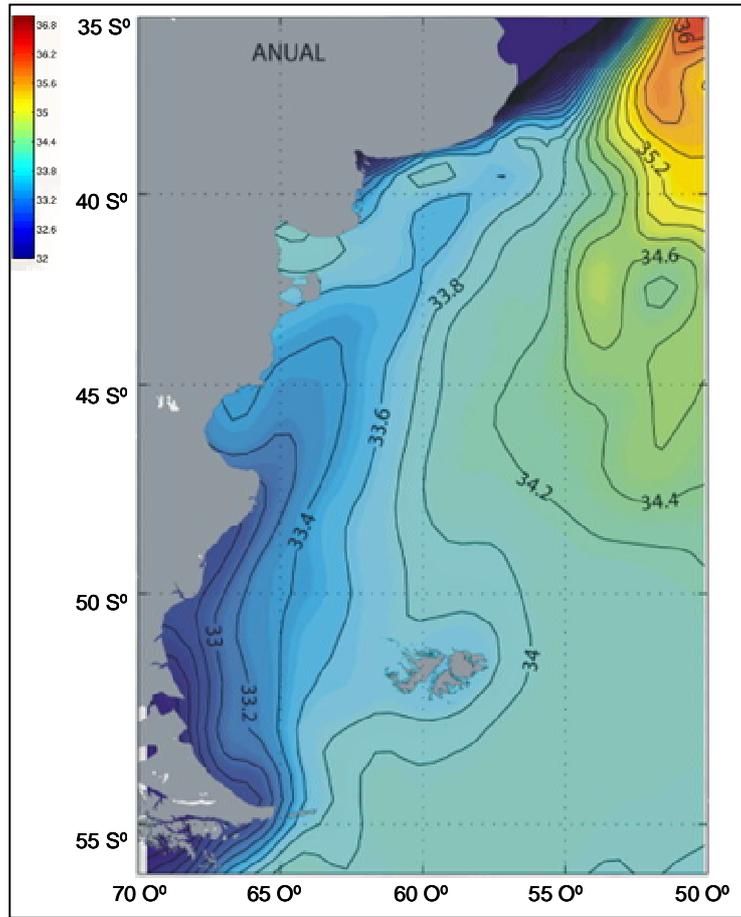


Figura 6. Distribución de salinidad superficial media anual calculada a partir de datos oceanográficos históricos de las estaciones oceanográficas. Extraída de Atlas de Sensibilidad Ambiental de la costa y el Mar Argentino (Oceanografía Física, Alberto Piola, 2008b).

Para la selección del lugar para realizar los relevamientos y recolección de muestras se tomó en cuenta información sobre la distribución de la especie en la costa de Argentina, abarcando desde la costa de Buenos Aires, Golfo San Matías, Golfo San José y Golfo Nuevo hasta el Golfo San Jorge (Fig. 7).

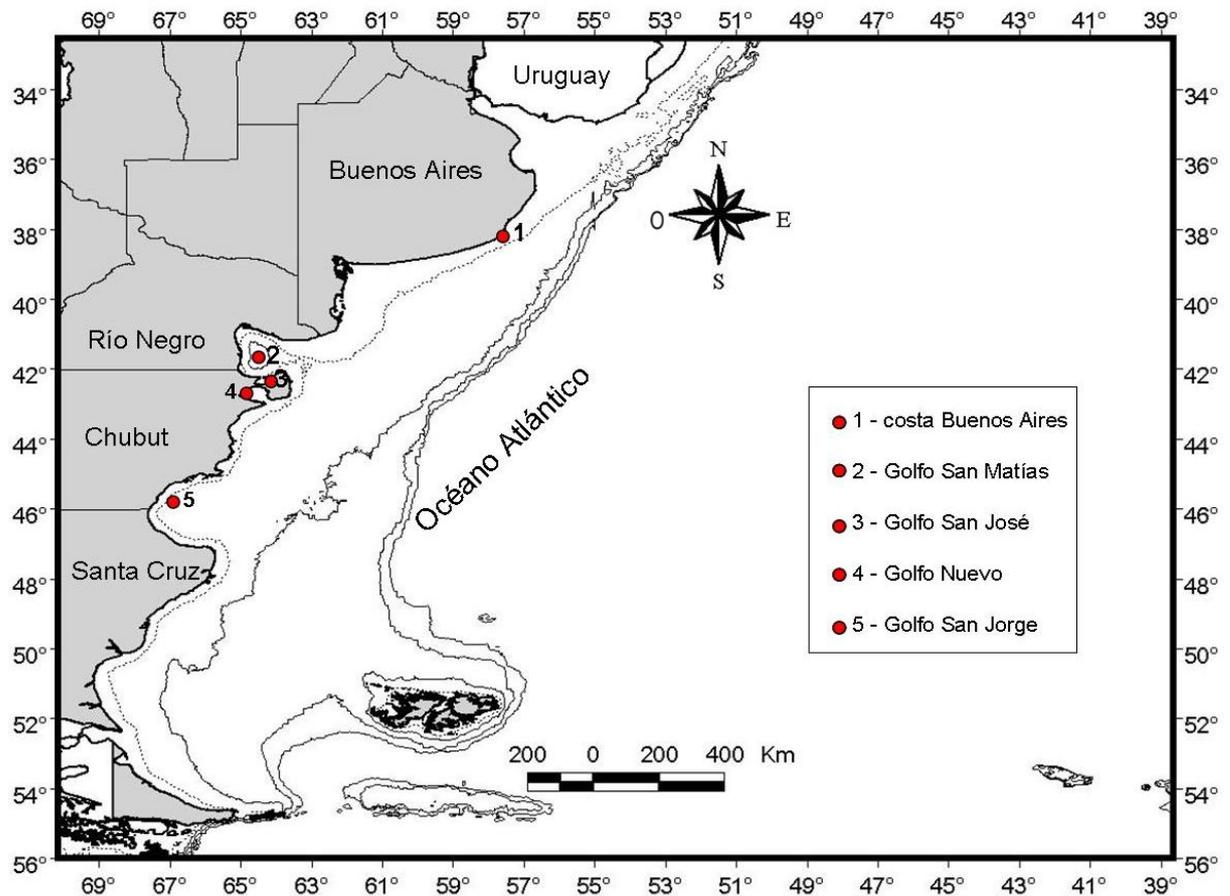


Figura 7. Área de estudio. Los círculos rojos indican las localidades de muestreo.

La costa de la **provincia de Buenos Aires** podría definirse desde los 33° 30' S en el norte hasta los 41° S en el sur, y hacia el este por una profundidad de 50 metros. Presenta tres áreas con diferentes características oceanográficas: 1) El ecosistema estuarial del Río de la Plata, formado por la descarga del río dentro del océano Atlántico (36° S, 56° W). Está caracterizado por la una zona frontal extensa constituida por dos capas, una superficial diluida por aportes continentales, y otra de fondo de alta salinidad originada en plataforma media (Guerrero, 1998). Estas características oceanográficas dan lugar a la formación de una estructura de cuña salina en el estrato inferior que se extiende a lo largo del frente salino de superficie (Guerrero & Piola, 1997; Guerrero et al., 1997). Este sistema influencia una región externa al estuario del orden de 100 Km. de la costa o de la línea imaginaria entre Punta Rasa y Punta del Este (Guerrero et al., 1997; Miazán et al., 2001). 2) El área costera central de la provincia de Buenos Aires, comprendida entre los 37 ° S y la localidad de Necochea. En esta región el ecosistema abarca una franja angosta de unos 30 Km. desde la isobata de 50 m hasta la línea de costa, formada por el aporte de masas de agua de plataforma (Guerrero & Piola, 1997). Particularmente, en primavera y verano, se observan en

esta franja frentes térmicos de mareas limitados a la región litoral. 3) Por último, las aguas marinas, con salinidades superiores a 27 UPS, provienen principalmente de la cuenca de El Rincón (39° S, 62° O), donde la descarga combinada del Río Negro y Río Colorado (~ 1.000 m³s⁻¹) conforma su sistema estuarial, y de la cuenca de Golfo de San Matías (41°30´ S, 64°30´ O). En la cuenca de El Rincón se genera una columna de agua costera diluida como producto de la difusión de las aguas continentales sobre las aguas de plataforma adyacentes, donde la acción de los vientos y mareas sumadas a las bajas profundidades mantiene la columna de agua verticalmente homogénea (Guerrero, 1998).

El **Golfo San Matías** (GSM) es el más extenso del sistema de golfos norpatagónicos. Se extiende entre las latitudes 40°45'S y 42° 14'S, abarcando una superficie total de aproximadamente 19.700 Km². Constituye una cuenca marina semicerrada, con profundidades máximas de hasta 219 m. en su parte central y un zócalo de profundidades relativamente menores (50-80 metros) en su boca, la cual esta delimitada al norte por Punta Bermeja y al sur por Punta Norte, en la Península Valdés. Desde el punto de vista oceanográfico, se caracteriza por la existencia de fuertes patrones estacionales. Durante los meses de otoño e invierno, sus aguas presentan características homogéneas en toda su extensión, en tanto en los meses cálidos se produce la formación de un gran frente termohalino, el cual divide al golfo en dos masas de aguas bien diferenciadas: una ubicada en la mitad norte de la cuenca, con aguas cálidas y de mayor salinidad, gobernada por la existencia de un giro ciclónico en el centro de dicho sector; y otra al sur, de aguas más frías y menos salinas, con marcado intercambio con las aguas de la plataforma. El sistema hidrológico se ve además afectado por un régimen de mareas de gran dinámica, con variaciones de amplitud del orden de los 6 a 9 metros y corrientes de gran intensidad (Mazio & Vara, 1983; Piola & Scasso, 1988; Gagliardini & Rivas, 2004).

El **Golfo San José** (GSJ) está ubicado al norte de la Península Valdés (42° S), y representa el golfo más pequeño de los golfos norpatagónicos. Es de forma elíptica (ejes menor 38 Km. y mayor 56 Km. de longitud) con una superficie de 814 Km.², es una cuenca semicerrada conectada al Golfo San Matías por una boca de 9 Km. de ancho, la cual está delimitada al oeste por Punta Quiroga y al este por Punta Buenos Aires, en la Península Valdés. La profundidad mínima es de 30 m. y la máxima de 120 m., existe una estrecha depresión en el medio de la boca del golfo. La línea de costa es irregular, con varios puntos sobresalientes. No existen cursos de aguas permanentes dentro del golfo San José. Datos oceanográficos sugieren la existencia de dos regimenes diferentes (uno en la porción Oeste y otro en la porción Este del golfo) basado en los análisis de variables químicas y

físicas (Gagliardini et al., 2004). Durante la marea alta, un canal de agua fluye hacia afuera por la porción Oeste de la boca del golfo dentro del golfo San Matías, mientras que el flujo de agua ingresa al golfo por la zona Este. Turbulencias y eddies están solo presentes en la zona Oeste del golfo San José. Un frente termal se extiende desde el Sur hacia el Norte del golfo. La porción oriental del golfo es más cálida durante el verano austral y mas fría durante la estación de invierno respecto a la zona occidental del golfo San José (Gagliardini et al., 2004). Este golfo es considerado una zona intangible para el turismo y la pesca, aunque se desarrollan algunas actividades de extracción artesanal de mariscos.

El **Golfo Nuevo** se ubica entre 42°20'-42°50'S, 64°20'-65°O, es una cuenca semicerrada que comunica con el océano Atlántico a través de una boca de 17 Km. de ancho delimitada al norte por Morro Nuevo en la Península Valdés y al sur por Punta Ninfas. El golfo posee una forma aproximadamente elíptica con su eje mayor, de 67 Km., en dirección OSO – ENE y su eje menor, de 48 Km., orientado NNO – SSE. La superficie del golfo es de 2500 Km.² aproximadamente y su profundidad máxima (184 m.) supera en 110 m. a la de la plataforma continental adyacente (Mouzo et al., 1978). Teniendo en cuenta la morfología y el carácter del sedimento se pueden diferenciar dos grandes regiones en el Golfo Nuevo: una región periférica, llamada marginal, que se extiende desde la costa hasta profundidades de alrededor de los 100 m., caracterizada por la irregularidad del fondo, relieve a veces abrupto, pendientes marcadas y fondos cubiertos por sedimentos gruesos, arenas, cantos rodados y fragmentos de conchillas; y una región central, llamada profunda, rodeada por la anterior, por debajo de los 100 m., de relieve muy suave, con pendientes exiguas y constituida por sedimentos arcillosos (Mouzo et al., 1978). El golfo es homogéneo en cuanto a la temperatura en la capa superficial durante los meses de Mayo a Noviembre cuando ocurren las temperaturas bajas (estación fría). Sin embargo, es espacialmente variable entre Diciembre y Abril (estación cálida) con bajas temperaturas a lo largo de la costa sudeste. También pueden registrarse bajas temperaturas en la costa noreste y las temperaturas más altas se registran en la porción central del golfo.

El **Golfo San Jorge** es el más grande de los golfos patagónicos, se ubica entre los 44°- 47°S y 65°31'- 65°51'O. Es una cuenca semiabierto entre Cabo Dos Bahías y Cabo Tres Puntas con gran comunicación con el océano Atlántico a través de una boca que posee 244 Km. de ancho. Su profundidad oscila entre 70 m y 100 m. sus aguas adyacentes están cubiertas por aguas de plataforma templado-frías resultantes del proceso de mezcla entre las aguas subantárticas puras y aguas costeras de origen continental (Lusqueño & Valdez, 1971). En el sector sur del mismo (47°

S) se evidencia una zona menos profunda, lo que determina comportamientos particulares de la distribución de los campos térmicos y salinos en algunas épocas del año (Reta, 1986; Baldoni, 1990; Akselman, 1996). En este sector se desarrolla un frente termohalino por el aporte de aguas del Estrecho de Magallanes (Krepper & Rivas 1979; Carreto et al., 1985) cuya influencia se extiende a toda la zona sur del golfo ubicada por debajo de *c.a* 46° S y a la región del umbral en toda su extensión (= Sistema Frontal del Golfo San Jorge, Akselman, 1996; Cuchi Colleoni & Carreto 2001, Louge & Santos, 2001). En términos de salinidad, dicho frente se correspondería con el límite norte del fuerte gradiente salino horizontal que se produce en dirección meridional a lo largo del litoral de la provincia de Santa Cruz (Krepper & Rivas, 1979). Guerrero y Piola (1997), interpretan dicho gradiente como señal de un "frente costero" producto de la confluencia de aguas diluidas por aportes de origen continental con aguas de plataforma. Este frente es permanente aunque de variable intensidad en función del caudal y la dilución de las aguas aportadas desde el Estrecho de Magallanes y el litoral atlántico fueguino. La influencia de estas aguas en el Golfo San Jorge y aguas adyacentes es máxima en primavera y mínima en verano y se evidencia particularmente en la intensidad y desplazamiento de los gradientes salinos que se producen en la región Este (umbral) y Sudeste del golfo (Cucchi Colleoni & Carreto, 2001). Durante primavera y verano, en el área litoral ubicada al sur del golfo entre *c.a.* 47° S y 49° S, tendría lugar además la formación de un frente de marea (Carreto et al., 1995). La influencia de este frente se extiende hasta las aguas costeras internas del golfo próximo al extremo sur. Por consiguiente, la acción combinada de los procesos de mezcla convectiva y turbulenta generados por el viento y de la intensa mezcla producidas por las corrientes de marea favorecería el aporte de nutrientes y la generación de un área productiva en primavera y verano en el sector sudeste del golfo San Jorge (Sabatini, 2004).

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Para la obtención de muestras para los análisis genéticos del delfín oscuro, se realizaron relevamientos náuticos, terrestres así como también se visitaron museos.

Para los **relevamientos náuticos**, se realizaron transectas al azar en cada una de las áreas de muestro utilizando la embarcación de investigación ARGO perteneciente al Laboratorio de Mamíferos Marinos (CENPAT-CONICET). La misma es una embarcación semirrígida de 6 metros de eslora con un motor fuera de borda 4-tiempos de 60hp. Se tomaron muestras de tejido de delfines de vida libre a lo largo de la costa argentina. Las muestras de delfines de vida libre se obtuvieron mediante el cepillado de piel, (se colecta piel exfoliada de los delfines con una cinta velcro fijada a un palo de madera como se describe en Harlin et al., (1999) o bien por medio de biopsias (ver Capítulo I) (Fig. 8).

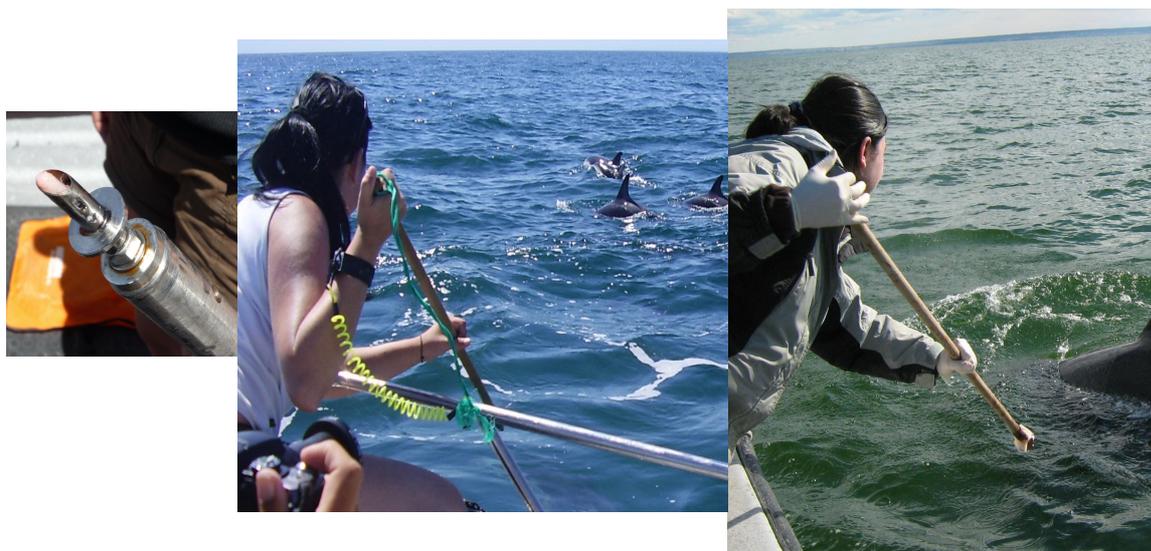


Figura 8. Fotografía ilustrando la toma de biopsia en delfines oscuros de vida libre.

Los **relevamientos terrestres**, consistieron en recorrer playas en busca de animales varados muertos o restos de carcasas a lo largo de toda el área de estudio. A aquellos animales que se encontraban en estado fresco (i.e., ejemplares que no presentaban un estado avanzado de descomposición) se les realizaba la necropsia completa siguiendo un protocolo estándar (Norris, 1961) (Fig. 9). En cada una de las necropsias se colectaban muestras de piel e hígado para los estudios de genética. En aquellos animales que se encontraban en las playas con un alto grado de descomposición, solo se tomaban muestras de piel, preferentemente de aletas o partes de cuerpo

en menor estado de descomposición para su posterior uso en los análisis moleculares. Todos los esqueletos o carcasas de los ejemplares colectados fueron ingresados a la colección científica del Laboratorio de Mamíferos Marinos (CENPAT-CONICET). Además se continuó con la campaña de varamiento de mamíferos marinos en la costa argentina, como parte de la cual se imprimió y distribuyó un póster.



Figura 9. Fotografía ilustrando la realización de una necropsia de un delfín oscuro en el Laboratorio Húmedo (CENPAT-CONICET).

También fueron incluidas las muestras de piel e hígado proveniente de individuos capturados incidentalmente en redes de pesca (Fig. 10). Estos ejemplares fueron capturados entre 1990 y 2009 en el norte y centro del litoral patagónico. La mayoría de los ejemplares llegaron a puerto congelados y fueron trasladados a una cámara frigorífica para su posterior estudio, luego de haberles realizado la necropsia completa, los esqueletos fueron ingresados a la colección científica del Laboratorio de Mamíferos Marinos (CENPAT-CONICET). En la actualidad todos los ejemplares pertenecen a la colección científica del Centro Nacional Patagónico (CONICET).



Figura 10. Fotografía ilustrando la captura incidental en buques de pesca de delfines oscuros y toninas overas en el litoral patagónico.

Asimismo, desde el año 2008 hasta el presente, se procedió a la difusión de la captura incidental de mamíferos marinos en buques de pesca y pescadores artesanales de la costa argentina, como parte de la cual se imprimió y distribuyó un póster (Figura 11). Hasta el momento, se visitaron mas de 30 buques pesqueros y 5 campamentos de pescadores artesanales así como también se colaboró con la UAPA, Unión Argentina de Pescadores Artesanales difundiendo la campaña en su red. A todos los ejemplares colectados se le realizó la necropsia completa y posteriormente fueron ingresados a la colección científica del Centro Nacional Patagónico (CONICET).



Figura 11. Póster de difusión de la campaña de captura incidental de mamíferos marinos en buques de pesca y pescadores artesanales de la costa argentina.

Durante 2008 se realizó una visita al Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" donde se colectaron 5 muestras de cartílago, diente y hueso provenientes probablemente de la costa de la provincia de Buenos Aires. También se visitó el Museo de La Plata donde se recolectaron 5 muestras de diente y hueso de delfín oscuro, de los cuales, 2 provienen de Patagonia, 1 muestra de localidad desconocida, 2 muestras cuya localidad es O. Atlántico.

Las muestras provenientes de los relevamientos náuticos (biopsias), captura incidental y ejemplares varados en los que se pudo realizar la necropsia fueron preservadas temporalmente a temperatura ambiente en solución de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 20% saturada con NaCl y preservadas a -20° C a largo plazo. Aquellas muestras provenientes de museos y/o carcasas de animales hallados muertos en playa se preservaron sin ningún conservante.

En resumen, la cantidad de muestras obtenidas para la realización de esta tesis de doctorado mediante biopsias, animales varados y provenientes de la captura incidental de pesca son: 85 muestras para el Golfo Nuevo, 26 muestras para Golfo San Matías, 27 para Golfo San José y 21 para el Golfo San Jorge, siendo el tamaño muestral, $N = 159$ para el delfín oscuro a lo largo del litoral argentino. Además el número de muestras colectadas de los museos son 12 muestras, 6 provenientes de costa de la provincia de Buenos Aires, 2 muestras sin dato de procedencia y 1 muestra proveniente del Golfo San Matías. En el Museo La Plata se colectaron 4 muestras en total, 2 sin datos de procedencia, 1 muestra de procedencia Océano Atlántico, 1 muestra de procedencia de Patagonia. Del Museo Acatushún, Tierra del Fuego solo se colectó 1 muestra.

La toma de muestras fue aprobada por la Secretaría de Turismo y Dirección de Fauna y Flora Silvestre de la Provincia del Chubut (Permiso de Investigación N° 23/07) y por el Gobierno de la Provincia de Río Negro. Las muestras de piel fueron exportadas bajo el permiso de CITES N° 032423, 31374/75/76, otorgado por el Ministerio de Salud y Ambiente, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina.

CAPÍTULO I

RESPUESTA COMPORTAMENTAL DEL DELFÍN OSCURO A LA TOMA DE BIOPSIAS MEDIANTE EL PALO DE BIOPSIA

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los análisis moleculares se han convertido en una herramienta poderosa en la ecología de pequeños cetáceos ya que proveen información valiosa al momento de planificar políticas de manejo y conservación de las especies. La toma de biopsias en cetáceos de vida libre demostró ser útil como técnica de muestreo permitiendo contestar preguntas desde estructura social y estructura de la población (e.j., Baker et al., 1990; LeDuc et al., 1999; Kiszka et al., 2010), análisis isotópicos (e.j., Walker et al., 1999, Valenzuela et al., 2009, Kiszka et al., 2011) y niveles de contaminación (e.j., Fossi et al., 2000; Fair et al., 2010), etc. Las muestras de biopsias tomadas para estudios de genética se han obtenido mediante el uso de distintos dispositivos como por ejemplo, ballestas (Lambersten 1987; Palsbøl et al., 1991; Weinrich et al., 1991, 1992; Gauthier & Sears, 1999; Bearzi 2000; Hooker et al., 2001; Gorgone et al., 2008; Kiszka et al., 2010; Quérouil et al., 2010), rifles (Barret-Lennard et al., 1996; Krützen et al., 2002; Parsons et al., 2003), palos de biopsia (Bilgman et al., 2007), raspado de piel (Hoelzel, 1989; Milinkovitch, 1994; Harlin et al., 1999) o muestreo de fecas (Parsons et al., 1999, 2003; Green et al., 2007). Cada uno de estos dispositivos de muestreo utilizados para la toma de biopsias presenta algún nivel de intrusión o perturbación sobre los animales por lo que se ha hecho esfuerzo en generar dispositivos que disminuyan el impacto sobre los animales (Weinrich et al., 1991; Clapham & Mattila, 1993; Brown et al., 1994; Patenaude & White, 1995; Gauthier & Sears, 1999). La mayoría de estos estudios se han realizados en grandes ballenas y utilizando sistemas de muestreo a distancia (e.j., ballestas, rifles, etc). Para los pequeños cetáceos se dispone de mucha información sobre la utilización de técnicas de muestreo a distancia (Weller et al., 1997; Krützen et al., 2002; Gorgone et al., 2008; Jefferson & Hung, 2008, Kiszka et al., 2010; Quérouil et al., 2010) pero solo existe un antecedente para el palo de biopsia como dispositivo para la toma de biopsias (Bilgman et al., 2007). Bearzi (2000), reportó la muerte de un delfín común (*Delphinus delphis*) en el mar Mediterráneo durante un muestreo de biopsias utilizando un dispositivo a distancia (proyector de potencia variable de CO₂); el dardo quedó atascado en la masa muscular dorsal y menos de 2 minutos después del golpe el delfín comenzó a hundirse realizando movimientos catatónicos, 16 minutos más tarde el animal murió. La causa de la muerte permanece desconocida, posiblemente el trauma vertebral indirecto y

probables complicaciones por enfermedad o estrés inducido por el muestreo se han propuesto como posibles causas. El delfín tenía una capa de grasa relativamente delgada (7mm) que probablemente permitió la penetración extremadamente profunda, y además sugiere un mal estado general de salud del animal (Bearzi 2000). Este caso remarca la necesidad de investigar sobre los posibles efectos de la toma de biopsia en animales de vida libre.

El muestreo de biopsias utilizando dispositivos a larga distancia o sistemas de palo es uno de los métodos más eficientes para obtener material epitelial para el análisis de ADN (Amos & Hoelzel, 1990; Baker et al., 1990, 1993; Hoelzel & Dover 1991; Hoelzel et al., 1998; Gorgone et al., 2008; Kiszka et al., 2010). Sin embargo, como técnica intrusiva, posee costos inherentes que se pueden ser minimizados mediante una planeación efectiva de la investigación. Para determinar el impacto generado en los individuos muestreados es esencial identificar qué factores influyen estas respuestas comportamentales para prevenir posibles efectos a largo plazo y/o minimizar los efectos a corto plazo.

Cuando se va a seleccionar una técnica y dispositivo de muestreo para la obtención de muestras de biopsias, se debe considerar el status de conservación de la especie, la población blanco, así como también las potenciales reacciones comportamentales de los animales a muestrear (Bilgman et al., 2007). Una de las desventajas de los muestreos menos invasivos tales como el raspado de piel o la colecta de fecas es que el material genético, ADN, puede no ser suficiente en cantidad y calidad para llevar adelante los análisis moleculares (Harlin et al., 1999; Parsons et al., 1999). Las muestras de biopsias proveen suficiente ADN para múltiples marcadores genéticos, así como también para análisis isotópicos y de niveles de contaminación (e.j., Amos & Hoelzel, 1990; Borrel et al., 2001; Natoli et al., 2005, 2007; Valenzuela et al., 2009; Cypriano-Souza et al., 2010).

El objetivo de este capítulo consistió en el diseño de un dispositivo para la toma de muestras de biopsias que implique un mínimo impacto negativo e investigar el éxito de muestreo y la reacción a la toma de biopsias en delfines de vida libre en diferentes contextos de tipo y tamaño de grupo y diferente comportamiento del grupo.

METODOLOGÍA

Área de Muestreo

Las muestras de biopsias fueron colectadas durante los años 2008 y 2009 en Patagonia norte (Fig. 1.1). El área de estudio consiste en el sistema de golfos norpatagónicos que incluye el Golfo San Matías (GSM, 40°45' S- 42°14' S y 65°05'-63°48'O), Golfo San José (GSJ, 42°25' S- 42°13' S y 64°37' O - 64°02' O) y el Golfo Nuevo (GN, 42°29' S- 42°56' S y 65°03' O - 64°0' O). El Golfo San José y el Golfo Nuevo rodean a Península Valdés, la cual constituye un área protegida declarada Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO desde 1999.

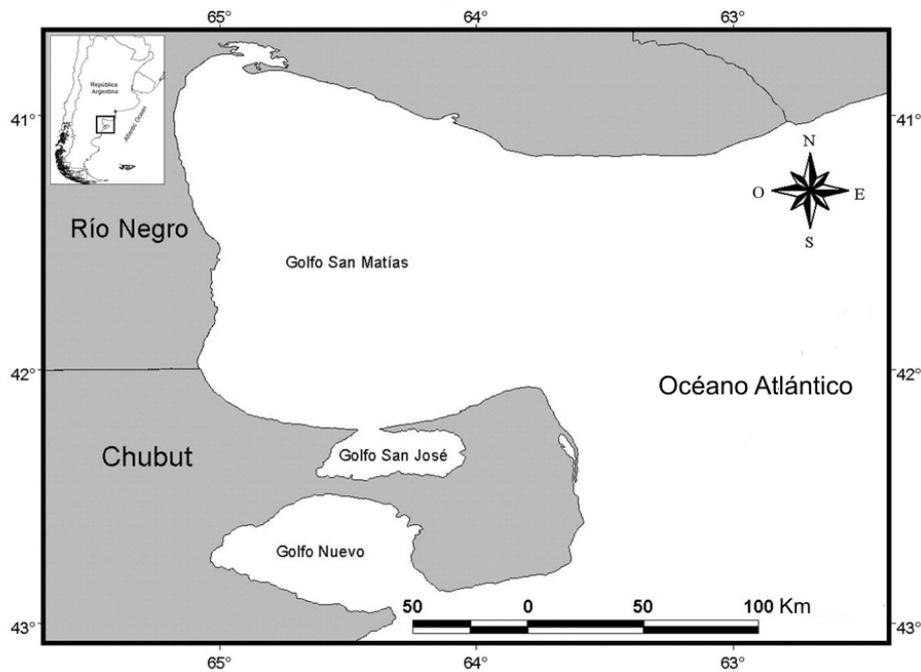


Figura 1.1. Área de estudio constituida por los tres golfos norpatagónicos, Golfo San Matías (GSM), Golfo San José (GSJ) y Golfo Nuevo (GN).

Muestreo de Biopsias

Las muestras de biopsia fueron colectadas desde una embarcación semirrígida de 6 metros de eslora con un motor fuera de borda 4-tiempos de 60hp; embarcación de investigación perteneciente al Laboratorio de Mamíferos Marinos (CENPAT-CONICET). La toma de muestras fue aprobada por la Secretaría de Turismo y Dirección de Fauna y Flora Silvestre de la Provincia del Chubut (Permiso de Investigación N° 23/07) y por el Gobierno de la Provincia de Río Negro. Las muestras de piel fueron exportadas bajo el permiso de CITES N° 032423, 31374/75/76, otorgado por el Ministerio de Salud y Ambiente, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina.

El dispositivo de toma de biopsias consiste en un palo de madera de 1,5 m de longitud con un lazo en la parte proximal (protocolo modificado de Bilgmann et al., 2007). En la parte distal del palo de madera se encuentra una puntera metálica sujeta con tornillos y tuercas, esta puntera termina en una punta con rosca externa (W 5/16'') de 10 mm de largo. La punta de biopsia se inserta y se enrosca en la puntera metálica. La punta es una pieza única de acero inoxidable, consiste en una región posterior de 10 mm con rosca interna (W 5/16'') que permite sujetar la punta de biopsia a la puntera del palo de muestreo. La punta posee un anillo de tope de 24,5 mm de diámetro y 3 mm de espesor que previene una penetración profunda en el animal. Es un cilindro hueco de 27 mm de longitud y 7 mm de diámetro, con paredes de 0,7 mm de espesor. La misma termina en forma de cuña afilada (*e.j.*, aguja hipodérmica) en un ángulo de 60° aproximadamente. Para retener la muestra de tejido epitelial la punta posee un agujero de purgación de 3 mm de diámetro que atraviesa el tubo, ubicado a 4,7 mm del anillo de tope. Además posee una barba (o lengua) de 6,5 mm de largo y 3 mm de profundidad ubicada a 10,5 mm de la punta que retiene la muestra dentro del cilindro. El agua fluye dentro del cilindro a través de la punta y se purga vía el agujero de purgación. El agujero esta orientado hacia atrás para permitir el purgado y evitar el reflujo (Fig. 1.2).

La manipulación de la punta de biopsia requiere el uso de guantes de látex de manera de minimizar el contacto entre las manos y las muestras, disminuyendo de esta manera su contaminación. Luego solo consiste en desenroscar de la puntera la punta y utilizando pinzas previamente esterilizadas, la muestra es extraída y posteriormente guardada en un tubo de centrifuga en solución al 20% de Dimetilsulfóxido saturada con NaCl (Amos & Hoelzel, 1991). Una vez en el laboratorio es preservada a -20° C hasta ser utilizada para los análisis moleculares.

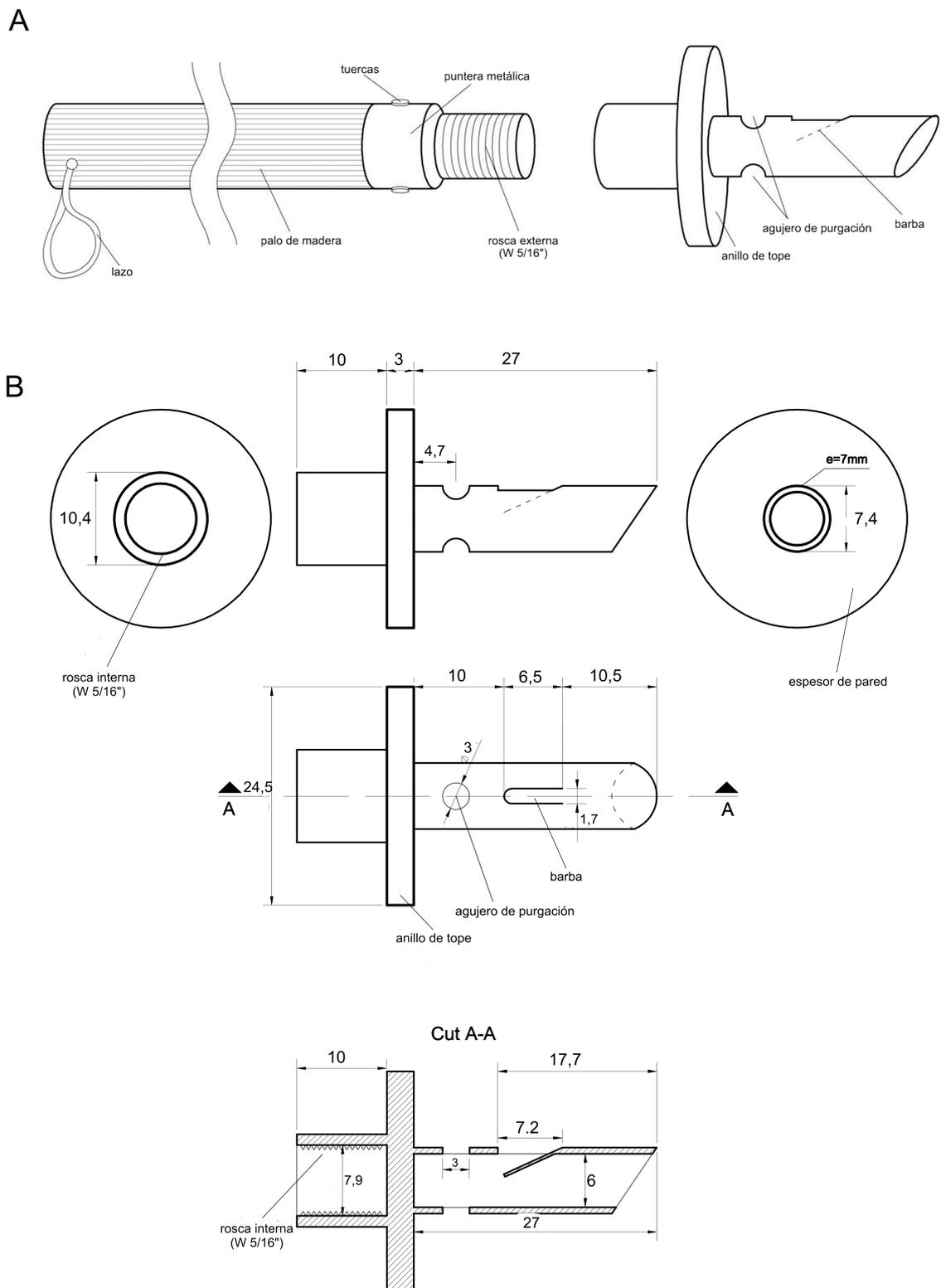


Figura 1.2. A) Esquema del palo y punta de biopsia. B) Detalle de diseño de la punta de biopsia. Las medidas están dadas en mm.

Después de cada uno de los días de muestreo, las puntas de biopsias se limpiaron individualmente. Utilizando guantes de látex durante toda la manipulación, las puntas se cepillaron bajo agua corriente utilizando un cepillo de dientes, luego se hirvieron 20 min. Finalmente, se colocaron en un recipiente con etanol al 100 %, para luego ser flameadas, una vez frías se aplicó un antibiótico de amplio espectro. Las puntas de biopsias una vez limpias se conservaron para su próximo uso en un recipiente plástico limpio.

En todas las localidades de muestreo, se intentó muestrear a los delfines trasladándose paralelos a la embarcación cercanos a la superficie del agua y cuando los animales salen a respirar cerca de la embarcación de muestreo es decir, realizando *bow-riding*. Dependiendo de la profundidad en la que se encontraba el delfín, el palo de biopsia fue presionado o suavemente arrojado sobre la zona lateral cercana a la base de la aleta dorsal del animal. El palo de biopsia se sostuvo en un ángulo entre 60° y 90° aproximadamente a la superficie del agua (Fig. 1.3).



Figura 1.3. Fotografía ilustrando el muestreo de biopsias de delfines oscuros, *Lagenorhynchus obscurus*, utilizando un palo de biopsia como dispositivo para la toma de muestras.

El muestreo de biopsias estuvo condicionado a buenas condiciones meteorológicas, solo se llevaron a cabo las sesiones de muestreo si el estado del mar era menor a 3 en la escala de Beaufort y durante las horas del día. Estas condiciones permiten la observación de los movimientos de los delfines antes de que rompan en superficie, pudiendo predecir el lugar y posición de salida de los animales de manera de disminuir el impacto.

Un grupo de delfines fue definido como cualquier grupo de animales que se encuentran próximos (<10 m) el uno del otro (Smolker et al., 1992). Cuando un grupo de delfines fue avistado se registró la posición (mediante el uso de GPS), y se asignó la composición del grupo, tamaño del grupo y la actividad predominante de los delfines antes de comenzar con el muestreo de biopsias y después si alguno de estos parámetros cambiaron durante el muestreo. De acuerdo a su composición, los grupos se clasificaron en: grupos de adultos y juveniles (consistente en animales de diferentes tamaños, todos los cuales eran más grandes que las crías), madres con cría (grupos con más del 80% de pares madres y crías) y grupos mixtos (una combinación de los adultos, juveniles y crías, todos los cuales forman una sola unidad). La edad se designó en función de la longitud del cuerpo de un individuo. Los delfines oscuros alcanzan la madurez sexual a la edad de 6-7 años (Dans et al., 1997), aunque los animales de 3 años de edad, tienen casi la misma longitud que los adultos (aproximadamente 1,70 m; Dans, 1999). Los animales más pequeños se asumieron que eran juveniles, los individuos que tenían menos de dos tercios de la longitud de los adultos y que eran acompañados constantemente por un adulto fueron considerados como crías (hasta 1 año de edad; Dans, 1999). Para los grupos de madres con crías, el grupo se abandonaba si no se tomaban muestras de biopsias en los primeros 10 minutos invertidos con los animales, de manera de evitar su hostigamiento. El tamaño de los grupos de delfines se asignó a una de las siguientes categorías: menor a 10, 11 a 20, 21 a 50, 51 a 70 y mayor a 70 individuos (Degradi et al., 2008).

Para asignar el comportamiento de los delfines se consideró la actividad predominante. Esto es la actividad que están realizando la mayoría de los individuos del grupo (Mann, 1999) y fue asignada mediante el muestreo de scan (Altman, 1974). Las actividades fueron clasificadas en 5 categorías: alimentación (A), traslado (T), socialización (S), descanso (D) y nado errático (N) (Degradi et al., 2008). Los estados comportamentales se detallan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Estados comportamentales considerados durante el estudio en los grupos de delfines oscuros.

Estado comportamental	Descripción
Alimentación	Los animales nadan en círculo o en zig-zag, rodeando el cardumen, puede haber saltos. Generalmente hay aves alimentándose al mismo tiempo.
Traslado	Los animales nadan en una dirección predominante con ninguna o muy pocas interrupciones.
Socialización	Algunos o todos los animales muestran frecuente contacto físico, moviéndose en la misma dirección, algunos hacia otros delfines, la dirección de los movimientos varía constantemente y los saltos son muy frecuentes.
Descanso	Los animales se encuentran flotando o nadando lentamente cerca de la superficie del agua sin una dirección.
Nado Errático	Los animales nadan lentamente y no todos en la misma dirección.

El muestreo de biopsias se llevó a cabo durante todos los estados comportamentales. No se tomaron muestras de biopsias en crías o juveniles con una longitud corporal menor al 50% de la longitud corporal de un adulto.

Se utilizó el método de observaciones *Ad libitum* (Altman 1973) para registrar la respuesta comportamental al muestreo de biopsia. La respuesta comportamental fue clasificada en alguna de las cinco categorías establecidas previamente (protocolo modificado de Bilgmann et. al., (2007) y Krützen et. al., (2002): categoría 0, no hay reacción observable y el individuo continua nadando (*bow-riding*) con la embarcación; categoría 1, el animal produce un corcoveo pero continua nadando con la embarcación; categoría 2, el individuo muestreado acelera bajo el agua y abandona la embarcación; categoría 3, el individuo acelera y abandona la embarcación seguido por un salto simple o *porpoise*¹ y categoría 4, el individuo acelera y abandona la embarcación seguido por múltiples saltos y/o *porpoise*. La respuesta comportamental de un individuo fue registrada tanto si el muestreo fue exitoso, (se obtuvo muestra de biopsia) o no-exitoso (no se obtuvo muestra de

¹ *Porpoise*, los animales nadan rápido sacando casi todo el cuerpo fuera del agua. Las aletas pectorales quedan siempre en contacto con la superficie y la aleta caudal rara vez sale del agua (Norris & Dohl, 1980).

biopsia o el palo fue arrojado al agua sin tomar contacto con un delfín). Las categorías 0, 1 y 2 fueron consideradas como respuestas leves y las categorías 3 y 4 como respuestas fuertes al muestreo de biopsia.

Un día típico de muestreo involucró, un capitán encargado de la navegación, una persona en la proa de la embarcación sosteniendo el palo de muestreo y encargado de la toma de muestras y otra persona detrás observando y registrando la respuesta comportamental a la toma de biopsia, además esta persona es la encargada de tomar notas del individuo recientemente muestreado (e.j. patrón de coloración, cicatrices en la aleta dorsal o cuerpo, sexo si es posible). La segunda persona también es la responsable de cambiar las puntas de biopsia y preservar las muestras tomadas. Durante toda la manipulación de las mismas se trabaja con guantes de látex para minimizar la contaminación de las muestras.

Análisis Estadísticos

Se determinaron los posibles factores que influyen en la respuesta comportamental de los individuos muestreados mediante el palo de biopsia. Los factores considerados fueron, si el muestreo fue exitoso o no exitoso, localidad de muestreo, tipo y tamaño de grupo y actividad predominante.

Para analizar la relación entre la respuesta comportamental (reacción a la toma de biopsia) y el éxito en el muestreo (exitoso; no exitoso), se puso a prueba la siguiente hipótesis: "La respuesta comportamental es independiente del éxito de muestreo". También se puso a prueba la hipótesis: "La respuesta comportamental es independiente de la localidad de muestreo. Para poner a prueba ambas hipótesis se construyeron tablas de contingencia de 2 vías. Para ambos casos en que se construyeron tablas de contingencia, la variable fue la frecuencia de ocurrencia y los estadísticos de prueba utilizados fueron el estadístico de máxima verosimilitud G y el χ^2 (Conover, 1999; Siegel & Castellan, 1995). En los casos en que no hubo frecuencias de ocurrencia iguales a cero se utilizó el G, en caso contrario el estadístico utilizado fue el χ^2 , se realizó la corrección χ^2 de Yates cuando fue necesario. En todos los casos el nivel de significancia fue de 0.05.

Para analizar estadísticamente la relación entre la respuesta comportamental y los factores, tipo, tamaño de grupo y actividad predominante se construyeron tablas de contingencia de 3 vías. Las frecuencias de ocurrencia fueron clasificadas en las siguientes tablas: tamaño de grupo x éxito muestreo x respuesta comportamental; tipo de grupo x éxito muestreo x respuesta

comportamental; actividad predominante x éxito muestreo x respuesta comportamental. A partir de estas tablas se pusieron a prueba las hipótesis de interés mediante la utilización de modelos log-lineales. Los estadísticos de prueba utilizados fueron los correspondientes a los modelos log-lineales utilizados. Estos estadísticos se calculan comparando la verosimilitud de dos modelos que difieren en algún término que representa el efecto en consideración. Si consideramos dos modelos M1 y M2, y suponemos que los términos en M2 son un subconjunto de términos de M1, entonces el ajuste de M2 no puede ser mejor que el ajuste de M1, la relación log-verosimilitud medirá el impacto de los términos excluidos de M2 sobre la bondad de ajuste. Este cambio, ΔG^2 , se distribuye según una distribución χ^2 con grados de libertad igual al incremento en grados de libertad en los dos modelos que están siendo comparados. Si ΔG^2 es significativamente grande, concluimos que los términos que fueron excluidos tienen un gran efecto (Caswell, 2001). Tablas de contingencia de 4 vías no fueron analizadas debido a la gran cantidad de celdas con valores 0 (Caswell, 2001).

De manera de compensar el tamaño muestral bajo para realizar las pruebas estadísticas, la respuesta comportamental clasificada en las categorías 1–4 fueron combinadas como "*reacción*" y aquellas clasificadas en la categoría 0 como "*no reacción*".

Proporción de sexos en los delfines oscuros

Los animales muestreados fueron sexados molecularmente mediante la utilización de cebadores (*primers*) específicos de los cromosomas sexuales, ZFX y ZFY (Bérubé & Palsbøll, 1996). EL sexado molecular se realizó para detectar si existió un sesgo en la proporción de sexo en los animales muestreados durante la toma de biopsias en delfines de vida libre mediante el palo. Una vez realizado el sexado molecular se realizó la prueba de Bondad de Ajuste para determinar si la muestra ajusta a la proporción de sexo 1:1. Siendo la hipótesis puesta a prueba: "la proporción de sexo de los delfines oscuros se ajusta a la relación 1:1" y la hipótesis alternativa: "la proporción de sexo de los delfines oscuros difiere de la relación 1:1".

RESULTADOS

Muestreo de Biopsias

Durante los años 2008 y 2009 se realizaron en total 109 intentos de muestreo y se colectaron 58 muestras de biopsias (53,2 % tasa de éxito de muestro). Cuando los datos se dividieron en las 3 localidades de muestreo la tasa de éxito fue la siguiente: 25/61 intentos exitosos de muestreo para

el Golfo Nuevo, 17/32 muestras de biopsias para el Golfo San José y 16/16 intentos exitosos en la toma de biopsias para el Golfo San Matías. No se encontraron diferencias significativas en la respuesta comportamental de los delfines al muestreo de biopsia cuando los datos fueron clasificados en las diferentes localidades de muestreo ($\chi^2 = 3,70$ $P = 0,146$, $g.l. = 2$, Fig. 1.4). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la respuesta comportamental en relación al éxito de muestreo, para todos los datos combinados ($\chi^2 = 0,11$ $p = 0,7358$, $g.l. = 1$, χ^2 Yates corregido).

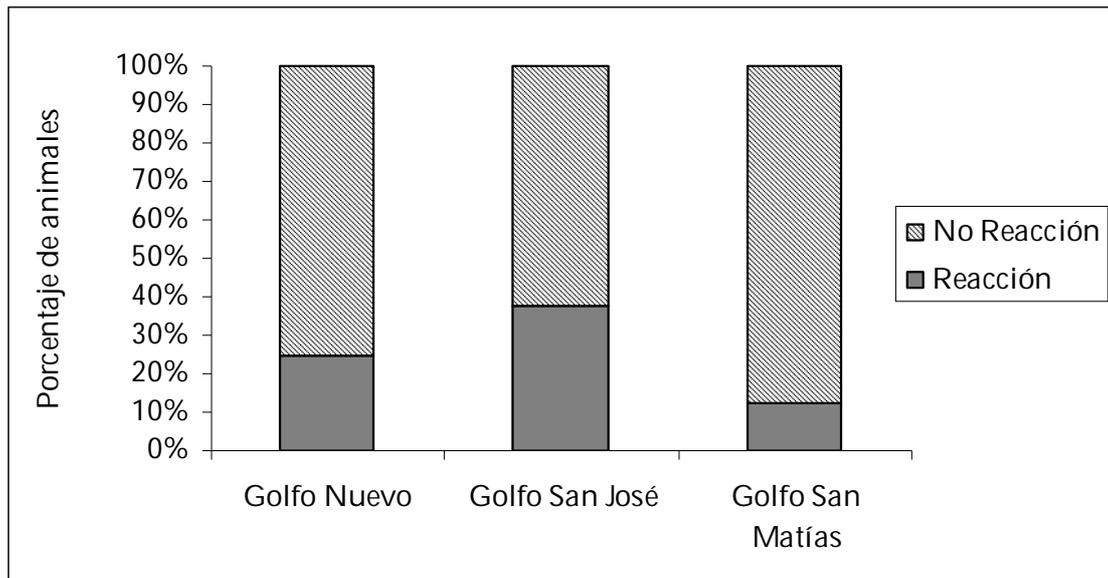


Figura 1.4. Porcentaje de delfines oscuros (*Lagenorhynchus obscurus*, $n = 109$) con reacción y sin reacción a la toma de biopsia por localidad de muestreo.

La respuesta comportamental registrada con mayor frecuencia a la toma de biopsia fue acelerar bajo el agua y abandonar la embarcación (categoría 2, Tabla 1.2), mientras que la segunda categoría más frecuentemente observada fue no hay reacción observable y el individuo continúa nadando (categoría 0, Tabla 1.2). Cuando el palo fue arrojado al agua sin tomar contacto con un delfín o no se logró tomar la muestra de biopsia, no se observó ninguna reacción y el animal continuó nadando junto a la embarcación (categoría 0, Tabla 1.2). Solo en una ocasión se observó que el animal después de ser muestreado aceleró y se alejó de la embarcación seguido de un salto simple/*porpoise* (categoría 3, Tabla 1.2). Ningún individuo reaccionó mediante múltiples saltos/*porpoises* (categoría 4, Tabla 1.2). La mayoría de los animales regresaron a la embarcación luego de ser muestreados y continuaron nadando. La herida de la biopsia es generalmente redonda y blanca logrando un contraste en la piel del animal por lo que es fácil de observar y permite evitar el remuestreo en los delfines.

Tabla 1.2. Respuesta comportamental de los delfines oscuros a la toma de muestras de biopsia mediante el uso de un palo de biopsia como dispositivo.

Respuesta	Exitoso/ No exitoso			Total
	SM	GSJ	GN	
0	14/0	5/15	11/35	30/50
1	0/0	0/0	2/0	2/0
2	2/0	12/0	12/0	26/0
3	0/0	0/0	0/1	0/1
4	0/0	0/0	0/0	0/0
Total	16/0	17/15	25/36	58/51

En total se avistaron y muestrearon 93 grupos de delfines oscuros durante el estudio. Los tamaños de grupo más avistados fueron 11-20, 21-50 y >70 delfines; los grupos con menos de 10 individuos y 51-70 se avistaron en menor frecuencia. En cuanto a la estructura de edades, los grupos de adultos y juveniles fueron más frecuentes en el área de estudio, mientras que grupos de madre con cría y mixtos fueron menos frecuentes. El tamaño de grupo estuvo significativamente asociado al tipo de grupo de delfines oscuros ($\chi^2 = 93,06$, *g.l.* = 8, $p < 0,001$; Figura 4). Los grupos más grandes fueron típicamente grupos mixtos mientras que los grupos más pequeños estuvieron compuestos principalmente por grupos de adultos y juveniles, teniendo en cuenta que los grupos de madre con crías generalmente fueron evitados durante el muestreo de manera de minimizar el hostigamiento y estrés. Solo un grupo de madre con cría avistado estaba compuesto por más de 20 individuos (Fig. 1.5).

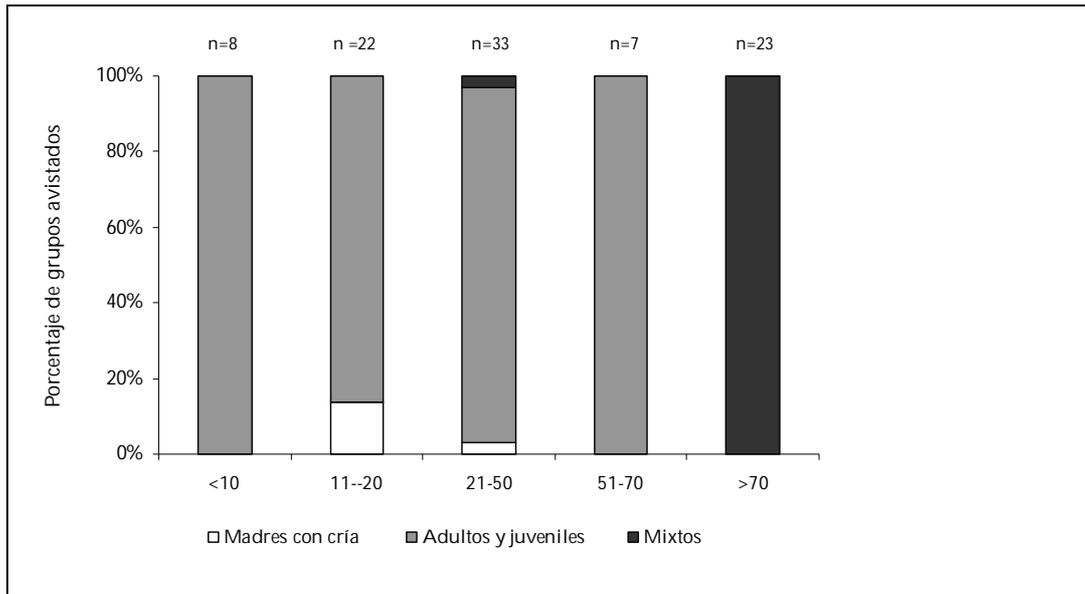


Figura 1.5. Tamaño y composición de los grupos de delfín oscuro (*Lagenorhynchus obscurus*, n = 93) en el área de estudio.

La respuesta comportamental de los animales a la toma de biopsia estuvo significativamente asociada al tamaño de grupo al que pertenecían los individuos muestreados, los grupos mas grandes reaccionaron en menor frecuencia que los grupos de tamaños chicos ($\Delta G = 30,47$, $g.l. = 10$, $p < 0,001$; Fig. 1.6). Esta asociación significativa puede estar relacionada con el hecho que los grupos más grandes de delfines oscuros tuvieron mayor cantidad de intentos de muestreos exitosos, dado que los grupos pequeños de delfines son más difíciles de acercar para realizar el muestreo de biopsia ($r^2 = 0,775$, $n = 11$, $p = 0,005$) (Fig. 1.7).

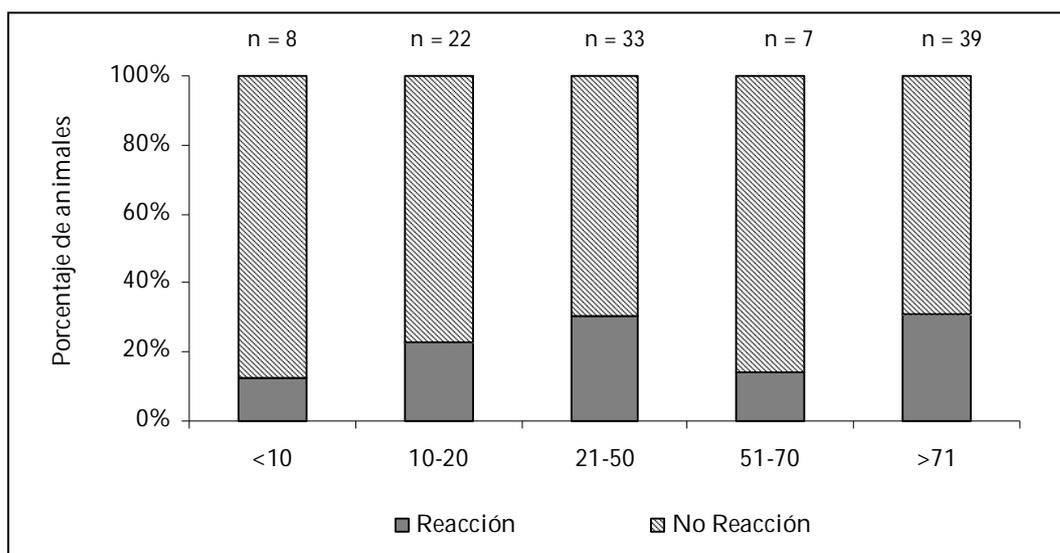


Figura 1.6. Tamaño de grupo y porcentaje de delfines oscuros (*Lagenorhynchus obscurus*; n = 109) con reacción o sin reacción a la toma de biopsia.

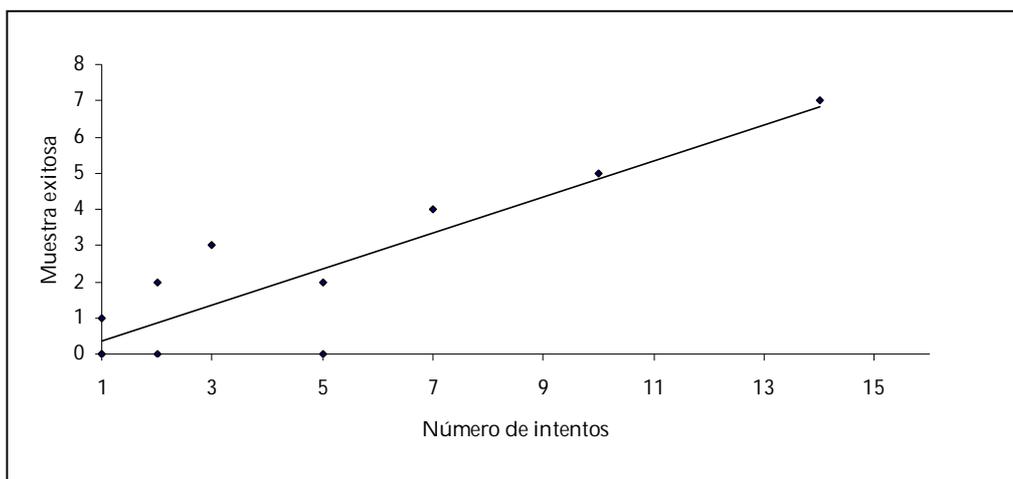


Figura 1.7. Regresión lineal simple de intentos de muestreo vs. Muestras exitosas de delfines oscuros (*Lagenorhynchus obscurus*) en el área de estudio.

La composición del grupo también influyó la respuesta a la toma de biopsia, los individuos que pertenecían a grupos de madre con cría reaccionaron en mayor frecuencia que aquellos que formaban parte de grupos de adultos y juveniles o grupos mixtos ($\Delta G = 28.41$, *g.l.* = 3, $P < 0.001$; Fig. 1.8). Por lo tanto los animales de grupos pequeños compuestos usualmente por madres con crías reaccionan más frecuentemente al muestreo de biopsias que los animales de grupos grandes compuestos por adultos y juveniles o grupos mixtos.

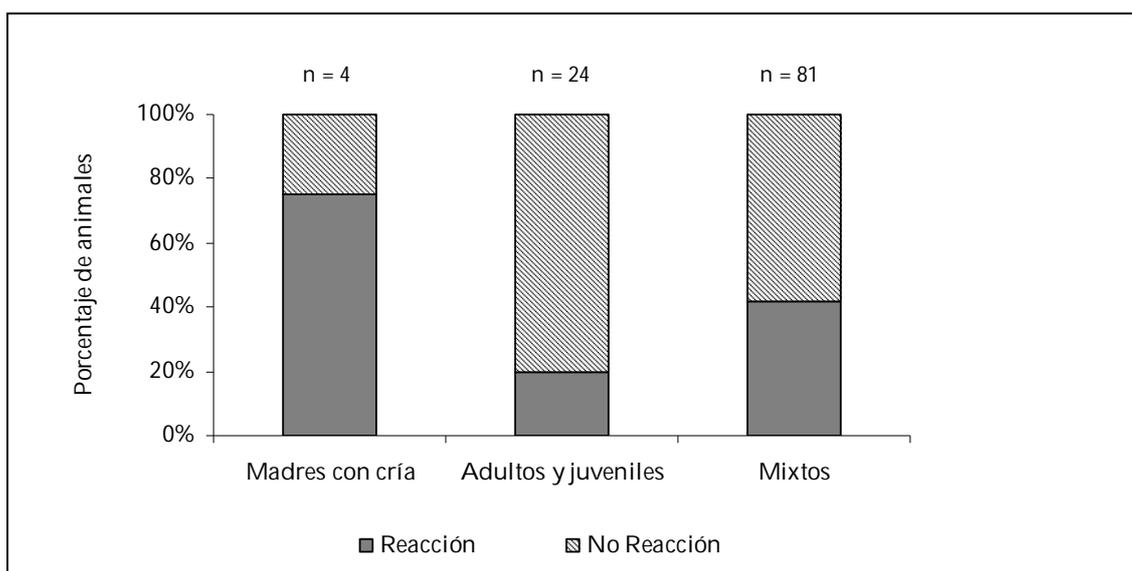


Figura 1.8. Tipo de grupo y porcentaje de delfines oscuros (*Lagenorhynchus obscurus*; $n = 109$) con reacción o sin reacción a la toma de biopsia.

La actividad predominante en la que se encontraban los delfines antes y durante el acercamiento de la embarcación para el muestreo de biopsia también afectó la respuesta al

muestreo ($\Delta G = 33,24$, $g.l. = 10$, $P < 0,001$; Fig. 1.9), sin embargo ningún grupo cambió su actividad durante o una vez terminado el muestreo de biopsia. Los delfines que se encontraban en *nado errático* reaccionaron más intensamente al muestreo que aquellos delfines involucrados en actividades más energéticas como el *traslado* o *socialización*. Solo un intento de muestreo fue realizado en delfines en *descanso*, sin embargo no se pudo tomar una muestra de biopsia, debido al comportamiento de evitación hacia la embarcación de investigación.

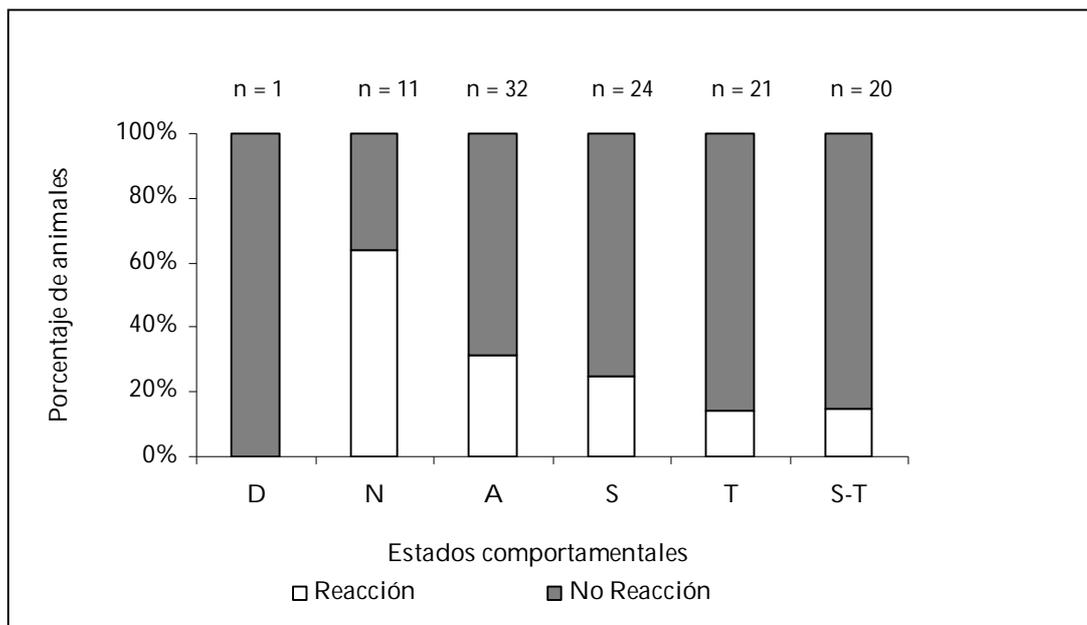


Figura 1.9: Estados comportamentales y porcentaje de delfines oscuros (*Lagenorhynchus obscurus*; $n = 109$) con reacción o sin reacción a la toma de biopsia. D = Descanso, N = Nado errático, A = Alimentación, S = Socialización, T = Traslado, S-T = Socialización-Traslado.

La proporción de sexos de los delfines oscuros muestreados en las distintas localidades de estudio no difirió de 1:1 (valores de $p = 0,5344 - 1$).

DISCUSIÓN

La técnica utilizada en este estudio para la recolección de muestras de biopsias, resultó ser un método eficiente para la obtención de muestras de piel y grasa de delfines oscuros de la costa de Argentina. La contribución de este capítulo es otra visión de cómo el palo de biopsia debe ser incorporado y más utilizado dentro del conjunto de dispositivos disponibles al momento de coleccionar muestras de biopsias de animales de vida libre. El objetivo fue identificar las variables que pueden alterar el comportamiento de los delfines muestreados con el fin de brindar información que permita reducir el estrés y disminuir el impacto.

La tasa de éxito en este estudio fue 53% para los delfines oscuros en las tres localidades a lo largo de la costa de Argentina. El porcentaje de éxito en el muestreo en delfines oscuros para el Golfo San Matías fue 100%, 53% de éxito en el Golfo San José y el 41% de éxito en el Golfo Nuevo. Bilgmann y colaboradores (2007), utilizando el palo de biopsia como dispositivo de muestreo reportó el 87,5 % de éxito en el muestreo para delfines nariz de botella, *Tursiops truncatus*, y 77,8% para delfines comunes, *Delphinus delphis*, en Nueva Gales del Sur, y en Australia 62 % de éxito en delfines nariz de botella y el 77,8 % en delfines comunes. Sin embargo, la mayoría de los estudios utilizan dispositivos a larga distancia como ser ballestas o rifles. La tasa de éxito reportada usando métodos de muestreo a larga distancia fue 65 % para orcas, *Orcinus orca* (Barret-Lennard et al., 1996), para delfines nariz de botella 68 % éxito (Krützen et al., 2002), 67 % éxito (Gorgone et al., 2008) y 11.5% éxito (Parson et al., 2003); para el delfín manchado, *Stenella attenuata*, el éxito de muestreo fue del 65 %, 70% éxito para el delfín rotador (*Stenella longirostris*), el 77 % de éxito para el delfín Indo-Pacífico, *Tursiops aduncus* y el 78 % de éxito de muestreo para el delfín de cabeza de melón, *Peponocephala electra* (Kiszka et al., 2010). Por lo tanto, las tasas de éxito fueron similares utilizando los dos métodos de muestreo de biopsia y los dos métodos son fáciles de utilizar. Sin embargo, los dos métodos pueden utilizarse en situaciones diferentes (ej., delfines que se acercan nadando a la embarcación, *bowriding* vs. Delfines que no realizan *bowriding*) y en algunos casos para contestar preguntas diferentes. Por ejemplo, cuando un animal necesita ser identificado para determinar la estructura social los dispositivos a larga distancia mantienen los grupos cohesivos, mientras que el palo de biopsia podría ser mas útil para contestar preguntas acerca de la estructura de la población en general (proporcionando mayor control, opción de bajo impacto). Por consiguiente, se recomienda la combinación de ambos dispositivos de muestreo para facilitar el alcance de los objetivos científicos y ayudar a reducir el hostigamiento y estrés animal.

Los animales mostraron reacciones leves al muestreo de biopsia tanto si el muestreo fue exitoso o no exitoso, lo que indica que la reacción está probablemente causada por el hecho de un disturbio inesperado, más que a la toma de biopsia propiamente dicha. Además, la embarcación de investigación debe acercarse lo mas próximo posible a los animales para realizar el muestreo mediante el uso del palo, por lo que la embarcación misma tendría un efecto sobre el comportamiento de los delfines que no es intencional, no observable y por lo tanto no registrado en este estudio. Algunos autores, encontraron que los delfines oscuros cambian o alteran su comportamiento en presencia de embarcaciones comerciales, especialmente aquellos delfines que se encontraban en traslado o alimentación (Coscarella et al., 2003; Dans et al., 2008). En este estudio, se utilizó el mismo tipo de embarcación durante todo el experimento, de manera de

controlar y minimizar el impacto realizado por la embarcación de investigación, y en el caso de encontrar animales alimentándose nos mantuvimos a una distancia >100m para no interferir con este comportamiento.

Durante este estudio solo en una ocasión se registró una reacción fuerte, el animal muestreado aceleró y abandonó la lancha de investigación dando un salto/*porpoise* (categoría 3). Es importante resaltar el hecho de que nuestra percepción a la reacción esta limitada a las actividades que realizan los delfines en superficie, y que posiblemente existan reacciones significativas bajo el agua. Bilgmann y colaboradores (2007), también encontraron las mismas reacciones al muestreo tanto si fue exitoso o no en delfines comunes y nariz de botella. Por lo que los resultados de este estudio y el estudio de Bilgmann y colaboradores (2007) sugieren que el palo de biopsia como dispositivo para realizar el muestreo de biopsia generalmente provoca leves respuestas comportamentales en distintas especies de pequeños cetáceos, ya sea que fueron o no muestreados exitosamente, además sugieren que las diferentes especies reaccionan de forma similar al muestreo de biopsia, pudiéndose de esta manera predecir y prevenir futuros accidentes durante el muestreo.

Por otro lado, la toma de biopsias produce principalmente reacciones leves y a corto plazo consistentes con estudios previos que han utilizado este y otros métodos a larga distancia (por ejemplo, Weinrich et al., 1992; Clapham & Mattila, 1993; Brown et al., 1994; Barrett- Lennard et al., 1996; Weller et al., 1997; Krützen et al., 2002; Bilgmann et al., 2007; Gorgone et al., 2008; Kiszka et al., 2010). Además, los delfines oscuros que han sido parte del muestreo de biopsia no alteraron su patrón de comportamiento a largo plazo dado que permanecen en la zona y son fácilmente accesibles para estudios sistemáticos que se realizan en la región.

La respuesta comportamental de los delfines oscuros al muestreo de biopsia estuvo significativamente asociada al tamaño de los grupos, donde los delfines que pertenecen a grupos de gran tamaño reaccionaron en menor medida que aquellos de grupos pequeños. Además existe una clara tendencia a que el éxito en el muestreo durante las sesiones de muestreo fuera mayor para grupos grandes que para grupos pequeños, esta asociación podría estar dada por el hecho de que en los grupos grandes hay mayor cantidad de eventos de muestreos exitosos que en los grupos pequeños. Kiszka y colaboradores (2010), encontraron el mismo patrón en otras especies de pequeños cetáceos, los autores observaron que la tasa de éxito en el muestreo de biopsia aumenta con el aumento en el tamaño de grupo. Sin embargo, el tamaño de grupo está significativamente asociado a la composición de edades de los grupos, tal que los grupos grandes son típicamente

grupos mixtos y/o están compuestos por adultos y juveniles, mientras que los grupos pequeños son principalmente madres con crías (Degrati et al., 2008). Consecuentemente, los animales que pertenecen a grupos de madre con crías reaccionaron en mayor medida a la toma de biopsia que aquellos que forman parte de grupos de adultos y juveniles y grupos mixtos. Por lo que, no se pudo determinar si el tamaño o la composición del grupo de delfines (o ambos) fue el factor causal de la reacción al muestreo.

Durante los muestreos de biopsia se observó que los grupos de delfines involucrados en comportamientos energéticos, como ser *socialización*, *traslado* o *alimentación*, reaccionaron en menor frecuencia que los grupos de delfines en *nado errático*. Kiszka y colaboradores (2010), encontraron que los grupos de delfines en *descanso* y *socialización* mostraron una respuesta más fuerte que los grupos en traslado. Degrati y colaboradores (2008), hallaron que el patrón de comportamiento de los delfines oscuros en el Golfo Nuevo fue traslado, seguido por nado errático y alimentación; además encontraron que las madres con cría invertían mayor tiempo en comportamientos de nado errático y descanso, mientras que los grupos grandes de adultos y juveniles así como también los grupos mixtos invertían mayor tiempo en traslado y alimentación. Por lo tanto, como medida preventiva, cuando sea posible, se recomienda realizar los muestreos de biopsias durante los comportamientos de *socialización* y *traslado* que involucren grupos grandes donde la clase de edad adultos y juveniles esté presente o en grupos de composición mixta.

No se encontró ningún sesgo en relación al sexo en las muestras de biopsias colectadas en los delfines oscuros en los tres golfos norpatagónicos, la proporción 1:1 se mantuvo constante en toda el área de estudio. Otros estudios tampoco encontraron sesgo en la proporción de sexo en los animales muestreados (Krützen et al., 2002, 2004; Möller & Beheregaray 2004; Bilgmann et al., 2007). Sin embargo, Harlin y col. (2003), reportaron un sesgo en la proporción de machos en delfines oscuros de la costa de Nueva Zelanda que fueron muestreados mediante la técnica de raspado de piel; los autores observaron que esta proporción variaba entre las localidades y períodos de muestreo. Los autores proponen que esta variación podría estar reflejando cambios estacionales en el patrón espacial de ocupación de los delfines oscuros en Nueva Zelanda además que podría existir una segregación por edad y sexo dependiendo de la estación del año y la localidad de muestreo. Se requiere de mayor esfuerzo de estudio en la costa de Argentina para determinar el patrón espacio-temporal y las determinantes ambientales de la segregación por edad y por sexos de los delfines oscuros.

Se conoce que la magnitud del sesgo y la influencia durante el proceso de muestreo sobre machos comparada con las hembras varía entre especies y hábitats (Harlin et al., 1999; Quérouil et al., 2007, 2010). Mientras que el sesgo durante el muestreo podría reflejar una predominancia estacional a lo largo de todo el año de machos en ciertas poblaciones, también podría estar influenciado por otros factores, como ser la selectividad de los encargados de la toma de biopsia y de los comportamientos en los que los delfines se encuentran al momento del muestreo (rechazo de las hembras a las embarcaciones, curiosidad y/o comportamientos de defensa por machos; comportamiento de apareamiento/cópulas en los grupos de delfines, etc.) (Quérouil et al., 2010). Sin embargo, También se mantuvo la paridad de sexo en 76 muestras de delfines comunes, 33 muestras del delfín Indo-Pacífico (Möller & Beheregaray 2001), y 28 en delfines nariz de botella (Möller et al., 2008). Por el contrario, Quérouil et al., (2010) utilizando una ballesta encontraron que las muestras de biopsia colectadas en delfines nariz de botella, delfines manchados del Atlántico y en delfines comunes, la proporción de sexo estaba globalmente sesgada a favor de los machos, además encontró que este sesgo varía entre especies y hábitats. Los autores sugirieron que las hembras y los machos reaccionan de diferente manera ante una perturbación. La reacción comportamental puede estar causada por el muestreo de biopsia, es decir, en la colecta de la biopsia propiamente dicha, por cambios en la maniobra de la embarcación, como ser cambios en la velocidad, cambios bruscos en vueltas y aceleraciones y cambios bruscos en la proximidad a los animales (Quérouil et al., 2010). Otro estudio reveló un fuerte sesgo hacia los machos en muestras de biopsias colectadas con ballestas en el Archipiélago de las Azores (Quérouil et al., 2007). Sin embargo, como los grupos de madre con cría fueron abundantes durante el período de muestreo, el sesgo en la proporción de sexo, no estaría reflejando la actual estructura de la población. Por lo tanto, teniendo en cuenta las potenciales variaciones que se pueden encontrar en los comportamientos entre las especies de pequeños cetáceos así como las variaciones en el patrón espacial de los mismos, se recomienda evaluar cada situación individualmente para poder encontrar una proporción insesgada de sexos en la población.

CONCLUSIÓN E IMPLICANCIA EN EL BIENESTAR ANIMAL

El palo de biopsia diseñado durante este estudio es de bajo costo, simple de adquirir y rápido en armar y desarmar durante los eventos de muestreo. Como consecuencia, los tiempos entre los intentos de muestreos son mínimos comparados con los tiempos invertidos en el armado y recuperación de muestras en dispositivos de larga distancia, como ser la recuperación de las flechas y dardos cuando se utilizan ballestas, pistolas o rifles. Por lo tanto el palo como dispositivo

reduce el tiempo invertido en el muestreo y ayuda a disminuir el hostigamiento y el estrés de los animales. Esto implica que el bienestar de los animales puede mejorarse si se utiliza este método, donde es práctico hacerlo. También se recomienda que se tomen muestras de biopsias en delfines en traslado, con el fin de minimizar aún más los efectos negativos del muestreo. Otra gran ventaja de este dispositivo incluye la disminución del riesgo de que las puntas y flechas de biopsias permanezcan adheridas al animal, y aumenta la precisión al momento de muestrear un animal, minimizando golpear al animal en partes del cuerpo sensibles. Para los sistemas de larga distancia, las líneas o tanzas que se utilizan para recoger las flechas o dardos pueden enmallarse en el animal y la alta presión ejercida para permitir la recuperación de un dardo con la línea enmallada en un delfín común ha resultado en una penetración muy profunda en el animal biopsiado causando por consiguiente su muerte (Bearzi, 2000). En conclusión, el muestreo de biopsia utilizando el palo de biopsia como dispositivo de muestreo presentado en este capítulo es seguro y simple, capaz de obtener muestras con gran material epitelial suficiente para la amplificación de múltiples marcadores moleculares y de grasa para análisis de contaminantes y de isótopos estables en pequeños cetáceos.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES

En este capítulo se describirá la metodología utilizada en el laboratorio para la extracción, amplificación, secuenciamiento y genotipificado de las muestras del delfín oscuro. Los laboratorios en donde se realizaron las tareas para la realización de esta tesis doctoral fueron, el Laboratorio de Biología Molecular, Universidad de Durham, Durham, UK, Laboratorio de Genética del CENPAT-CONICET y el Laboratorio de Ecología de Mamíferos-Laboratorio de Biología Molecular Universidad de Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS, San Leopoldo, Brasil.

MUESTRAS DE BIOPSIA Y NECROPSIAS

EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizaron todas las muestras preservadas en solución de DMSO al 20% saturada con NaCl (Amos & Hoelzel 1991; Hoelzel & Dover 1988) y aquellas preservadas en alcohol para la extracción del material génico. El protocolo utilizado para la extracción del material génico, ADN, de los individuos fue el protocolo de extracción estándar de fenol-cloroformo (Hoelzel, 1998c). La extracción de ADN se realizó a partir de un promedio de 100 mg de tejido. Cada muestra se cortó por separado con bisturí, entre muestras la hoja de bisturí fue pasada por alcohol y flameada, y se renovaba la hoja de bisturí cada 5 muestras. Posteriormente el tejido se mantuvo en digestión con proteinazas (Prot-K INC Biomedicals) durante 36-72hs en un baño de agua a 37°C, en 500 µL de solución amortiguadora (buffer) de extracción [100 mM NaCl, 50 mM Tris pH= 7,5, 1 mM ácido etileno diamino tetracético (EDTA)] y sulfato de sodio (SDS) al 1% (p/v). El tiempo en el baño de agua dependió del tipo de muestra, las muestras de piel provenientes de biopsias fueron las que mas demoraron en digerirse, seguidas por las de piel e hígado proveniente de disecciones de animales varados o captura incidental y las de menor tiempo aquellas que fueron tomadas por raspado de piel de delfines de vida libre (ver Introducción, Toma de muestras). Se hicieron 2 extracciones con 500 µL de fenol:cloroformo:isoamil (25:24:1) y 2 extracciones más con 500 µL de cloroformo:isoamil (24:1). El ADN se precipitó en frío en 45 µL 3.0 M NaOAC (pH 7.6) y 1 ml de etanol al 100% (-4°C). Después, se centrifugó y se secó el ADN en una centrifuga al vacío (Speed

Vac) por 2 min., luego se secaron por evaporación a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió a 37°C en 200-500 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH= 8, 1 mM EDTA pH= 8) dependiendo del tamaño del pellet (Hoelzel, 1998c). El tamaño, calidad y concentración de los productos de extracción se corroboraron por medio de electroforesis (1-2.5 µL, 30 min a 100 volts) en gel de agarosa al 1,5-2%, teñidos con Bromuro de Etidio (EtBr; 50 ug/mL). Fueron visualizados con luz UV y comparadas con un marcador de peso molecular de 1000 pb (Invitrogen, www.invitrogen.com) (Fig. 2.1).

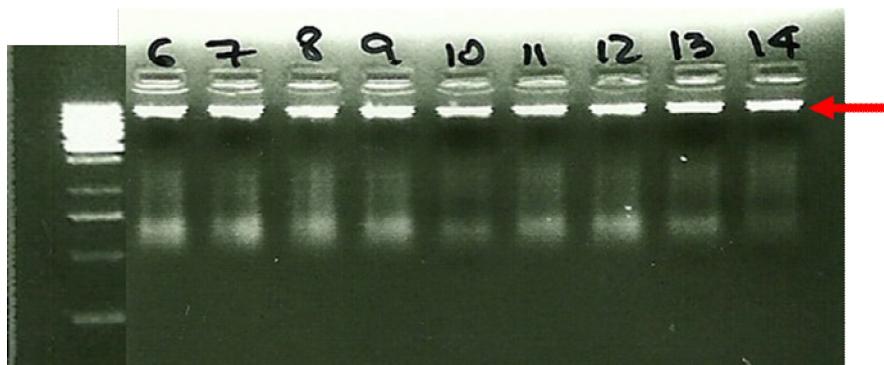


Figura 2.1. Gel de agarosa al 1,5% para visualizar la extracción de ADN provenientes de muestras de biopsia (piel) del Golfo San Matías. La flecha roja indica el ADN extraído. La escalera utilizada es de 1Kb.

ADN MITOCONDRIAL

El genoma mitocondrial en organismos pluricelulares consiste en una molécula circular de doble cadena de ADN con una longitud de 15.000-19.000 pb (pares de bases) (Hoelzel & Dover, 1991a). El ADN mitocondrial (ADNmt) codifica para 37 genes, de los cuales 24 codifican para la maquinaria de transcripción del mismo ADNmt (22 ARNs de transferencia y dos ARNs ribosomales). Los 13 genes restantes codifican para subunidades de la cadena de transporte de electrones, donde los carbohidratos y las grasas se oxidan para generar dióxido de carbono, agua y ATP (Ballard & Whitlock, 2004). La replicación y la transcripción se inician en la región control donde están presentes algunas regiones que no se transcriben (Fig. 2.2; Hoelzel & Dover, 1991a). El ADNmt evoluciona de 5 a 10 veces más rápido que el ADN nuclear y, gracias a esta alta tasa de mutación, el polimorfismo es más fácilmente detectable que en proteínas o en ADN nuclear. La tasa de mutación del ADNmt es aproximadamente de 10^{-8} /sitio/año comparada a 10^{-9} /sitio/año en genes nucleares (Brown et al., 1979, Ferris et al., 1983, De Salle et al., 1987). La mayoría de las diferencias en las secuencias del ADNmt están dadas por mutaciones puntuales, con un gran sesgo a las transiciones por encima de las tranversiones (Brown et al., 1982, 1983).

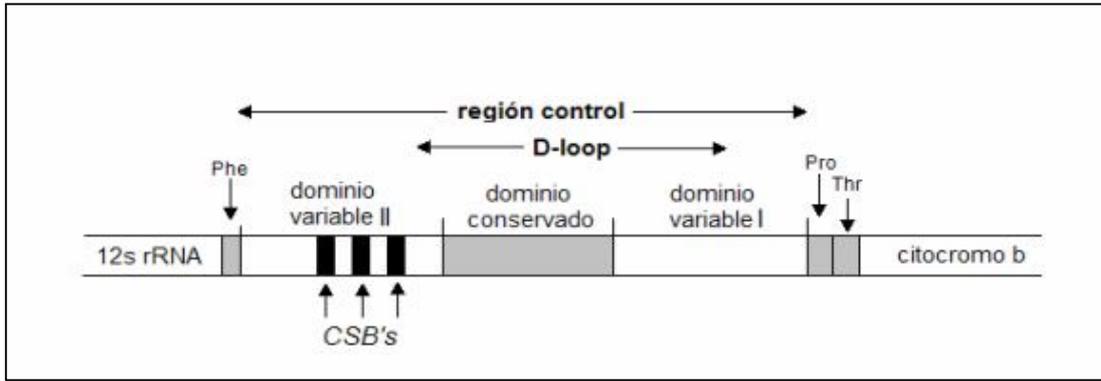


Figura 2.2. Principales dominios de la región control del ADN mitocondrial de mamíferos (Taberlet, 1996; citado por Avise, 2000). Existen dos regiones variables dentro de la región control, que flanquean una región más conservada. En uno de los dominios variables, se encuentran dos o tres zonas de secuencias conservadas (CBS: conserved sequence blocks).

El ADNmt es haploide, de herencia materna y no recombinante, por lo tanto, representa únicamente la filogenia materna, permitiendo una comprensión directa de los patrones de dispersión maternos. Este patrón de herencia uniparental hace a la molécula más sensible a fluctuaciones en el tamaño de la población (Berta & Sumich, 1999). Muchos aspectos de la estructura o la dinámica de las poblaciones pueden determinarse con estudios a partir de secuencias de segmentos de ADNmt. Los límites geográficos de la distribución de una especie, las tasas de migración, subdivisiones en una población y estimaciones del tamaño efectivo pueden ser estimados por medio del análisis de ADNmt. Sin embargo, uno de los usos más importantes de esta molécula es la determinación de identidad de especies o estructura de linajes en muchas especies en peligro de extinción o bajo manejo (Berta & Sumich, 1999).

Los análisis de variabilidad genética del ADNmt se concentran en gran medida a la región control (en mamíferos ~1000 pb), debido a que es una zona hipervariable del genoma mitocondrial (Fig. 2.2). La región control es la principal región de regulación y la única no codificante en el ADNmt. Contiene la cadena pesada de la replicación (Desjardins & Morais, 1990) y los promotores de la cadena liviana y pesada de la transcripción (L'Abbé et al., 1991). La región control es la región más variable del ADNmt (Avise, 2000). La mayoría de los estudios que han utilizado la región control se han concentrado en estudios filogeográficos tanto en grandes ballenas (Pastene et al., 2007, 2009) como en pequeños cetáceos (Cassens et al., 2003, Rosa et al., 2005, Harlin-Cognato et al., 2007), estudios de estructura poblacional (Olavaria et al., 2007, Méndez et al., 2008, Natoli et al., 2005, Pimper et al., 2010), relaciones filogenéticas entre organismos cercanamente relacionados (Banguera-Hinestroza et al., 2002, Natoli et al., 2004, Caballero et al.,

2007, 2008), etc.. En esta tesis se seleccionó un fragmento de 750pb del extremo 5'-OH de la región control del ADNmt como marcador para realizar la estimación de la diversidad genética (Hoelzel, 1998 a, b).

MICROSATÉLITES

Los microsatélites son secuencias simples de ADN altamente variables, estas secuencias consisten en segmentos cortos de ADN de unidades repetidas en tándem, de 1-6bp de longitud, normalmente dinucleótidos (Tautz & Schlötterer, 1994). Son muy abundantes en las células eucariotas y también están presentes en células procariotas pero en menor frecuencia. Casi nunca incluyen más de 70 unidades de repetición y están dispersos a lo largo de todo el genoma. Por ejemplo en mamíferos se ha estimado que el motivo más común (GT/AC) ocurre en promedio cada 30kb. Esto implica que la mayoría de los microsatélites están alojados en una copia simple de ADN. Presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigóticos de los heterocigóticos), y con un número muy alto de alelos en un mismo locus (altamente polimórficos). Su genotipado resulta relativamente fácil y automatizable, con la posibilidad de realizar amplificaciones múltiples en una misma reacción de PCR, con resultados fáciles de analizar, fiables y repetitivos (González, 2003).

El polimorfismo de los microsatélites esta dado por los cambios en las unidades repetidas causadas por un mecanismo de mutación intramolecular llamado "*DNA slippage*" o "Deslizamiento de la polimerasa". Este mecanismo es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Levinson & Gutman, 1987; Schlötterer & Tautz, 1992; Strand et al., 1993; Tautz & Schlötterer, 1994; Kruglyak et al., 1998; Eisen, 1999). Debido al apareamiento equivocado de las bases se duplica el segmento (Tautz & Schlötterer, 1994; Wells, 1996; Pearson & Sinden, 1998 a,b; Petruska et al., 1998) (Fig. 2.5).

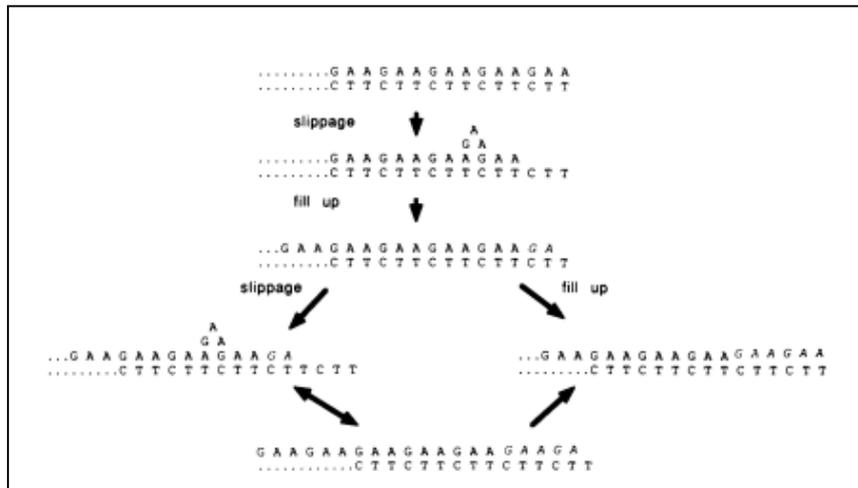


Figura 2.5. Modelo de síntesis de Deslizamiento de ADN (*"DNA slippage"*). La figura muestra los eventos que ocurren durante la síntesis de un polímero GAA / TTC en uno de los dos extremos. Después de que se ha producido el deslizamiento (*"slippage"*), se forma de manera transitoria una protuberancia, lo que probablemente se mueve a través de toda la cadena de ADN. El extremo 5' final puede ser rellenado (nucleótidos en cursiva). Se asume que solo dos nucleótidos se llenan antes de que el complejo ADN/polimerasa se vuelva inestable. Esto permite que ocurra tanto un segundo evento de deslizamiento (*"slippage"*) antes de que comience una nueva reacción de llenado o que los nucleótidos restantes se llenen antes de que el complejo ADN/polimerasa haya sido restablecido.

La evolución y función de los microsatélites es desconocida. Existe todavía controversia sobre qué patrones siguen en los cambios de tamaño de alelos de una generación a otra, que factores determinan la tasa de mutación (Hancock, 1999; Li et al., 2002; Sibly et al., 2003), y la función que pueden desempeñar debido al hecho de que se encuentran tanto en regiones codificantes como no codificantes (predominantemente en estas últimas) (Tautz et al., 1986; Kashi et al., 1997; Kashi & Soller, 1999; Li et al., 2002). Las tasas de mutación observadas varían entre 10^{-3} a 10^{-6} (Tautz & Schlötterer, 1994; Schug et al., 1997). Las mutaciones más comunes son cambios en una unidad simple repetida (Ohta & Kimura, 1973). Los modelos que se han considerado más relevantes para explicar la evolución de los microsatélites son tres: el modelo de alelos infinitos (Infinite Allele Model, IAM) (Kimura & Crow, 1964), el modelo del K-alelo (K-allele model, KAM) (Crow & Kimura, 1970) y el modelo de Mutación de a Pasos (Stepwise Mutation Model, SMM) (Kimura & Ohta, 1978) (Fig. 2.6). Este último es el que se ha aplicado más ampliamente, e implica que las mutaciones suponen la pérdida o ganancia de una sola unidad de repetición, y por lo tanto, las mutaciones tienen lugar sobre alelos ya presentes en la población, es decir, que mantienen cierta "memoria" sobre el estado alélico anterior (Weber & Wong, 1993; Goldstein et al., 1995; Balloux & Goudet, 2002). Este modelo se definió inicialmente para explicar la distribución de las frecuencias alélicas en alozimas, pero se aplica

mejor a los microsatélites, donde se asume que las mutaciones ocurren más fácilmente de una manera regular. Por el contrario, según el modelo IAM, las unidades de repetición mutan en un número variable y por lo tanto el resultado no depende del estado alélico previo de la población. Por último, el modelo KAM asume k posibles estados alélicos en una población y cada alelo tiene una probabilidad constante ($\mu / (k-1)$) de mutar de entre los $k - 1$ estados alélicos restantes (Crow & Kimura 1970).

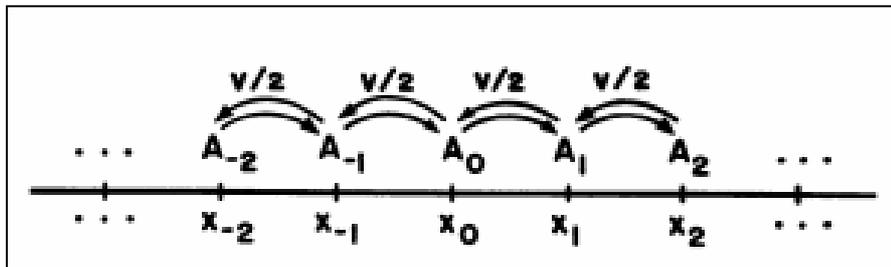


Figura 2.6. Diagrama ilustrando el modelo de Mutación de a Pasos (Stepwise Mutation Model, SMM) donde v es la tasa de mutación. Se asume que el cambio mutacional en dirección positiva o negativa ocurre en igual frecuencia. (Extraído de Kimura & Otha, 1978).

Existe también una gran variabilidad en la cantidad de secuencias de microsatélites en los genomas de diferentes especies en términos de frecuencia, longitud y tipo de repetición (Tóth et al., 2000; Neff & Gross, 2001). Por ejemplo, se sabe que los microsatélites son bastante abundantes en peces (DeWoody & Avise, 2000), insectos himenópteros (Choundary et al., 1993) y mamíferos (Forbes et al., 1995). Sin embargo, son relativamente raros en los genomas de aves (Primmer et al., 1997), en plantas (los cuales presentan cinco veces menor cantidad de microsatélites que los mamíferos) (Lagercrantz et al., 1993) y en lepidópteros (Saccheri & Bruford, 1993). La amplificación cruzada para un mismo locus suele mantenerse cuando se trabaja con taxones cercanos pertenecientes al mismo género o a géneros separados recientemente (Scribner & Pearce, 2000), mientras que la información que ofrecen los microsatélites se suele perder a niveles suprafamiliares. A pesar de que los microsatélites poseen altas tasas de mutación, las regiones flanqueantes están más conservadas, y por tanto se pueden utilizar para establecer hipótesis filogenéticas entre especies cercanas. Son estas regiones flanqueantes conservadas las que se utilizan como "cebadores" (*primers*) (Tautz, 1989; Rassmann et al., 1991) para la amplificación mediante PCR. El polimorfismo de los microsatélites viene dado por el número de repeticiones en un determinado locus, revelado como variación en la longitud de los fragmentos de los productos de PCR.

En los últimos años, la utilización de microsatélites como marcador molecular en estudios de conservación de la biodiversidad ha aumentado considerablemente debido a su alto polimorfismo. Estos marcadores son particularmente útiles para resolver diversas cuestiones relacionadas con la conservación de la diversidad genómica, como la detección de posibles cuellos de botella, medida del flujo génico e hibridación entre poblaciones, determinación de paternidades, asignación de individuos a su población de origen y determinación de la estructura poblacional, entre otras (González, 2003).

El fragmento se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés, Saiki et al., 1988) siguiendo protocolos estándares (Hoelzel et al., 1991b). Para la amplificación se utilizaron cebadores universales MTCRf (5'-TTC CCC GGT GTA AAC C) y MTCRr (5'-ATT TTC AGT GTC TTG CTTT) (Hoelzel, 1998 a, b). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25µl que contenía 1ul de ADN, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2 mM MgCl₂, 200 µM de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 0,3 µM de cada cebador y 1 unidad de Taq ADN polimerasa. La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 5min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1min a 51°C, 1:30min a 72°C y 45seg a 94°C; posteriormente se sometió a 1min a 51°C y una extensión final de 8min a 72°C. En todas las reacciones de PCR se utilizó un negativo (agua purificada) y un positivo (muestra con muy buena calidad de ADN).

AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DEL ADN MITOCONDRIAL

La amplificación de los productos de la reacción de PCR del fragmento de 750pb del extremo 5'-OH de la región control del ADNmt se probó por medio de electroforesis (1 µL, 30 min a 100 volts) en gel de agarosa al 1.5-2%, teñidos con EtBr (50 ug/mL), y fueron visualizados con luz UV comparadas con un marcador de peso molecular de 1000 pb (Invitrogen) (Fig 2.3). Los productos de las amplificaciones exitosas fueron purificados con QIAgen PCR Purification Kit (Qiagen, GMBH, Alemania) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Por último, las concentraciones de los productos limpios de las amplificaciones se corroboraron por medio de electroforesis (1.5 µL, 30 min a 100 volts) en gel de agarosa al 1.5% antes de preparar la muestra para enviarla a un laboratorio comercial para su secuenciación. La secuenciación se realizó en la compañía Macrogen Inc., en Korea (http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp) y en el área de secuenciación de la Universidad de Durham, UK (DBS-GENOMICS, <http://www.dur.ac.uk/biosciences/services/dna/dnasequencing/>).

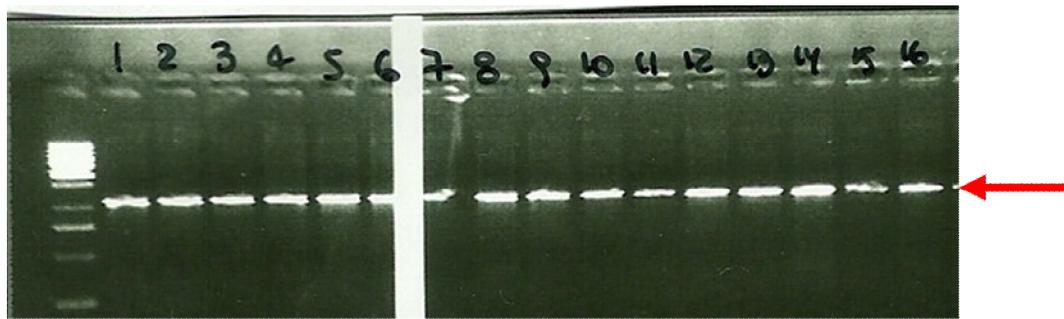


Figura 2.3. Visualización en gel de agarosa 1.5% de productos de amplificación de PCR de la región control del ADNmt del delfín oscuro. En el gel se utilizó la escalera de 1000 pb para comparar los productos de PCR. La flecha roja indica el producto de PCR obtenido.

Posteriormente a la secuenciación, se visualizaron los cromatogramas de cada muestra por medio del programa Chromas 2.0 (Technelysium Pty Ltd), lo que permitió corroborar cada una de las secuencias (Fig. 2.4). Se eliminaron aquellas muestras en las que la falta de claridad de alguno de los cromatogramas impidió la construcción de una secuencia. El análisis de las relaciones entre organismos está basado en hipótesis de homología las cuales infieren que los caracteres compartidos entre entidades biológicas se da por descendencia de un ancestro en común. Cuando se realizan análisis filogenéticos a partir de secuencias de ADN se realiza el alineamiento de las diferentes secuencias lo cual permite ver los cambios que han ocurrido en cada posición de la secuencia, entre los diferentes organismos que componen la muestra de estudio y representan las entidades biológicas en los análisis. El proceso de alineamiento puede realizarse de forma manual o mediante algoritmos de alineamiento múltiple o pareado desarrollados (por ejemplo, Clustal; Larkin et al. 2007). Para el caso de estudios con poblaciones o especies muy relacionadas, las secuencias analizadas presentan un grado de divergencia muy pequeño, por lo cual es posible hacer alineamientos manuales. Las secuencias obtenidas en esta tesis se alinearon las secuencias manualmente usando el programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999). Una vez alineadas las secuencias están listas para el posterior análisis.

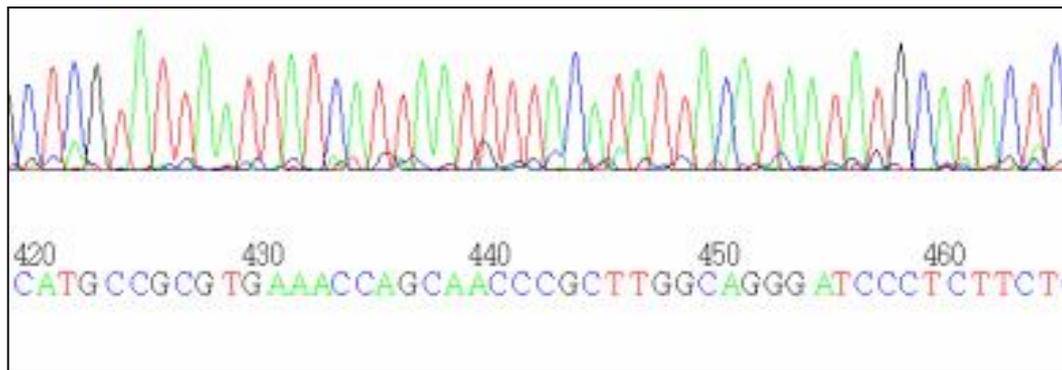


Figura 2.4. Cromatograma de la región control del ADNmt del delfín oscuro.

SELECCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES

Para la realización de esta tesis se seleccionaron 16 loci microsatélites variables, algunos diseñados previamente para la especie y otros pertenecientes a otras especies de pequeños cetáceos. La búsqueda de polimorfismo y de las condiciones óptimas de amplificación se realizó con un subgrupo de 5 individuos elegidos por la cantidad y calidad de ADN en la muestra. En el laboratorio, se utilizaron PCR con gradientes de temperatura de manera de amplificar más de un loci por corrida de PCR para encontrar las condiciones óptimas de amplificación para los diferentes loci de microsatélites para la especie en estudio. Luego de obtener las condiciones de reacción óptimas se eligieron aquellos loci que presentaban polimorfismo (Tabla 2.1), posteriormente se descartaron aquellos microsatélites que no presentaban variabilidad o fallaba la amplificación.

Tabla 2.1. 12 loci de microsatélites seleccionados para las muestras de delfín oscuro provenientes de la costa de Argentina. Se observa, las temperaturas de unión (Annealing T°), rango de pares de bases y sus referencias bibliográficas.

Locus	T° de Unión (Annealing T°)	Secuencia de los cebadores (5' - 3')	Rango pb	Referencias
EV37	53	F: AGCITGATGGAAGTCATGA R: TAGTAG AGCCGTGATAAAGTGC	200	Valsechi & Amos1996
Igf1	58	F: GGGTATFGCTAGCCAGCTGGT R: CATATFTTT'CTGCATAACTFGAACCT	138- 152	Andersen et al 1997
GATA 053	59	F: ATTGGCAGTGGCAGGAGACCC R: GACACAGAGATGTAGAAGGAG	>300	Palsbøll et al. 1997
KWM2a	49	F: GCTGTGAAAATTAATGT R: -CACTGTGGACAAATGTAA	200- 220	Hoelzel et al. 1998
Textvet 7	59	F: AACTGTAGGGTGTTCAGCAG R: CTTAATTGGGGGGGATTTAC	147- 195	Rooney et al. 1999
Lobs_Di 9	53	F: CAGTGAAGCAATGAAGAG R: <u>GTTTCTT</u> AGATGACTGACTTGAAGGAG	86-112	Cassens et al. 2005
Lobs_Di19	58	F: CCCAAAATAAACTGATGAGCAG R: <u>GTTTCTT</u> GGTAGAGTCACAGTGTGTTGC	86-128	Cassens et al. 2005
Lobs_Di 24	58	F: CCTCACTCAGGGGGAAATGGATTTA R: <u>GTTTCTT</u> GCTACTAAAATTGGACTCCCTGGAG	102- 130	Cassens et al. 2005
Lobs_Di 39	63	F: ATTAAACACTGATAACCCCGGACA R: <u>GTTTCTT</u> AAAAGCTATTTTGTGCTGTACCTA	90-110	Cassens et al. 2005
Lobs_Di 45	53	F: ATTTTGCAAACACAAGTG R: <u>GTTTCTT</u> CTACTATTTGAATGAAAAGAGAG	94-112	Cassens et al. 2005
Lobs_Di 7.1	63	F: ATCAGGGAGAGGTGAGAAGGGC R: <u>GTTTCTT</u> CCTTGCTTAGTCTTTTGCTACCTTA	118- 152	Cassens et al. 2005
Lobs_Di 47	58	F: TAGGGAGCCTATGTAAGACTTA R: <u>GTTTCTT</u> CAGGTTTACAGAATAGGACTTATTT	98-106	Cassens et al. 2005

Para los 12 microsatélites seleccionados para la realización de esta tesis doctoral, se utilizaron cebadores marcados fluorescentemente y se amplificaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las condiciones de reacción variaron para cada uno de los loci

microsatélite, dependiendo de la temperatura de unión ("*Anneling temperature*") con el DNA molde (Tabla 2.1). Con aquellas muestras obtenidas por biopsia y/o disección se utilizó la técnica de Multiplex, la cual permite la amplificación simultánea de varios loci microsatélites en un único tubo de PCR (Hoelzel 1998c). Para esto se eligen aquellos microsatélites que no se solapan en tamaño. El uso de marcadores fluorescentes de diferentes longitudes de onda permite la genotipificación de loci que se solapan en tamaño, a pesar que se recomienda el uso de loci no solapados (Hoelzel 1998c). El paso más crítico en la estandarización de PCR Multiplex es elegir correctamente las condiciones de PCR y la combinación de cebadores. Para esta tesis se utilizó el QIAGEN Multiplex PCR kit (QIAGEN 2008, www.qiagen.com) el cual utiliza HotStarTaq ADN polimerasa. La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: primero se prepara la mezcla de reacción ("*Master mix*") la cual contiene todos los componentes necesarios excepto por el ADN de la muestra; el volumen final de cada reacción fue de 50ul, conteniendo 25ul 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (concentración final de 3mM MgCl₂), 5ul 10x *primer mix* (mezcla de cebadores) (2ul de cada cebador de los microsatélites elegidos), agua purificada cantidad variable, ADN cantidad variable. La reacción se llevo a cabo en las siguientes condiciones: 15min a 95°C, seguido de 30-40 ciclos de 30seg a 94°C, 90seg a 57-63°C y 90seg a 72°C; posteriormente se sometió a una extensión final de 10min a 72°C. Cada programa de PCR Multiplex debe comenzar con un paso de activación de la HotStarTaq ADN polimerasa. El número de ciclos del programa dependerá de la cantidad y calidad del ADN de la muestra. Para las muestras en que no se pudo utilizar la técnica de Multiplex las condiciones de reacción fueron: volumen final de cada reacción fue de 20µl, conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2 mM MgCl₂, 200 µM de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 0,3 µM de cada cebador y 1 unidad de Taq ADN polimerasa. La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 5min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1min a 51°C, 1:30min a 72°C y 45seg a 94°C; posteriormente se sometió a 1 min a 51°C y una extensión final de 8min a 72°C. La temperatura de unión ("*anneling temperature*") varió con cada loci de microsatélite (Tabla 2.1). En todas las reacciones de PCR se utilizó un negativo (agua purificada) y un positivo (muestra con muy buena calidad de ADN). Después de la amplificación los productos de PCR se conservaron en heladera (temperatura aproximada, 5°C). Posteriormente, se visualizaron con luz UV en geles de agarosa al 1,5 o 2%, y comparadas con un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, www.invitrogen.com) (Fig. 2.7). Una vez amplificados y visualizados en gel, los productos de PCR se corrieron en un secuenciador automático ABI 3730 con sistema de marcado por fluorescencia. La variación y patrón alélico de los microsatélites amplificados fue caracterizado mediante el programa Strand versión 2.2.30 (Veterinary Genetics Laboratory,

University of California), la visualización y determinación de los tamaños de los alelos se analizaron de acuerdo a especificaciones del programa (Toonen & Hughes, 2001).

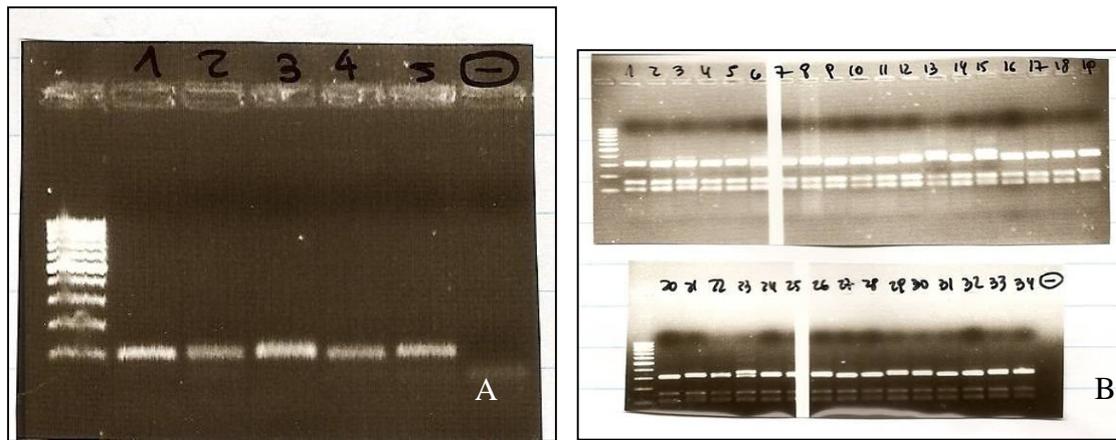


Figura 2.7. Visualización en gel de agarosa 1.5% de productos de amplificación de PCR de loci microsatélites del delfín oscuro. A) Loci Lobs_Di 45 para 5 muestras de delfín oscuro y el negativo de la reacción de PCR. B) Multiplex II, 4 loci microsatélites (Lobs_Di 24, Lobs_Di 47, GATA 053, Textvet 7) para 34 muestras de delfin oscuro y el negativo de la reacción de PCR. En los dos gels se utilizó la escalera de 100 pb para comparar los productos de PCR.

AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES ZFX Y ZFY

Aquellos individuos provenientes de muestras de biopsias o provenientes de animales varados o captura incidental de sexo indeterminado, se les determinó el sexo utilizando marcadores moleculares a través de la amplificación de porciones de los genes ZFX y ZFY (Berubé & Palsbøll, 1996) mediante PCR (Saiki et al., 1988). Para la amplificación se utilizaron los siguientes cebadores ZFYX0582F (5'-ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA), ZFX0923R (5'-GAATATGGCGACTTAGAACG) y ZFY00767R (5'-TTTGTGTGAACTGAAATTACA) (Berubé & Palsbøll, 1996).

Para la amplificación mediante PCR las condiciones de reacción fueron: volumen final de cada reacción fue de 20µl, conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1 mM MgCl₂, 200 µM de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 0,2 µM de cada cebador y 1 unidad de Taq ADN polimerasa. La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 5min a 94°C, seguido de 37 ciclos de 1min a 55°C, 1:00min a 72°C y 1:00min a 94°C; posteriormente se sometió a 1min a 51°C y una extensión final de 10min a 72°C. En todas las reacciones de PCR se utilizó un negativo (agua purificada) y dos positivos de sexo conocido (Rocky y Laura, dos delfines nariz de botella, *Tursiops truncatus*). Después de la amplificación los productos de PCR se conservaron en heladera

(temperatura aproximada, 5°C). Posteriormente, los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% (Fig. 2.8), correspondiendo una banda a las hembras y dos bandas a los machos.

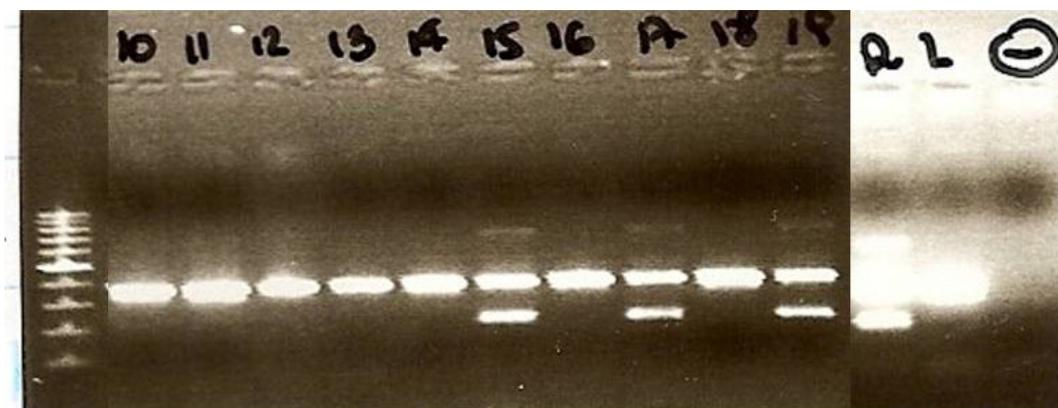


Figura 2.8. Visualización en gel de agarosa 1.5% de productos de PCR de porciones de los genes ZFX y ZFY, correspondiendo una banda a las hembras y dos bandas a los machos de delfín oscuro. En el gel se utilizó la escalera de 100 pb para comparar los productos de PCR.

Una vez amplificados y visualizados en el gel, los productos de PCR se desecharon, dado que solo se determina el sexo de los individuos corroborando la amplificación de las porciones de los genes ZFX y ZFY mediante la visualización de las bandas.

MUESTRAS DE HUESOS Y DIENTES

EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

La extracción y amplificación de muestras de huesos y dientes se realizó en el Laboratorio de Genética del CENPAT-CONICET. Además se utilizó el Laboratorio de ADN antiguo del Laboratorio de Ecología de Mamíferos/Laboratorio de Biología Molecular Universidad do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, Brasil. La extracción del material génico se realizó siguiendo dos protocolos, el POP-01 de Protocolo para extracción de ácidos nucleicos de huesos utilizado en el laboratorio CENPAT (ver Anexo 1) y Protocolo de extracción de Kit Dneasy Tissue Kit (Qiagen Inc. Valencia, CA) utilizado en el laboratorio de UNISINOS siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizaron fragmentos de huesos de longitud <2cm. Se utilizaron trece muestras, nueve fueron procesadas con descalcificación previa, dos sin descalcificación y dos con ambos métodos. El ADN obtenido fue resuspendido en 100µl de buffer AE y almacenado a -20°C. Debido al bajo rendimiento de las extracciones el ADN obtenido no fue cuantificado.

Una vez extraído el ADN, se amplificó un fragmento de la región control del ADN mitocondrial utilizando los siguientes cebadores Dlp10F (5'-CCACAGTACTATGTCCGTATT) Dlp5R (5'- CATCGWGATGTCTTATTTAAGRGGAA) (Baker et al., 1993). Se siguieron las instrucciones de QIAGEN kit (www.qiagen.com) para la amplificación de las muestras: volumen final de cada reacción fue de 25µl. La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 1min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1min a 55°C, 45seg a 72°C y 30seg a 94°C; posteriormente se sometió a una extensión final de 5min a 72°C. En todas las reacciones de PCR se utilizó un negativo (agua purificada) y un positivo. Después de la amplificación, los productos de PCR se conservaron en heladera (temperatura aproximada, 5°C). A continuación, los productos de visualizaron en geles de agarosa al 1,5% (Fig. 2.9).

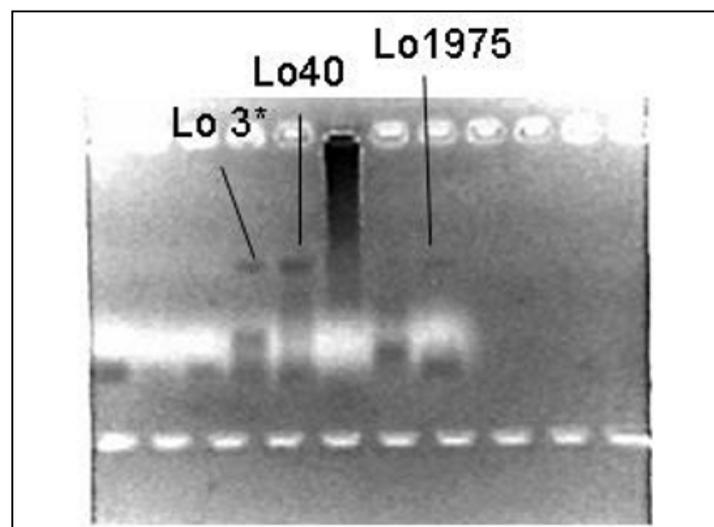


Figura 2.9. Visualización en gel de agarosa 1.5% de productos de PCR de la región control del ADNmt de las muestras de hueso y diente del delfín oscuro.

Posteriormente, las muestras se enviaron a secuenciar en la compañía Macrogen Inc., en Korea (http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp). Una vez secuenciados, se visualizaron los cromatogramas de cada muestra por medio del programa Chromas 2.0 (Technelysium Pty Ltd) y se alinearon las secuencias manualmente usando el programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) estando de esta manera listas para el posterior análisis.

CAPÍTULO III

ESTRUCTURA POBLACIONAL DEL DELFÍN OSCURO EN LA COSTA DE ARGENTINA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL Y MICROSATÉLITES

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones naturales de la mayoría de las especies se encuentran subdivididas o “estructuradas” en unidades locales de apareamiento separadas al azar llamadas demos. La subdivisión de una especie en subpoblaciones separadas significa que la variación genética dentro de cada especie existe en dos niveles principales: variación genética dentro de las poblaciones locales y diversidad genética entre las poblaciones locales. La comprensión de los patrones y la magnitud de la divergencia genética entre las poblaciones son fundamentales para la protección de las especies y el desarrollo de planes efectivos de conservación. Quizás lo más importante de por qué conocer la estructura genética de la población es que es esencial para identificar las unidades que serán conservadas (Allendorf & Luikart, 2007).

Muchas especies de mamíferos marinos muestran una fuerte estructura genética poblacional a pesar de poseer una gran movilidad y vivir en un ambiente aparentemente continuo, (Avice & Hamrick, 1996; Hoelzel & Dover, 1991; Dowling & Brown, 1993; García-Martínez et al., 1995; Hoelzel et al., 1998a, b; Pichler et al., 1998, Méndez et al., 2007, 2010, 2011; Pimper et al., 2011). La mayoría de las especies poseen diferenciación genética espacial o temporal entre las diferentes localidades geográficas (Avice et al., 1987). Se considera una metapoblación aquella que está compuesta por subunidades n (subpoblaciones, $n \geq 2$), que pueden o no representar a las poblaciones. Dentro de cada subpoblación el apareamiento es al azar, y las subpoblaciones están vinculadas por la migración. En consecuencia, dos escenarios extremos pueden ser identificados (Fig. 3.1). En la primera (Fig. 3.1A), las subpoblaciones están completamente aisladas (sin vínculos directos genéticos o demográficos) y realmente no se comportan como una metapoblación en absoluto, excepto, quizás, en escalas de tiempo muy largos. En este escenario por lo tanto, las subpoblaciones se considerarían poblaciones separadas. En el otro extremo (Fig. 3.1D), el apareamiento es aleatorio dentro de la metapoblación entera, en este escenario por lo tanto, la metapoblación es panmíctica y las subpoblaciones son arbitrarias

(Hanski & Gaggiotti, 2004; Waples & Gaggiotti, 2006). De hecho, en muchas poblaciones reales, pueden no existir poblaciones individuales o subestructura por lo que las poblaciones son continuas. Sin embargo, incluso en poblaciones efectivamente continuas, diferentes áreas pueden tener diferentes frecuencias génicas, debido a que toda la metapoblación en conjunto no es panmíctica. Una muy buena definición de la estructura de la población es que las poblaciones tienen desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg, o desviaciones de panmixia. Si existe endogamia, acción de selección, o si la migración es importante, entonces la población se puede decir que puede estar estructurada de alguna manera. Si las poblaciones están divididas, puede evolucionar independientemente una de la otra. La existencia de estructura en la población permite que las poblaciones se diversifiquen. Esta es la razón por la que la estructura de la población es una parte muy importante de la genética evolutiva (Hartl, 1988; Hedrick, 1985, 2001; Allendorf & Luikart, 2007).

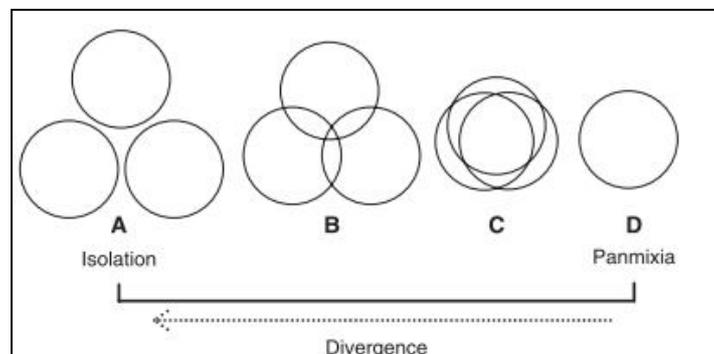


Figura 3.1. La continuidad de la diferenciación de la población. Cada grupo de círculos representa un grupo de subpoblaciones con diferentes grados de conectividad (coincidencia geográfica y/o migración). (A): Independencia completa. (B) Conectividad media. (C) Conectividad alta. (D) Panmixia; las "subpoblaciones" son completamente congruentes. Extraído de Waples & Gaggiotti, (2006).

El flujo génico es un importante componente de la estructura poblacional, ya que sus patrones y niveles determinan hasta qué grado cada población de una especie es una unidad evolutiva independiente (Slatkin, 1994). La tasa de movimiento de genes de una población a otra afecta de manera importante a las especies. Anteriormente se pensaba que el flujo génico en general era muy restringido y de poca importancia evolutiva (Levin, 1981). Sin embargo, se ha observado en distintas especies que los niveles estimados de flujo génico generalmente son altos (Riesberg & Burke, 2001) y que pueden actuar como una fuerza que mantiene integrada a la especie, además de influir en procesos ecológicos. Por ejemplo pueden determinar la persistencia y adaptación de poblaciones locales, las tasas de extinción de las especies, la evolución de los rangos de distribución de las especies y otras propiedades ecológicas (Whitlock & McCauley, 1999). Asimismo, si el flujo génico entre poblaciones de una especie es alto, todas ellas evolucionan de

manera conjunta (a menos que sea contrarrestado por selección o deriva génica), pero si es muy bajo, empiezan a divergir, lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y al establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Slatkin, 1994).

El flujo génico puede definirse como el intercambio de genes entre poblaciones diferentes pero relacionadas entre sí, el flujo de genes introduce nuevos alelos en el acervo genético, aumentando de esta manera la diversidad genética, homogeneizando las frecuencias alélicas entre las diferentes poblaciones y atenuando los efectos de la divergencia genética causada por el aislamiento (Fig. 3.2) (Avice & Hamrick, 1996; Page & Colmes, 1998). Es decir, el flujo génico entre poblaciones es la fuerza cohesiva que mantiene unidas a poblaciones geográficamente separadas en un unidad evolutiva simple, la especie (Allendorf & Luikart, 2007). En ausencia de otra fuerza evolutiva, el flujo génico entre poblaciones traerá homogeneidad genética, aunque sea en pequeñas cantidades. Sin embargo, la deriva génica en subpoblaciones aisladas causa divergencia entre estas. Por lo tanto, la cantidad actual de divergencia entre las subpoblaciones será un balance entre los efectos homogeneizantes del flujo génico haciendo las subpoblaciones más similares y los efectos disruptivos de la deriva causando divergencia entre las subpoblaciones.

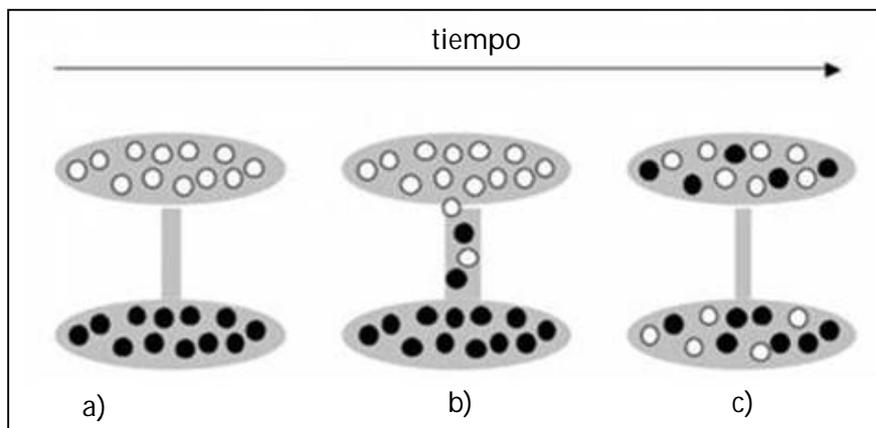


Figura 3.2. Representación de los cambios en las frecuencias alélicas debido al flujo génico. Dos subpoblaciones comienzan con diferentes frecuencias alélicas (indicadas por los círculos de blancos y negros), debido al azar (a). Intercambio de alelos a través de flujo génico (b) que resulta en la homogeneización de las frecuencias alélicas entre las dos poblaciones (c). Extraído de Page & Holmes (1998).

El patrón de flujo génico se examina mediante el análisis de diferentes modelos de migración. El modelo más simple que combina los efectos del flujo génico y la deriva es el Modelo de Migración de Isla propuesto por Sewall Wright (1969). Este modelo asume que la población está dividida en una serie de demos cada una de tamaño N que intercambian individuos a una tasa m . En cada generación un individuo tiene la probabilidad m de reproducirse en un demo que no

sea su demo natal. Un migrante tiene igual probabilidad de inmigrar a cualquiera de los otros demos. Un resultado importante de este análisis es que se necesita poco flujo génico para que las poblaciones se mantengan conectadas. En poblaciones naturales, la migración es a menudo mayor entre poblaciones que se encuentran cerca una de otra (Slatkin, 1987). Esto viola el supuesto de igual probabilidad de intercambio entre pares de subpoblaciones bajo el modelo de migración de isla. El Modelo de Migración de a Pasos (*Stepping stone model*) fue introducido por Kimura & Weiss (1964) y tiene en cuenta tanto la migración de corta dispersión (ocurre solo entre poblaciones adyacentes) y la migración de gran dispersión (ocurre al azar entre poblaciones). El modelo de migración lineal de a pasos es muy útil para modelar poblaciones con una estructura lineal en una dimensión, como ocurren a lo largo de ríos, líneas de costas, valles, etc. Este modelo se caracteriza por subdivisiones discretas conectadas por migración. Cada subpoblación existe en un conjunto uni o bidimensional e intercambia migrantes con sus vecinos más cercanos (dos en el caso lineal, cuatro en el caso plano). Al igual que el modelo de isla, el modelo de a pasos maneja unidades discretas, pero incorpora un criterio de aislamiento por distancia. Bajo este modelo, las poblaciones adyacentes serán más similares que las poblaciones distantes geográficamente, modelo de Aislamiento por Distancia. Con el modelo de isla de migración, la divergencia genética será independiente de las distancias geográficas (Allendorf & Luikart, 2007). El modelo de Aislamiento por Distancia propuesto por Wright en 1943 está del lado opuesto al modelo de isla en el continuo de estructuras poblacionales. En este modelo, la población no está subdividida en subunidades donantes o receptoras de migrantes, ni es una unidad panmíctica. Los cruzamientos al azar están limitados por la distancia, de modo que los individuos tendrán una mayor probabilidad de aparearse con vecinos que con individuos más lejanos.

El primer estudio que incluyó delfines oscuros, *Lagenorhynchus obscurus*, provenientes de la costa de Argentina, se publicó en 2003 por Cassens y colaboradores a escala hemisférica. Los autores proponen que la mayoría de los linajes observados actualmente se habrían originado en el Pacífico, dando como resultado múltiples eventos de migración desde el Pacífico hacia el Atlántico, y la fijación de un único y bien definido linaje poco diversificado de delfines oscuros en el Pacífico habría sido facilitado por fuertes y sucesivos cuellos de botella poblacionales causados por numerosos eventos de El Niño. Este escenario de dispersión es altamente probable al considerar la posible influencia de la Deriva de los Vientos del Oeste ("*Westwind Drift*" o CDO siglas en castellano) en los movimientos migratorios de las poblaciones de delfines oscuros (Van Waerebeek, 1993b), un patrón de migración que también ha sido sugerido para el género *Cephalorhynchus* (Pichler et al., 2001). Además, los autores revelaron una genealogía matrilineal sin

partición geográfica entre las poblaciones del Este y Oeste del Atlántico. Estos resultados sugieren que las dos poblaciones no han estado aisladas lo suficientemente para lograr una diferenciación genética o que ocasionalmente algunos individuos cruzan las aguas produciendo la existencia de flujo génico entre las poblaciones. Por otro lado, Harlin-Cognato y colaboradores (2007), proponen un origen en el Océano Índico del delfín oscuro y la fundación de una población en Nueva Zelanda que sirvió como población fuente para la migración hacia el Atlántico (Fig. 3.3). Por otro lado, los autores indicaron que cambios en la productividad primaria y cambios en la abundancia de las presas jugaron un rol fundamental en la estructuración filogeográfica del delfín oscuro, cambios moderados a corto plazo en la temperatura del mar y en el sistema de corrientes marinas tuvieron y tienen un gran efecto sobre las poblaciones de anchoíta, presa principal del delfín oscuro, por lo que es factible que fluctuaciones repetidas en las poblaciones de anchoíta jueguen un rol importante en la historia de las poblaciones de los delfines.

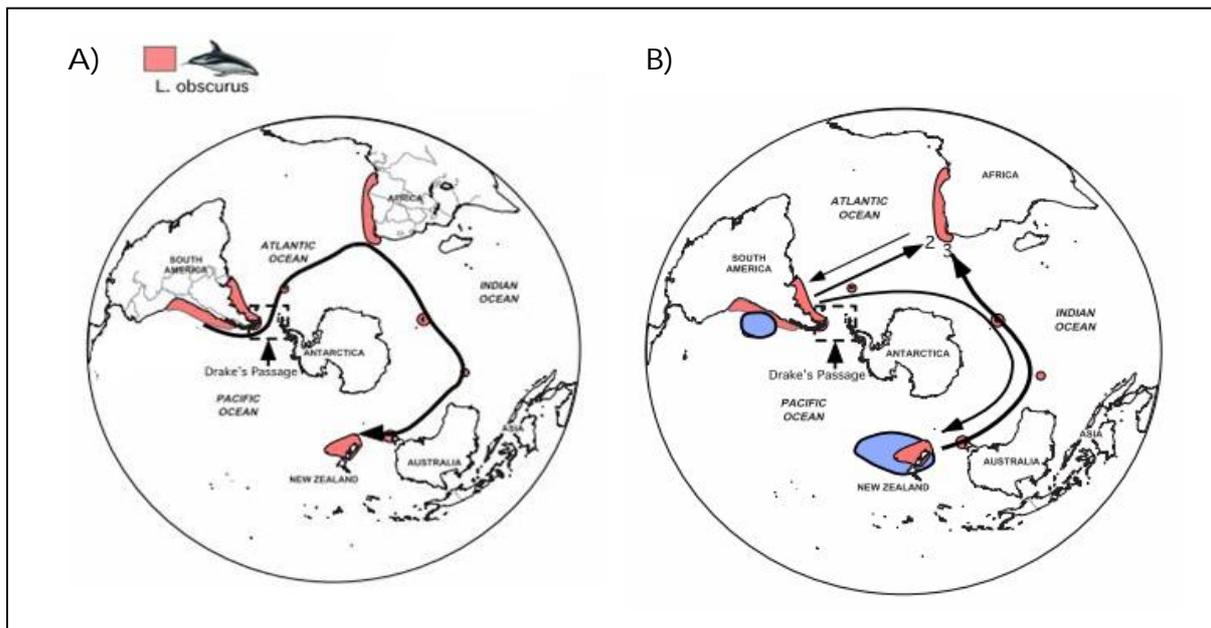


Figura 3.3. A) La hipótesis de Deriva de los Vientos del Oeste (“Westwind Drift” o CDO siglas en castellano) indica que los delfines oscuros se dispersaron vía una banda circumpolar de aguas frías ininterrumpidas, comenzando en la región costera del Perú, moviéndose hacia el Este a través del pasaje de Drake hacia Argentina, Sudáfrica y Nueva Zelanda. B) Hipótesis de dispersión del delfín oscuro a partir de secuencias de la región control, áreas azules sombreadas representan la hipótesis del origen del delfín oscuro como una trasgresión transecuatorial del *Lagenorhynchus obliquoides* aproximadamente 2 millones de años atrás. Este origen dio un aislamiento temprano de la población peruana y la fundación de una población en Nueva Zelanda que sirvió como población fuente para la migración hacia el Atlántico. Dirección de la flecha y el grosor indican la dirección y magnitud de las migraciones, respectivamente. (Extraído de Harlin-Cognato et al., 2007).

El delfín oscuro, especie objeto de esta tesis, está presente a lo largo del litoral argentino se lo puede observar desde aguas costeras y poco profundas hasta más de 100 millas de la costa. La única estimación de abundancia en todo el rango de distribución se realizó en las costas de Patagonia, donde se calculó la población en unos 7.000 ejemplares (4.039-10.877) (Schiavini et al., 1999). La región de la costa de Bs. As y Golfo San Matías se caracteriza por fuertes descargas de aguas continentales, influencia de la corriente de Brasil, y presencia de Sciaenidos (corvinas, pescadillas y lucerna); por otro lado la región comprendida por Golfo Nuevo hasta el sur del Golfo San Jorge se encuentra influenciada por la corriente de Malvinas y se caracteriza por la presencia dominante de la anchoíta como pez de forrajeo y merluza común. El delfín oscuro fue capturado incidentalmente en redes de cerco para la anchoíta en el norte de la costa argentina y la pesca de arrastre para langostino y merluza en el centro de la costa patagónica desde los años 90 (Corcuera et al., 1994; Crespo et al., 1994, 1997, 2000; Dans et al., 1997b, 2003). Durante la última década se han añadido otros impactos como las actividades turísticas basada en la observación de cetáceos (Coscarella et al., 2003; Dans et al., 2008). Información sustancial de aspectos biológicos y ecológicos se obtuvo durante las últimas décadas (Würsig & Würsig 1980, Koen Alonso et al., 1999, Dans et al., 1997a, 1999, 2003 a,b, 2008; Schiavini et al., 1999, Garaffo et al., 2007, 2010, Degradi et al., 2008). Sin embargo, no hay información sobre el número de poblaciones existentes a lo largo de la costa. La única evidencia de contacto entre distintas localidades del litoral argentino ha sido la recaptura de dos individuos marcados en el Golfo San José en la década del 70, siete años más tarde frente a las costas de Mar del Plata (38°S), 800 Km. más al norte (Würsig & Bastida, 1986). Esto sugiere un amplio potencial de dispersión pero se desconoce si este tipo de movimiento representa flujo génico. Existe un vacío de información acerca de los movimientos migratorios y de la estructura poblacional de esta especie en las aguas del mar Argentino, y se desconoce si los individuos presentes a lo largo del litoral argentino pertenecen a una única población panmíctica. Se requiere más información para definir políticas de manejo y conservación con respecto a esta especie importante en el ecosistema marino. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es determinar el grado de aislamiento poblacional del delfín oscuro a lo largo del litoral argentino para una adecuada implementación de planes de manejo y conservación de la especie teniendo en cuenta el impacto representado por la pesca y las actividades turísticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Para este capítulo se tomaron muestras de piel, riñón e hígado, hueso, diente (ver Introducción, Toma de muestra) a lo largo de la costa argentina. En total se utilizaron 171 muestras de delfín oscuro provenientes del litoral argentino. Para el análisis de estructura poblacional para el ADN mitocondrial, las localidades de muestreo fueron 6 regiones ordenadas latitudinalmente. La primera región corresponde a la costa bonaerense (Necochea, Mar del Plata y playas de la costa de la provincia de Bs. As.), la segunda al Golfo San Matías, Golfo San José, Golfo Nuevo, Golfo San Jorge y por último Ushuaia. Para el análisis de estructura poblacional para los microsatélites solo se utilizaron muestras de biopsias por lo que las regiones consideradas fueron Golfo San Matías, Golfo San José, Golfo Nuevo y Golfo San Jorge, dado la calidad y cantidad de ADN para la amplificación de estos marcadores. Estas localidades de muestreo no responden a barreras geográficas sino que representan potenciales unidades poblacionales del delfín oscuro. Dado que los delfines utilizan corredores acuáticos para desplazarse entre las regiones costeras, la distancia entre las localidades se calculó como la distancia en línea recta expresada en kilómetros entre pares de localidades de acuerdo a mapas tomados de Google Earth 6.0.3 (Keyhole, Inc.) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Distancia entre las 6 localidades de muestreo a lo largo de la costa argentina. BA= Buenos Aires, SM= Golfo San Matías, SJ= Golfo San José, GN= Golfo Nuevo, SJOR= Golfo San Jorge.

Localidad	Distancias (Km.)					Tamaño muestral (N)	ADNmt (n)	Microsatélites (n)	Ubicación geográfica (Lat.-Long.)
	BA	SM	SJ	GN	SJOR				
Buenos Aires						11	3	0	38° 40'S 58° 35'O
Golfo San Matías	651					26	18	19	41° 32'S 64° 24'O
Golfo San José	753	102				27	23	24	42° 20'S 64° 24'O
Golfo Nuevo	855	382	280			85	61	31	42° 45'S 64° 34'S
Golfo San Jorge	1553	902	800	520		21	12	21	46° 02' S 66° 18' O
Ushuaia	1955	1608	1708	1988	1100	1	1	0	54° 30'S 65° 40'O

Extracción y Amplificación de ADN

Se siguieron los protocolos mencionados en el Capítulo II de esta tesis.

Análisis Estadísticos

ADN mitocondrial

Estructura poblacional

AMOVA

La estructura genética de la población se infirió mediante el uso del Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA, Excoffier et al., 1992) utilizando el software Arlequín 3.1 (Excoffier et al., 2005). Este análisis incorpora información de divergencia haplotípica en formato de análisis de varianza, derivada de una matriz de distancia genética entre todos los pares de haplotipos. El AMOVA produce estimaciones de los componentes de varianza y análogos de F_{st} , designados aquí como Φ_{st} , reflejando la correlación entre la diversidad haplotípica y los diferentes niveles de subdivisión jerárquico. En el AMOVA la varianza se descompone en: a) variación de los individuos dentro de las poblaciones (Φ_{ST}); b) variación de los individuos entre poblaciones dentro de los grupos (Φ_{SC}); y c) variación de individuos entre los grupos de poblaciones (Φ_{CT}). Para evaluar la significancia de estos agrupamientos, el método realiza 10.000 o más permutaciones no paramétricas de haplotipos, de individuos y de poblaciones. Luego de cada permutación se recalculan los estadísticos para comparar con la hipótesis nula de que no hay estructura poblacional. El nivel de significancia de los componentes de la varianza asociados a los diferentes niveles de estructura genética, se calculó por procedimientos de permutación no-paramétricos (Excoffier et al., 1992). Esto garantiza menos del 1% de diferencia con la probabilidad exacta, en el 99% de los casos (Guo & Thompson, 1992). El tipo de permutaciones es diferente para cada componente de la varianza (diseño del AMOVA). El resultado se consideró significativo a un valor de $\alpha = 0.05$. Es decir, bajo la hipótesis nula de panmixia, cuando $P < 0.05$ se considera que la población está estructurada. Además, se realizaron comparaciones pareadas a partir del estimador Φ_{st} usando como modelo de sustitución propuesto por Jukes & Cantor.

SAMOVA

El análisis del SAMOVA consiste en definir grupos de poblaciones que están máximamente diferenciados unos de otros (es decir, aquellos para los que la proporción del total variación genética debido a las diferencias entre los grupos es máximo). Como un subproducto, estos grupos están separados unos de otros por una barrera genética. En contraste con las clásicas pruebas de estructura genética, en que los grupos de poblaciones se definen a priori sobre la base de datos físicos, ecológicos, caracteres lingüísticos o culturales, este método permite encontrar una

estructura de grupos basada únicamente en datos genéticos. El método asigna poblaciones a los grupos con la restricción de que deben ser geográficamente adyacentes y homogéneas genéticamente. El método se basa en un procedimiento de simulaciones anidadas que tiene como objetivo maximizar la proporción de la varianza genética total debido a las diferencias entre grupos de poblaciones (análisis espacial de la varianza molecular; SAMOVA siglas en inglés (Dupanloup et al. 2002).

Se utilizó SAMOVA (Dupanloup et al., 2002) para definir particiones de sitios de muestreo que están máximamente diferenciados unos de otros pero sin ninguna suposición a priori sobre la estructura geográfica, en esta tesis se analizaron de 2 a 5 unidades geográficas al azar.

Flujo génico

Se han utilizado medidas de estructuración genética, tales como el coeficiente Φ_{st} , para calcular el número de migrantes entre poblaciones. El modelo usado comúnmente para estimar flujo génico es el modelo de islas infinitas de Wright (1951) (ver Introducción, Capítulo III). Las poblaciones pueden ser tratadas como réplicas y el modelo se puede caracterizar con dos parámetros: tamaño poblacional efectivo (N_e) y tasa de migración (m). La importancia de la deriva génica es proporcional a $1/N$, mientras que la importancia del flujo génico es proporcional a m (Slatkin, 1985). Por su parte, en el modelo de Stepping-Stone introducido por Kimura (1953), las poblaciones se localizan en una especie de enrejado de una, dos o tres dimensiones y los individuos solo pueden moverse entre poblaciones adyacentes (ver introducción, Capítulo III). Para estimar el flujo génico con un método indirecto usualmente se emplea la fórmula de Wright (1951), cuando F_{st} (aquí designado como Φ_{st}) llega al equilibrio entre deriva génica y migración en el modelo de islas infinitas.

$$\Phi_{st} \approx 1 / (2 Nm + 1) \text{ para genoma haploide}$$

De acuerdo con este modelo, el flujo génico entre las diferentes subpoblaciones puede ser estimado como:

$$Nm \approx (1 - \Phi_{st}) / (2 \Phi_{st})$$

para organismos haploides y $ADNm_t$, siendo Nm equivalente al número efectivo de migrantes por generación. En términos generales, se ha propuesto que un migrante por generación - $Nm = 1$ - es suficiente para contrarrestar los efectos de la deriva genética entre poblaciones (Wright, 1951;

Slatkin, 1987); sin embargo, se recomienda considerar niveles mayores de flujo génico ($Nm > 5$) para especies amenazadas (Mills & Allendorf, 1996). Vucetich & Waite (2000), recomiendan $Nm > 10$ o $Nm > 20$ inmigrantes por generación para evitar una pérdida sustancial de la diversidad genética en aquellas poblaciones en que el tamaño de la población fluctúa en el tiempo.

Prueba de Mantel

Con el fin de conocer si la especie sigue un modelo de Aislamiento por Distancia, es decir, si existe una correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas obtenidas para los distintos pares de poblaciones (Wright 1943), se hizo una comparación formal con una prueba de Mantel (1967). Dicha prueba se realizó con el programa Arlequin y consiste en asociar dos o más matrices mediante permutaciones que permiten obtener una distribución empírica nula del coeficiente de correlación. El programa usa valores pareados de Φ_{ST} para estimar tasa de migración (Nm) y luego correlaciona este valor con la distancia geográfica entre poblaciones. El número efectivo de migrantes por generación (Nm) fue estimado como $Nm = (1 - \Phi_{ST}) / (2 \Phi_{ST})$. El test no paramétrico de Mantel (1967) considera la significancia estadística de esta correlación y determina si existe una relación lineal significativa entre el flujo génico y la distancia geográfica entre poblaciones. La matriz de distancias geográficas fue construida en base a las distancias en línea recta expresadas en kilómetros entre pares de localidades de acuerdo a mapas tomados de Google Earth 6.0.3 (Keyhole, Inc.).

Microsatélites

Estructura poblacional

AMOVA

Se analizaron 12 loci microsatélites variables. Las condiciones de amplificación y el análisis del tamaño de los fragmentos amplificados para todas las muestras se detallan en el Capítulo II de esta tesis. Para los análisis estadísticos se utilizaron 7 loci microsatélites para evitar sesgos por datos faltantes ("missing data") en el resto de los loci.

El grado de diferenciación poblacional (F_{st}) se estimó utilizando el programa ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier et al., 2005), considerando a cada localidad muestreada como una población a priori, de igual manera que fue hecha para la región control del ADN mitocondrial. La estructura poblacional también fue evaluada mediante el AMOVA (Excoffier et al., 1992) implementado en el programa Arlequín v 3.1, utilizando locus por locus AMOVA con 10100 permutaciones (Weir &

Cockerham, 1984)., cantidad de permutaciones que se recomienda cuando pueden existir datos faltantes. También se realizaron las comparaciones de a pares del F_{st} para todas las localidades de muestreo, exceptuando la localidad de Buenos Aires y Ushuaia para los cuales no se cuenta con datos de microsátélites.

STRUCTURE

Por otro lado, se examinó la existencia de una posible estructura poblacional utilizando un método de asignación bayesiana implementado en el programa STRUCTURE versión 2.3.1 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003; Hubisz et al., 2009). Este programa asigna los individuos de una muestra a una población de manera probabilística, sin ser necesaria, a priori, la información de la localización geográfica de dichos individuos. Este análisis asume K poblaciones desconocidas, en este caso probables poblaciones del delfín oscuro en el mar argentino, que tienen diferente frecuencia de alelos en un set independiente de loci. La K con mayor valor de probabilidad estimada indica el número de K más probable de poblaciones en la muestra. Se realizaron 3 corridas de 3 millones de iteraciones cada una con un periodo de burn-in ("quemado") de 500.000 iteraciones para el análisis de los valores de K que van desde 1 a 6. Los valores de K corresponden a las 4 localidades de muestreo utilizadas para este análisis, estas corresponden a Golfo San Matías, Golfo San José, Golfo Nuevo y Golfo San Jorge. Se asumió correlación en las frecuencias alélicas entre las probables poblaciones y un modelo de mezcla ("*Admixture model*"). En el modelo propuesto, los individuos pueden tener ascendencia mixta, es decir, un individuo i ha heredado una fracción de su genoma a partir de ancestros de la población K . Es un modelo razonablemente flexible para hacer frente a muchas de las complejidades de las poblaciones reales (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003; Hubisz et al., 2009). También se realizó la estimación de ΔK siguiendo el método de Evanno et al., (2005).

Flujo génico

Supongamos que dos poblaciones de tamaño N extraídas de un gran grupo de poblaciones intercambian una fracción de los migrantes m en cada generación, y que la tasa de mutación μ es insignificante en comparación con la tasa de migración m . En este caso, tenemos la siguiente relación simple en el equilibrio entre la migración y la deriva,

$$F_{st} = 1 / (2m + 1)$$

Por lo tanto, M, que es el número absoluto de migrantes intercambiados entre las dos poblaciones, se puede estimar

$$M = 1 - F_{st} / 2F_{st}$$

Si solo se considera que las dos poblaciones sólo intercambian entre sí y con ninguna otra población, entonces se debe dividir la cantidad M por un factor de 2 para obtener una estimación $M' = Nm$ para las poblaciones haploides, o $M' = 2 NM$ para las poblaciones diploides. Esto está dado por el valor esperado de F_{st}

$$F_{st} = 1 / ((4Nmd / (d-1)) + 1)$$

donde d es el número de demoes intercambiando genes. Cuando d es grande esto tiende hacia el valor clásico $1 / (4 Nm + 1)$, pero cuando $d = 2$, entonces el valor esperado de F_{st} es $1 / (8 Nm + 1)$ (Slatkin 1991).

Prueba de Mantel

Para evaluar la hipótesis de que el Aislamiento por distancia puede explicar los patrones genéticos en el área de estudio, se analizó la prueba de Mantel, teniendo en cuenta la correlación entre los factores genéticos (F_{st}) y las distancias geográficas (Km.). Dicha prueba se realizó con el programa Arlequín (Excoffier et al., 1992) y consiste en asociar dos o más matrices mediante permutaciones que permiten obtener una distribución empírica nula del coeficiente de correlación. El test no paramétrico de Mantel (1967) considera la significancia estadística de esta correlación y determina si existe una relación lineal significativa entre el flujo génico y la distancia geográfica entre poblaciones. La matriz de distancias geográficas fue construida en base a las distancias en línea recta expresadas en kilómetros entre pares de localidades de acuerdo a mapas tomados de Google Earth 6.0.3 (Keyhole, Inc.).

RESULTADOS

ADN mitocondrial

Estructura poblacional

AMOVA

De un total de 171 muestras, 135 muestras amplificaron el segmento de 750pb de la región control, sin embargo solo 119 secuencias de 413pb de longitud se tuvieron en cuenta para los análisis estadístico. Muchas secuencias presentaron errores en la secuenciación, en muchos casos el ADN molde se encontraba muy degradado lo cual no todas mostraban secuencias apropiadas para su lectura y posterior alineación. En el análisis de la varianza molecular las poblaciones seleccionadas por ser potenciales unidades poblacionales del delfín oscuro a lo largo del litoral argentino, sin responder a barreras geográficas fueron: Buenos Aires (BA), Golfo San Matías (GSM), Golfo San José (GSJ), Golfo Nuevo (GN), Golfo San Jorge (GSJOR) y por último Ushuaia (U). Como la localidad de Ushuaia representa una población insular, el análisis del AMOVA se realiza teniendo en cuenta 2 grupos; grupo 1: todas las poblaciones presentes en continente (Buenos Aires (BA), Golfo San Matías (GSM), Golfo San José (GSJ), Golfo Nuevo (GN), Golfo San Jorge (GSJOR) y el grupo 2 representa la localidad insular (Ushuaia (U)).

Para la región control del ADN mitocondrial el porcentaje de variación entre poblaciones fue alto (77,79%), bajo entre las poblaciones dentro de los grupos (0,94%) y alto dentro de las poblaciones (21,27%). Los componentes de la varianza y los índices de fijación Φ_{ST} se presentan en la Tabla 3.4. Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos propuestos a lo largo de la costa de Argentina. Los resultados sugieren conexión por migración entre las poblaciones presentes a lo largo de la costa de Argentina aisladas de la población de Ushuaia. Sin embargo estos resultados deber tomarse con precaución ya que la población de Ushuaia representa un unico individuo.

Tabla 3.4: Análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) tomando en cuenta dos grupos. Grupo 1: todas las localidades muestreadas en el continente (BA, SM, GSJ, GN, SJOR) y Grupo 2: La localidad insular de Ushuaia. Índice de Fijación, $\Phi_{st} = 0.78729$ ($p < 0,05$).

Fuente de Variación	G.L.	SC	Componentes de la Variancia	% Variación
Entre Poblaciones	1	46,98	7,61Va	77,79
Entre las poblaciones dentro de los grupos	4	15,37	0,09Vb	0,94
Dentro de las poblaciones	114	237,34	2,08 Vc	21,27
Total	119	299,70	9,78	

A nivel de poblaciones locales, los valores de Φ_{ST} obtenidos a partir de las comparaciones pareadas realizadas para la región control (Tabla 3.2), variaron desde -0,017 (≈ 0) hasta 0,903 (entre Golfo San José y Ushuaia). Los valores de significancia de estas comparaciones (Tabla 3.3) muestran que la población de Golfo Nuevo es significativamente diferente de las poblaciones de Buenos Aires y Golfo San Jorge y Ushuaia; La población de Buenos Aires también es significativamente diferente de la población del Golfo San José, sin embargo el Φ_{ST} obtenido fue de 0,206. La población del Golfo San Jorge es significativamente diferente de las poblaciones de Golfo Nuevo, San José y Ushuaia. El Golfo San Matías solo mostró diferencias significativas con la población de Ushuaia y esta última también mostró diferencias con todas las localidades presentes en el continente (Tabla 3.3).

Tabla 3.2. Comparaciones pareadas realizadas a partir del estimador Φ_{ST} usando como modelo de sustitución lo propuesto por Jukes & Cantor.

	GN	BA	GSJ	GSJOR	GSM	U
GN	0					
BA	0,206	0				
GSJ	-0,017	0,262	0			
GSJOR	0,088	0,092	0,098	0		
GSM	0,018	0,059	0,006	0,036	0	
U	0,795	0,903	0,834	0,746	0,785	0

Tabla 3.3: Matriz de los valores p obtenidos a partir de las comparaciones pareadas calculadas con el estadístico φ_{ST} para la región control del ADN mitocondrial. Los asteriscos muestran valores significativos $p < 0.05$

	GN	BA	GSJ	GSJOR	GSM
GN					
BA	0,036 *				
GSJ	0,873	0,018*			
GSJOR	0,018 *	0,090	0,009*		
GSM	0,090	0,234	0,270	0,144	
U	0,001 *	0,099	0,001*	0,001*	0,001*

SAMOVA

El programa Samova (Dupanloup et al. 2002) se utilizó para definir particiones de los sitios de muestreo pero sin ninguna suposición a priori sobre la estructura geográfica. Se analizaron de 2 a 5 unidades geográficas al azar. Para los niveles superiores de la estructura de las unidades geográficas $K = 2$ se obtuvo valores significativos mostrando en un grupo Ushuaia y en el segundo grupo las localidades presentes en el continente. No se obtuvieron valores significativos, ni para el agrupamiento de tres, cuatro y cinco posibles grupos recuperados por Samova (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Matriz de los valores Fst obtenidos a partir del análisis del Samova para la región control del ADN mitocondrial. Los asteriscos muestran valores significativos $p < 0.05$.

Grupos	K	Fst	p
BA, SM, GSJ, GN, GSJOR vs. U	K = 2	0,773	0,0484*
BA, SM, GSJ, GN vs. GSJOR vs. U	K = 3	0,453	0,192
BA vs. SM, GSJ, GN vs. GSJOR vs. U	K = 4	0,218	0,098
BA, SM vs. GSJ vs. GN vs. GSJOR vs. U	K = 5	0,171	0,088

Flujo Génico

A nivel de poblaciones locales, los resultados obtenidos a partir de la estimación de flujo génico para la región control entre las poblaciones estudiadas reveló un alto número efectivo de migrantes ($N_m \gg 1$), evidenciando un alto flujo génico entre ellas. Los valores de N_m más bajos fueron observados entre la población de Ushuaia y el Golfo San José (0.45) y Golfo San Jorge y Golfo Nuevo (0,51). Entre Buenos Aires y Golfo Nuevo, Golfo San José y Ushuaia el valor de N_m fue moderado (1,407-2,771). Valores altos de N_m se encontraron entre Golfo Nuevo y Golfo San José (inf) y con el Golfo San Matías (26) y entre Golfo San Jorge y Golfo San Matías (13). Esto se debe a que todas las poblaciones se encuentran conectadas, funcionando como una única población (Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Matriz de valores M ($M = N_m$) a nivel de poblaciones locales del delfín oscuro en el litoral argentino.

	GN	BA	GSJ	GSJOR	GSM
GN					
BA	1,92				
GSJ	inf	1,40			
GSJOR	5,16	4,93	4,57		
GSM	26,57	7,96	74,22	13,02	
U	0,51	2,11	0,45	1,42	0,77

Prueba de Mantel

Se realizaron dos análisis de la prueba de Mantel a la luz de los resultados obtenidos del AMOVA. El primer análisis tiene en cuenta todas localidades de muestreo desde Buenos Aires hasta Ushuaia. Sin embargo teniendo en cuenta los resultados del AMOVA y las el analisis de diferencias pareadas se realizó una segunda prueba de Mantel teniendo en cuenta solo las localidades de muestreo excepto Ushuaia.

Para el primer analisis, teniendo en cuenta todas las localidades de muestreo el coeficiente de correlación calculado con el test de Mantel entre las matrices de distancia geográfica y de distancia genética obtenidas bajo el modelo de Jukes & Cantor fue de 0,834 con un valor de $p = 0,007$ ($p < 0,05$) (Fig. 3.4). Mientras que para el segundo analisis, excluyendo a la localidad de Ushuaia el coeficiente de correlación fue de 0,427 con un valor de $p = 0,197$ (Fig. 3.5). Por lo tanto, el modelo poblacional de Aislamiento por distancia solo toma significancia al incluir en el análisis la localidad de Ushuaia por lo que debe tenerse en cuenta que esta localidad presenta solo 1 individuo, sin embargo representa un único haplotipo exclusivo, por lo que podría representar un grupo genéticamente diferente. Para poder ampliar las inferencias debería ampliarse el tamaño muestral. Por otro lado, este análisis nos indica que las localidades de muestreo presentes en continente no presentan aislamiento por distancia, por ende no presenta variación en su estructura genética debido a las distancias geográficas.

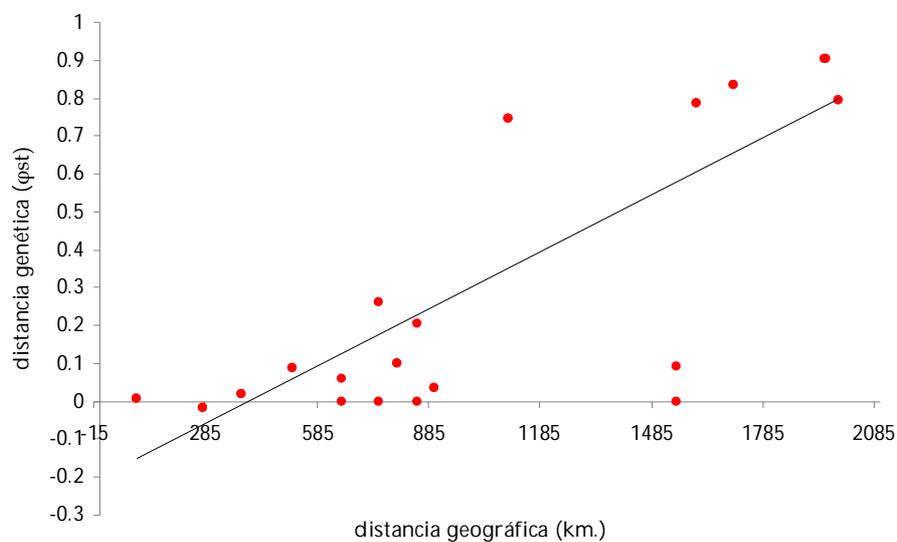


Figura 3.4: Correlación obtenido a partir de las matrices de distancias geográficas y valores de ϕ_{ST} , prueba de Mantel, $r = 0,834$ $p << 0,05$.

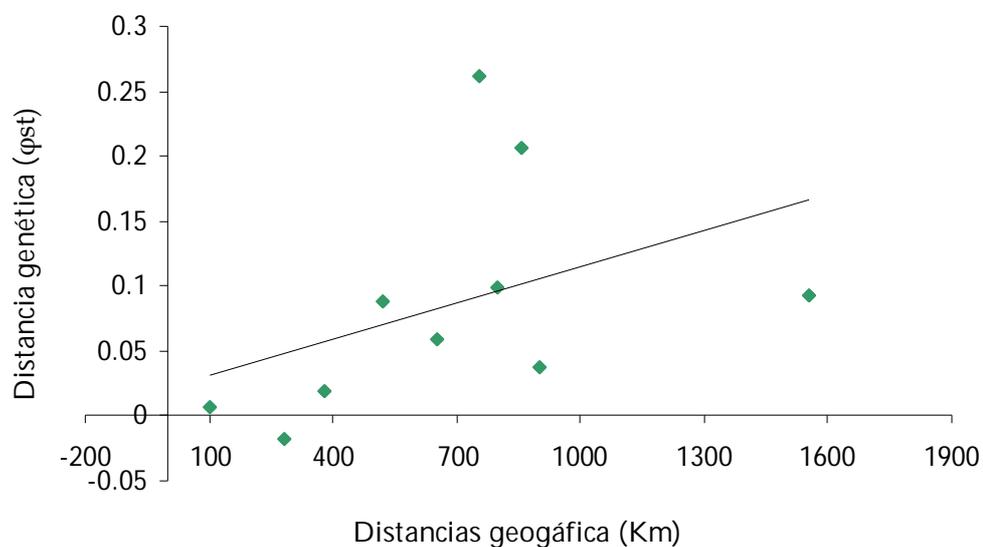


Figura 3.5: Correlación obtenido a partir de las matrices de distancias geográficas y valores de ϕ_{ST} , prueba de Mantel, $r = 0,427$ $p > 0,05$.

Microsatélites
Estructura poblacional

AMOVA

Se analizaron 7 loci microsatélites variables de los 12 amplificadas para la especie, de manera de evitar sesgos en los análisis estadísticos por bajo tamaño muestral. Las localidades utilizadas para este análisis fueron cuatro: Golfo San Matías (n = 19), Golfo San José (n = 24), Golfo Nuevo (n = 31) y Golfo San Jorge (n = 21), dado que las muestras presentaron una buena cantidad y calidad de ADN permitiendo la amplificación de los microsatélites. Del análisis de AMOVA para los Fst realizados para 7 loci no fue significativo $p > 0.05$ reflejando una única población de delfines oscuros a lo largo de la costa argentina (Tabla 3.6).

Tabla 3.6: Análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) tomando en cuenta 4 localidades muestreadas (SM, GSJ, GN, SJOR) como un único grupo. Índice de Fijación, $F_{st} = 0.02469$ ($p = 0,305$).

Fuente de Variación	G.L.	SC	Componentes de la Variancia	% Variación
Entre Poblaciones	3	4,576	0,01877 Va	2,63
Entre los individuos dentro de las poblaciones	91	58,677	-0,05128 Vb	-7,17
Dentro de los indiv.	95	71	0,74737 Vc	104,55
Total	189	134,253	0,71484	

STRUCTURE

Los resultados del Structure se visualizaron mediante el uso de StructureHarvester versión vA.1, http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/struct_harvest <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester> (Earl & vonHoldt 2011). El análisis obtenido del programa Structure sugiere que los individuos de las cuatro localidades de muestreo representan un solo grupo más probable, mayor $\ln Pr(X/K)$ estimaciones para $K = 1$ y menor

varianza asociada en la Tabla 3.7. También se puede observar un alto grado de mezcla indicado en este análisis: (i) para las corridas $K = 1$ las estimaciones de $\Pr(X/K)$ convergieron razonablemente durante la ejecución, mientras que las estimaciones producidas para todos los análisis de agrupamiento bayesianos para $K = 2, 3, 4, 5, 6$ y las estimaciones fueron menos consistentes a través de las corridas y sus varianzas fueron altas (Tabla 3.7) y alfa (ii) los valores de alfa no se estabilizaron a valores relativamente constantes durante las corridas y entre corridas múltiples para el mismo valor de K , sugiriendo que no hay estructura de la población clara (Pritchard et al. 2001) (Tabla 3.7, Fig. 3.6). Asimismo, los resultados obtenidos del método de Evanno (Evanno et al., 2005), el delta k más probable es para el valor de $K = 1$; sin embargo también presenta un valor alto de delta K para $K = 4$, este resultado podría estar reflejando un alto grado de asociación entre los individuos de la población (Tabla 3.8)

Table 3.7: Resultados de 3 corridas (I-III) independientes del análisis de cluster bayesiano con varios valores del parámetro K (numero de poblaciones especificadas a priori).

Valor K (MCMC iterations)*	probabilidad estimada: $\ln \Pr(X/K)$			Valor medio de la probabilidad \ln			Varianza probabilidad \ln		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	-1867,5	1867,5	-1867,2	-1852,2	-1852,1	-1852,1	30,6	30,7	30,1
2	-1905,7	-1898,7	-1902,2	-1840,7	-1839,6	-1837,7	130	118,2	128,9
3	-1896,6	-1905,7	-1905,5	-1842,8	-1842,2	-1842,5	107,6	127,1	126,0
4	-1905,8	-1912,1	-1903,0	-1843,3	-1843,3	-1843,9	124,9	137,6	118,1
5	-1883,0	-1885,5	-1896,9	-1847,3	-1846,6	-1846,4	71,4	77,9	100,9
6	-1883,5	-1895,9	-1886,1	-1848,2	-1846,4	-1847,4	70,6	98,9	77,2

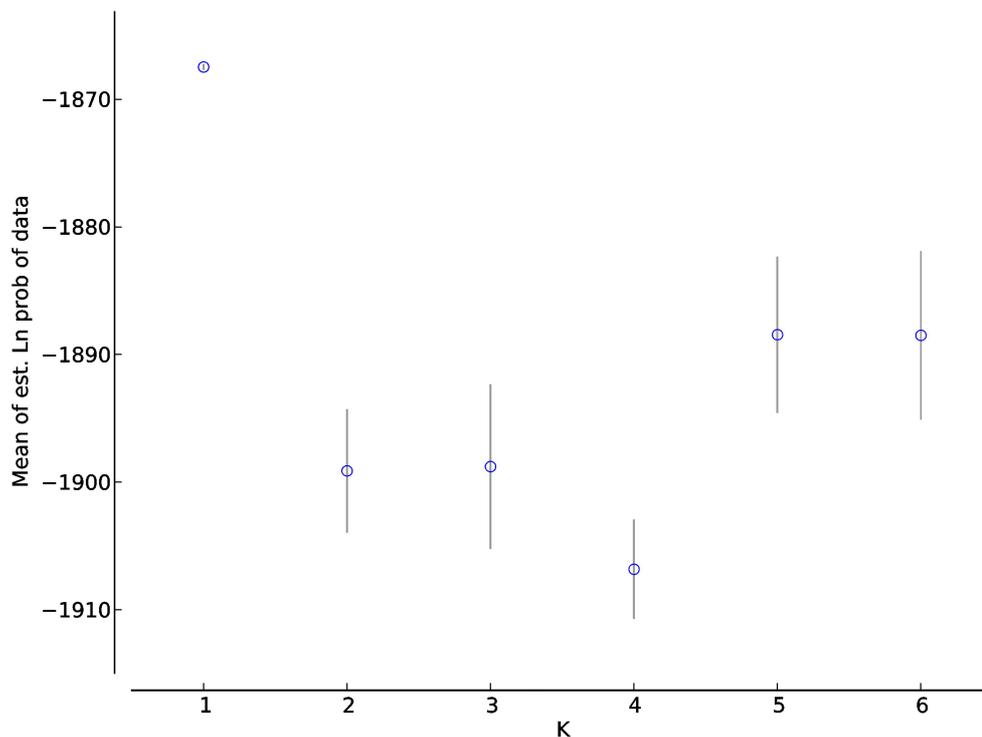


Figura 3.6: Media del Ln de la probabilidad estimada de los datos para diferentes valores de K.

Table 3.8: Resultados del método de Evanno con varios valores del parametro K (numero de poblaciones especificadas a priori) y ΔK . (NA = no asignado).

K	Media LnP(K)	DS LnP(K)	Ln'(K)	'Ln''(K)	ΔK
1	-1867.4714	0.1604	NA	NA	NA
2	-1899.1143	4.7719	-31.642857	31.977143	6.701076
3	-1898.78	6.3951	0.334286	8.379286	1.310271
4	-1906.825	3.8161	-8.045	26.42	6.923327
5	-1888.45	6.0501	18.375	18.425	3.04542
6	-1888.5	6.5391	-0.05	NA	NA

Flujo Génico

A nivel de poblaciones locales, los resultados obtenidos a partir de la estimación de flujo génico para los 7 loci microsatélites entre las poblaciones estudiadas reveló un alto número efectivo de migrantes ($Nm \gg 1$), evidenciando un alto flujo génico entre ellas. Los valores de Nm más bajos fueron observados entre la población del Golfo San José y Golfo Nuevo (7,44) y Golfo San José y Golfo San Jorge (12,93). Los valores mas altos fueron encontrados entre Golfo San

Matías y Golfo San José (inf.) y Golfo Nuevo y Golfo San Jorge (inf). Por lo tanto todas las poblaciones se encuentran conectadas entre si (Tabla 3.8).

Tabla 3.8: Matriz de valores M ($M = 2Nm$) a nivel de poblaciones locales del delfín oscuro en el litoral argentino.

	GSM	GSJ	GN
GSM			
GSJ	inf		
GN	18,19	7,44	
GSJOR	32,60	12,93	inf

Prueba de Mantel

Teniendo en cuenta las localidades, Golfo San Matías, Golfo San José, Golfo Nuevo y Golfo San Jorege, el coeficiente de correlación calculado con el test de Mantel entre las matrices de distancia geográfica y de distancia genética (F_{st}) obtenidas fue de 0,35 con un valor de $p = 0,26$ ($p > 0,05$), por lo que para los loci microsatelites no se detecta Aislamiento por Distancia (Fig. 3.6).

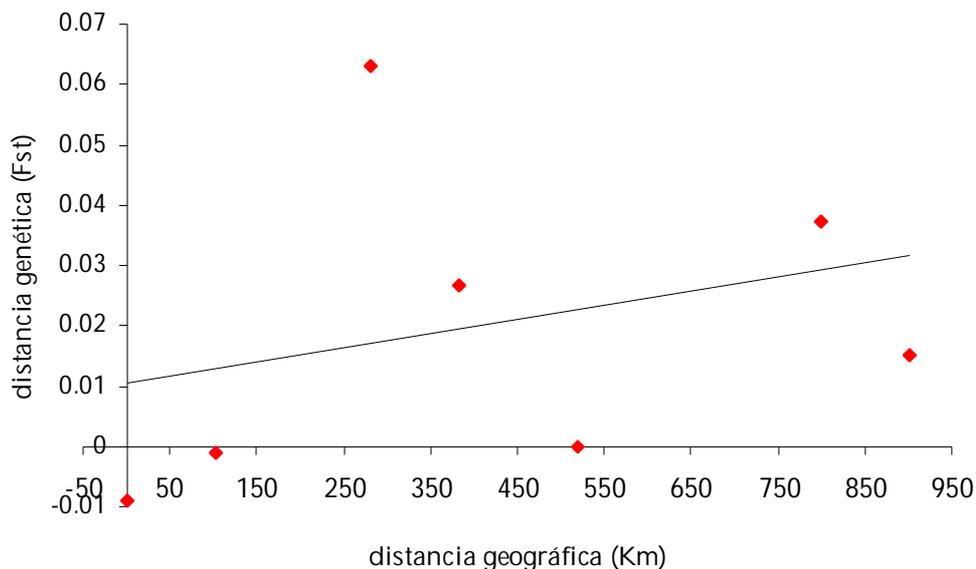


Figura 3.6: Correlación obtenido a partir de las matrices de distancias geográficas y valores de F_{ST} , prueba de Mantel, $r = 0,34$ $p > 0,05$.

DISCUSIÓN

El escenario más plausible propuesto en esta tesis por la conjunción de ambos marcadores moleculares, representa un contraste entre filopatría de hembras y altas tasas de dispersión de machos a lo largo del mar Argentino. Esto se sustenta en la falta de estructura genética de la población encontrada con loci de microsatélites y la estructura encontrada en el análisis de la región control del ADN mitocondrial mediante las comparaciones de pares. Sin embargo tanto el AMOVA como el SAMOVA indican la no estructura en las poblaciones presentes a lo largo del continente pero si entre las localidades presentes en el continente y la localidad insular de Ushuaia. Los resultados del AMOVA y de las comparaciones de a pares deber tomarse con precaución debido a que los resultados pueden estar sesgados por el desbalance en los tamaños muestrales. Asimismo, para evitar sesgos por tamaño muestral desigual entre las localidades es que se utilizaron los análisis de SAMOVA, Structure y método de Evanno ya que los métodos de asignación bayesiana son robustos al desbalance de datos. Los tres análisis mencionados indican una baja estructura poblacional entre las localidades a lo largo de la costa de Argentina, siendo la única población aislada la de Ushuaia.

Por otra parte, estos resultados concuerdan con estudios previos para la especie, Harlin y col. (2003) mediante un análisis de filogenia y un análisis de la varianza molecular no encontraron evidencia de estructura genética poblacional entre las regiones en Nueva Zelanda. Por otro lado, Cassens y col., (2003, 2005) encontraron baja estructuración en el Océano Atlántico mediante un análisis de la región control del ADN mitocondrial y 9 loci microsatélites, además encontraron evidencia de flujo génico mediado por machos de delfines oscuros a lo largo de la costa de América del Sur y Oeste del Atlántico. Los resultados indican que el flujo génico es un factor importante en la estructura de las poblaciones de la especie a lo largo de su distribución en el Atlántico Sudoccidental. Un amplio flujo génico entre las poblaciones tiende a reducir las diferencias genéticas entre las poblaciones locales, independientemente de la deriva génica o la intensidad de la selección natural. Esto es, si el flujo génico es reducido entre las poblaciones, la selección natural favorecerá la adaptación local y la diferenciación entre ellas (Slatkin, 1991); por el contrario, si el flujo génico es extenso, las poblaciones presentarán variación genética homogénea y una escasa diferenciación fenotípica y genotípica.

Los resultados obtenidos en esta tesis de las tasas de migración tanto para los marcadores nucleares como el marcador del ADN mitocondrial indican una alta tasa de flujo génico entre las localidades de muestreo a lo largo del litoral argentino. En este contexto, la ausencia de estructura

poblacional fuerte del delfín oscuro tanto con marcadores nucleares como con el marcador mitocondrial, confirma una estructura genética homogénea para la especie, dada por un continuo flujo génico entre sus poblaciones presentes a lo largo de la costa de Argentina. Aparentemente, la amplia distribución geográfica que presenta el delfín oscuro a lo largo de la costa de Argentina, la ausencia de barreras biológicas para su dispersión y el ser una especie con un origen reciente (Cassens et al., 2003, 2005; Harlin-Cognato et al., 2007), son elementos que han favorecido la cohesión de la población, promoviendo una estructura panmíctica. Por otro lado, los resultados obtenidos en el Capítulo IV, reflejan la presencia de haplotipos exclusivos en la mayoría de las poblaciones locales, con lo cual ciertos linajes matrilineales son residentes en cada localidad en particular. En los mamíferos, las hembras suelen ser más filopátricas mientras que los machos tienden a dispersarse más (Greenwood, 1980). En los cetáceos, algunos estudios moleculares apoyan esta hipótesis (Escorza-Treviño & Dizon, 2000; Möller & Beheregaray, 2004), mientras que el comportamiento y/o estudios genéticos para otros odontocetos indican que tanto las hembras como los machos permanecen en su grupo natal (Amos et al., 1993).

Por lo que, la población del delfín oscuro en la costa argentina podría responder a un modelo meta-poblacional, es decir, "de la población de las poblaciones". En una meta-población, las poblaciones de los componentes individuales son llamadas subpoblaciones, poblaciones locales, o demos; éstas son entidades discretas (o relativamente discretas) en el espacio que interactúan mediante la migración y el flujo génico (Hanski & Gaggiotti, 2004). En el delfín oscuro esto se ve reflejado mediante el ADN mitocondrial por la presencia de altas tasa de migración y presencia de poblaciones locales, y el gran flujo génico representado por la única población resultado de los marcadores nucleares. Por ende el modelo de población más apropiado para la especie en la costa de Argentina es el modelo de Stepping Stone Model con migración bidimensional, no presentando un modelo de Aislamiento por distancia ni para la región control del ADN mitocondrial ni para los loci microsatélites.

El delfín oscuro es una especie de hábitos alimenticios meso-pelágicos, cuya presa principal es la anchoíta argentina, *Engraulis anchoita*, (Koen Alonso et al., 1998; Romero et al., 2012). Garaffo y colaboradores (2011), en un estudio de selección de hábitat, encontraron que la mayor tasa de encuentro del delfín oscuro está íntimamente relacionada con áreas de altas densidades de los stock de anchoíta (Hansen et al., 2001, Buratti et al., 2006), esta zona abarca desde el Golfo San Matías hasta sur del Golfo San Jorge. Por otro lado, algunos autores (Hoelzel et al., 1998a, b;

Natoli et al., 2004, 2005) sugieren que la especialización en recursos locales por medio de la consolidación de distintas estrategias de forrajeo entre grupos podría favorecer la filopatría, y progresivamente dirigir una divergencia genética. El delfín oscuro encuentra su principal recurso a lo largo de toda la costa, estando el recurso disponible en toda el área de su distribución en el Mar Argentino. Por lo que la estructura génica de la población estaría reflejando la distribución de su presa principal (ver también discusión Capítulo IV). Estudios recientes sobre el comportamiento y en especial sobre la alimentación de estos delfines en el Golfo Nuevo (Degrati et al., 2008, 2010), han mostrado que existen distintas estrategias de alimentación dependiendo de la distribución y abundancia de su principal presa, la anchoíta (*Engraulis anchoita*). Estos y otros resultados demuestran que el delfín oscuro presenta una gran flexibilidad durante el forrajeo (McFadden, 2003).

Los resultados genéticos que se presentan en este capítulo corroboran datos previos sobre la distribución y dispersión de los delfines oscuros a lo largo del área de estudio. Würsig & Bastida (1986) evidenciaron la recaptura de dos individuos marcados en el Golfo San José en la década del 70, siete años más tarde frente a las costas de Mar del Plata, Buenos Aires, este hecho documenta al menos, grandes desplazamientos entre localidades separadas por 780km y asociaciones a largo plazo entre individuos. En la región patagónica mediante la técnica de foto-identificación se identificaron 2 delfines oscuros por primera vez en el Golfo San José y se recapturaron un año más tarde en el Golfo Nuevo; además se encontró que los delfines exhibieron diferentes grados de residencia en el Golfo Nuevo registrándose 2 pulsos de identificación de nuevos individuos aproximadamente cada medio año, sugiriendo que los delfines oscuros en el área de Península Valdés conforman una unidad abierta (Garaffo et al., 2006, Loizaga et al., 2006). Asimismo, Degrati y colaboradores (2006), determinaron que existen asociaciones entre individuos tanto a corto como a largo plazo, y que estas asociaciones se mantendrían en promedio unos 120 días.

En la costa de Argentina, varios autores utilizando la región control del ADNmt encontraron que la tonina overa (*Cephaorhynchus commersonii*) se encuentra genéticamente estructurada en varias poblaciones a lo largo de su distribución, además encontraron baja tasa de dispersión y una alta tasa de filopatría por parte de las hembras (Coscarella et al., 2008; Pimper et al., 2010 y Cipriano et al., 2011). Méndez y colaboradores (2008, 2010) utilizando tanto marcadores mitocondriales como nucleares encontró el mismo patrón para la franciscana, *Pontoporia blainvillei*, a lo largo de la distribución en el Océano Atlántico. Sin embargo, estas especies son endémicas

para la región con hábitos más restringidos. El delfín oscuro posee hábitos más pelágicos sobre la estable plataforma argentina, por lo que una escasa estructura es el resultado de factores históricos y ecológicos propios de la especie.

En resumen, el análisis de la estructura génica del delfín oscuro en la costa de Argentina, determina una única población panmítica con altas tasas de migración y flujo génico a lo largo de su distribución para las poblaciones presentes en continente. La población de Ushuaia se encontraría aislada genéticamente, representando probablemente otro grupo diferente, sin embargo este resultado necesita una revisión ya que solo se cuenta con un individuo. Esta especie, está sujeta a captura incidental por parte de la pesca y actividades turísticas, por lo que a pesar de mostrar una alta diversidad génica, la población presenta linajes matrilineales exclusivos que están sujetos a diferentes niveles de impacto. Por lo que la información acerca de su diversidad y estructura génica debe tenerse en cuenta al momento de delinear estrategias de conservación y manejo para la especie frente a un escenario de cambio climático.

CAPÍTULO IV

DIVERSIDAD GÉNICA Y DEMOGRAFÍA HISTÓRICA DEL DELFÍN OSCURO, LAGENORHYNCHUS OBSCURUS, EN EL LITORAL ARGENTINO

INTRODUCCIÓN

Los niveles de la variación genética deben ser explicados en términos de un balance entre procesos opuestos de pérdida y ganancia (Amos & Harwood, 1998). La variación genética puede ser acumulada en una población tanto por la acción de la mutación, flujo génico o selección, mientras que la pérdida de variación puede ocurrir por acción de la deriva génica o por endogamia y depresión por exogamia (Amos & Harwood, 1998; Frankham et al., 2002). En condición de equilibrio entre mutación y deriva génica, altos niveles de variación implica tanto altas tasas de ganancia o bajas tasas de pérdida, mientras que bajos niveles de diversidad implican bajas tasas de ganancia o una rápida pérdida. Debido a que la ganancia de variación por mutación es muy lenta, la mayoría de los grandes o rápidos cambios en la diversidad genética es más probable de atribuirse a la pérdida por interacción de procesos demográficos o medioambientales (Amos & Harwood, 1998). Grant y Bowen (1998) derivaron cuatro premisas de historia demográfica a partir de un análisis de la relación entre la diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (h) observada en diversos grupos de animales: 1) Cuando π y h son pequeños (<0,5 %), la especie experimentó un cuello de botella poblacional reciente o un efecto fundador que generó un único o pocos linajes mitocondriales. 2) cuando π es pequeño y h grande (>0,5%), la especie sufrió un cuello de botella seguido de un crecimiento poblacional rápido y acumulación de mutaciones. 3) Cuando π es grande y h pequeño, la especie divergió en poblaciones geográficamente subdivididas. 4) Cuando π y h son grandes, las poblaciones de la especie son estables con una larga historia evolutiva o bien, muestran un contacto secundario entre linajes diferenciados. Se conoce que los niveles de variación genética están relacionados al tamaño poblacional, el cual explica aproximadamente la mitad de la variación de heterocigosidad entre especies (Soulé, 1980; Soulé, 1986 a,b; 1987). La teoría de la genética de poblaciones predice que poblaciones de pequeño tamaño tendrán bajos niveles de variación génica que estarán determinados en gran medida por la tasa de mutación y el tamaño efectivo de la población (Frankham, 1996). Este es el tamaño de una población ideal con las mismas características genéticas que el censo poblacional.

Poblaciones de pequeño tamaño pierden variación genética por acción de la deriva a una tasa más rápida, en consecuencia, aquellas poblaciones que atravesaron una declinación poblacional es de esperar que exhiban bajos niveles de variación génica (Fig. 4.1) (Awise, 1993; Frankham, 1996; Schonewald-Cox et al., 1983). Los mayores efectos de la deriva (y la endogamia) se traducen en la reducción de la heterocigosidad y diversidad alélica a través de la eliminación de los alelos raros de la reserva genética (*pool génico*) de la población (Fig. 4.1) (Keller et al., 2001).

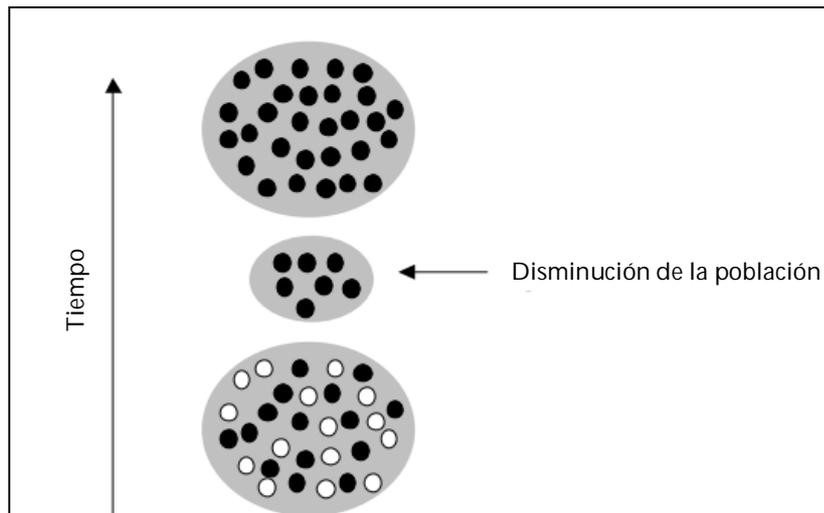


Figura 4.1. Efectos de la disminución del tamaño de la población sobre las frecuencias génicas. Las frecuencias génicas son iguales en la población inicial (indicados por círculos blancos y negros). En el caso extremo de sufrir un cuello de botella, todos los alelos blancos se pierden en la población por azar mientras que los alelos negros sobreviven. Los alelos raros son más comunes de perderse en este tipo de eventos. Los alelos negros están sobrerrepresentados cuando la población recupera su tamaño poblacional (Extraído de Page & Colmes, 1998).

El conocimiento de la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones puede ser de gran ayuda al momento de contestar preguntas acerca de eventos demográficos pasados, niveles actuales de diversidad génica y de la futura viabilidad de la población. Uno de los pequeños cetáceos más abundantes del Mar Argentino es el delfín oscuro, cuyo rango de distribución en el Océano Atlántico comprende desde los 30°S a 55°S. Esta especie interacciona con diversas pesquerías registrando captura incidental en redes de arrastre, de agalla y de cerco (Crespo et al., 1994, 1997a; Dans et al., 1997a), así como con actividades relacionadas con el turismo en el Golfo Nuevo (Coscarella et al., 2003; Dans et al., 2008). En Patagonia, ambas actividades han crecido exponencialmente significando importantes beneficios tanto para las economías regionales como locales (Tagliorette & Losano, 1996).

Consecuentemente, el delfín oscuro se encuentra amenazado por las actividades humanas a lo largo de la costa por lo que hace a esta especie vulnerable y de importancia para su conservación.

Entre los estudios de genética que se pueden mencionar para la especie se encuentran Cassens et al., (2003, 2005) y Harlin-Cognato et al., (2006, 2007) sin embargo estos estudios abarcan una escala global, mientras que aún no se ha explorado la variación en la diversidad génica del delfín oscuro a escala regional en la costa de Argentina. Además se desconoce si la población atravesó una declinación ó expansión poblacional u otros procesos demográficos (ej., cuello de botella) que afecten los niveles de variación y diversidad génica en el delfín oscuro sujeto a diferentes intensidades de impacto. Cassens et al., (2003) proponen un escenario de dispersión es la posible influencia de la Deriva de los Vientos del Oeste ("*Westwind Drift*" o CDO siglas en castellano) en los movimientos migratorios de las poblaciones de delfines oscuros. Por otro lado, Harlin-Cognato y colaboradores (2007), proponen que cambios en la productividad primaria y cambios en la abundancia de las presas jugaron un rol fundamental en la estructuración filogeográfica del delfín oscuro. Es por lo anteriormente descrito que el objetivo de este capítulo es determinar la diversidad génica y evidenciar cambios demográficos históricos en el delfín oscuro a lo largo de la costa argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Para este capítulo se utilizaron las mismas muestras que en el capítulo III (ver más detalle Capítulo III). En total se utilizaron 171 muestras de delfín oscuro provenientes del litoral argentino (Tabla 4.1). Para los análisis estadísticos subsiguiente sólo se utilizaron 119 secuencias de 413pb de longitud de la región control del ADN mitocondrial. Además solo se analizaron 7 loci microsatélites variables de los 12 amplificados para la especie, de manera de evitar sesgos en los análisis estadísticos por bajo tamaño muestral.

Tabla 4.1. Distancia entre las 6 localidades de muestreo a lo largo de la costa argentina. BA= Buenos Aires, SM= Golfo San Matías, SJ= Golfo San José, GN= Golfo Nuevo, SJOR= Golfo San Jorge.

Localidad	Distancias (Km.)					Tamaño muestral (N)	Ubicación geográfica (Lat.-Long.)
	BA	SM	SJ	GN	SJOR		
Buenos Aires						11	38° 40'S 58° 35'O
Golfo San Matías	651					26	41° 32'S 64° 24'O
Golfo San José	753	102				27	42° 20'S 64° 24'O
Golfo Nuevo	855	382	280			85	42° 45'S 64° 34'S
Golfo San Jorge	1553	902	800	520		21	46° 02' S 66° 18' O
Ushuaia	1955	1608	1708	1988	1100	1	54° 30'S 65° 40'O

Extracción, Amplificación y Alineamiento ADN mitocondrial y Microsatélites

El material génico se extrajo siguiendo los protocolos estándares (Hoelzel 1998) y se amplificó un fragmento de aproximadamente 750 pb del extremo 5'-OH de la región control del ADN mitocondrial siguiendo protocolos estándares (Hoelzel et al., 1991) (Ver detalle en Capítulo II). Las secuencias se alinearon siguiendo la metodología descrita en el Capítulo II de esta tesis. Además se amplificaron y genotipificaron 12 loci de microsatélites (Ver detalle en Capítulo II).

Índices de diversidad génica ADN mitocondrial

Se evaluó la diversidad genética intra e interpoblacional a partir de secuencias de la región control del ADN mitocondrial. Dichos parámetros se calcularon con el programa de cómputo Arlequin v3.1 (Excoffier et al., 2005) para cada localidad de muestreo. Los índices estimados fueron: diversidad haplotípica (h), diversidad nucleotídica (π), número de sitios polimórficos (S) y el número de haplotipos (n_h).

La identificación de los sitios variables entre las secuencias se realizó por medio del programa MEGA ver. 3.1 (Phylogenetic and molecular evolutionary analyses; Kumar et al., 2004).

La diversidad haplotípica (\hat{H}) (Nei, 1987), es la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes en una muestra:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

La diversidad nucleotídica (π_n) (Nei, 1987), se mide como el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias de ADN tomadas al azar, la cual se ve afectada mayormente por los alelos que poseen mayor frecuencia y es independiente del tamaño muestral:

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i}^k p_i p_j d_{ij}}{L}$$

Microsatélites

Se estimaron los índices de diversidad, la heterocigocis observada (H_o) y la heterocigocis esperada (H_e) así como también el número de alelos para cada locus para cada localidad de muestreo y para la población en general. Además se puso a prueba la hipótesis de Desequilibrio de Ligamiento (Linkage disequilibrium (LD)) para cada par de loci utilizando el software ARLEQUIN V3.1 (Excoffier et al., 2005).

Historia demográfica

La historia demográfica de una población deja una huella en los genomas de sus representantes modernos. La reconstrucción de esta historia nos permite obtener información útil para interpretar diversos procesos de evolutivos (Ho & Shapiro, 2011). Existe una gran variedad de métodos disponibles para estimar patrones demográficos usando datos de secuencias de ADN. En esta tesis la historia demográfica de las poblaciones del delfín oscuro fue analizada mediante pruebas de neutralidad a partir de los estadísticos D de Tajima (Tajima, 1989) y F S de Fu (Fu, 1997) implementadas en Arlequin v3.1 (Excoffier et al., 2005), mediante Distribuciones de Diferencias Pareadas ("Curvas de Mismatch") utilizando el programa DNAsp (Rozas et al., 2003).

Pruebas de Neutralidad

El **estadístico D de Tajima** se utilizó para evaluar la hipótesis nula de neutralidad en el proceso de mutación (Tajima, 1989), con el programa ARLEQUIN V3.1 (Schneider et al., 2000; Excoffier et al., 2005). Este estadístico compara dos estimadores del parámetro poblacional teta (θ); uno se basa en el número de sitios segregantes en la muestra y el otro, en el número promedio de las diferencias pareadas por sitio entre haplotipos. La prueba supone que,

bajo el modelo de alelos infinitos (sin recombinación), ambos estimadores deberían obtener el mismo valor. Una diferencia entre ambos se interpreta como una población no neutra (Schneider et al., 2000). Aunque las diferencias entre los estimadores usualmente se atribuyen a efectos de selección, también pueden deberse a efectos de cuellos de botella, poblaciones en expansión (no estacionarias) o heterogeneidad en las tasas de mutación entre sitios (Tajima, 1993). El estadístico D de Tajima se define como:

$$D = \frac{\hat{\theta}_\pi - \hat{\theta}_s}{\sqrt{\text{Var}(\hat{\theta}_\pi - \hat{\theta}_s)}}$$

donde $\hat{\theta}_\pi = \pi$, $\hat{\theta} = \frac{S}{\sum_{i=0}^{n-1} (1/i)}$ y S es el número de sitios segregantes en la muestra. El valor p de la

D observada, según la hipótesis de equilibrio poblacional y neutralidad selectiva, se calculó bajo el supuesto de una distribución beta, limitada por los posibles valores máximos y mínimos de D (Tajima, 1989).

El **estadístico Fs de Fu** (Fu, 1997) está basado en el modelo de la mutación de alelos infinitos. Sea $p\left(\frac{k}{\theta}\right)$ la probabilidad de tener k alelos en una muestra de n secuencias, dado el valor de θ . Para una muestra con k_0 alelos y el número medio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias igual a $\hat{\theta}_\pi$, definimos S' como la probabilidad de tener no menos de k_0 alelos en una muestra aleatoria, siempre que $\theta = \pi$. Entonces,

$$S' = p\left(\frac{k_0 \leq k}{\theta = \hat{\theta}_\pi}\right) = \sum_{k > k_0} \frac{|S_k| \hat{\theta}_\pi^k}{S_n(\hat{\theta}_\pi)}$$

donde $S_n(\hat{\theta}_\pi) = \hat{\theta}_\pi(\hat{\theta}_\pi - 1) \dots (\hat{\theta}_\pi - n + 1)$ y S_k es el coeficiente de $\hat{\theta}_\pi^k$ en S_n .

El estadístico F_s de Fu se define como:

$$F_s = \ln\left(\frac{S'}{1 - S'}\right)$$

Un valor negativo de F_s es evidencia de un exceso de número de alelos, como sería de esperar de una expansión reciente de la población o de un efecto de “genes ligados” (*genetic hitchhiking*) (Barton, 2000). Un valor positivo de F_s es la evidencia de una deficiencia de alelos, como sería de esperar de un cuello de botella poblacional reciente o de acción de la selección. Simulaciones del estadístico F_s sugieren que es un indicador más sensible de la expansión de la población y de “*genetic hitchhiking*” que el estadístico D de Tajima (Fu, 1997). Las simulaciones también sugieren que el convencional valor P de 0,05 corresponde a un valor P de la simulación de coalescencia de 0,02. En otras palabras, F_s debe ser considerado como significativo si $P < 0,02$ (Fu, 1997). Ambos métodos parecen ser suficientemente efectivos para determinar si existe selección, aunque un estudio mostró que la prueba de Tajima es más efectiva. Sin embargo, ambos métodos asumen que las poblaciones presentan un equilibrio entre mutación y deriva génica por un largo período evolutivo. Si una población experimenta un cuello de botella los índices serán significativamente positivos o negativos. Además todos los nucleótidos se asume que son igualmente mutables y sujetos a la misma dinámica poblacional (Nei & Kumar, 2000).

Distribuciones de Diferencias Pareadas (Curvas de Mismatch)

Medidas indirectas de la estructura demográfica de la población se calcularon mediante el software ARLEQUIN V3.1 (Excoffier et al., 2005). Esto incluye la distribución de de diferencias pareadas, que es la distribución del número observado de diferencias entre pares de haplotipos (Rogers & Harpending 1992, Rogers, 1995). Este modelo asume la no recombinación, y que cada mutación entre dos individuos aumenta el número de diferencias entre ellos (Rogers & Harpending, 1992). Este es el “modelo de sitios infinitos” (Kimura, 1971) y es más preciso para períodos cortos de tiempo. El número medio observado de diferencias de a pares, θ se espera que sea igual a la diferencia de a pares esperada, $4N\mu$ donde N es el número de individuos haploides o cromosomas diploides bajo estudio y la tasa de mutación μ es la probabilidad por generación que ocurra una mutación en un nucleótido en una región dada de estudio (Rogers & Harpending, 1992).

Un período de crecimiento o disminución poblacional, incluyendo un evento de cuello de botella, resultará en una señal característica que se presente como una ola en el histograma. Una distribución unimodal puede reflejar una rápida expansión poblacional en el pasado reciente (Rogers & Harpending, 1992; Slatkin & Hudson, 1991) o una expansión en el rango de distribución con altos niveles de migración entre los demos (Ray et al., 2003; Excoffier, 2005). Mientras que una

distribución multimodal refleja una población en equilibrio demográfico o una población constituida por varias unidades (Rogers & Harpending, 1992). La construcción de la distribución se basa en tres parámetros: una teta inicial (θ_0), que es un valor dado antes de que la población se expandió, un valor de teta final (θ_1) alcanzado después de que la población creció y declinó, y τ (tau) que es el tiempo de expansión en unidades de mutaciones ($\tau = 2\mu t$, donde μ es igual a la tasa de sustitución ($\mu = \text{tasa de divergencia} * k$, donde k es la longitud del segmento de ADN) y t el tiempo de expansión por generación) (Rogers & Harpending, 1992). La tasa de divergencia considerada en este estudio para la región control del ADN mitocondrial fue 0,5% por cada millón de años (Hoelzel, 1991). La significancia estadística de ajuste de la distribución esperada y observada se realizó por medio de la prueba de Ramos- Onsins y Rozas (2002), la cual hace la simulación de la distribución esperada empleando la teoría de la coalescencia. El análisis se realizó con el programa DnaSP 4.00 (Rozas et al., 2003).

Red de Haplotipos

La estructura filogeográfica de los haplotipos se infirió a través de una red de haplotipos de la región control del ADNmt usando el algoritmo "*median joining network*" (Bandelt et al., 1999) implementado en el programa Network 4.6.0.0. U (Fluxus technology Ltd. Disponible en <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>). Este programa construye una red de haplotipos partir de árboles de expansión mínima ("*minimum spanning trees*") que se forman a partir de una matriz de medias de diferencias de a pares ("*mean pairwise differences*") entre haplotipos (Clement et al., 2000). Los haplotipos intermedios son añadidos a la red utilizando el criterio de parsimonia. Este método permite eventos a niveles de población que de otra forma entrarían en conflicto con los supuestos de los métodos filogenéticos tradicionales. Esto incluye la habilidad de presentar caminos parsimoniosos alternativos en una sola figura simple y secuencia de recombinación, que puede ocurrir al nivel de población (Cassens et al., 2003)². Una red filogeográfica también permite la persistencia de haplotipos ancestrales, lo que la teoría de la coalescencia predice serían los más comunes en la población. Además, evita el problema de un grupo externo que podría ser demasiado distante o demasiado cercano, o la necesidad de requerir muchos caracteres variables para producir de forma precisa un árbol genealógico (Clement, 2000). Las redes son más apropiadas para filogenias intraespecífica que árboles, ya que explícitamente permiten la coexistencia de alelos ancestrales y descendientes en una muestra, mientras que los

² Los métodos tradicionales pueden resultar en un exceso de confianza en los métodos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud al asumir que la recombinación no ocurre.

árboles tratan todas las secuencias como taxones terminales (véase Posada & Crandall 2001 para una revisión).

Curvas de Rarefacción

Para poder inferir si los esfuerzos de muestreo fueron suficientes, se utilizaron curvas de rarefacción para estimar la diversidad de haplotipos en el área de estudio. Específicamente, se utilizó el software EstimatesS 8.0 (Colwell 2005) con el fin de estimar cuántos más haplotipos se esperaría encontrar si el esfuerzo de muestreo se incrementara dados los datos existentes y la información de muestreo. Las muestras fueron aleatorizadas 1.000 veces sin reemplazo.

Se calcularon dos estimadores de riqueza, Chao 1 y Chao 2, su varianza y sus intervalos de confianza al 95% mediante el uso del software EstimatesS 8.0 (Colwell 2005). El estimador Chao 1 está basado en el número de haplotipos en una muestra que están representados por 1 individuo o por 2 individuos. Es un estimador basado en la abundancia (Chao 1984). El segundo estimador de riqueza estimado fue Chao 2 el cual está basado en las especies que aparecen solo en 1 muestra o en 2 muestras duplicadas. Es un estimador basado en la incidencia.

Determinación de sexo

Se determinó el sexo de los animales varados en playa o provenientes de captura incidental mediante la observación directa durante la necropsia. Aquellos individuos provenientes de muestras de biopsias o indeterminadas en campo, se les determinó el sexo mediante marcadores moleculares a través de la amplificación de los genes ZFX y ZFY.

Se realizó la prueba de Bondad de Ajuste en cada localidad de muestreo para determinar si la muestra ajusta a la proporción de sexo 1:1.

Siendo la hipótesis nula y alternativa,

Ho: la proporción de sexo de los delfines oscuros se ajusta a la relación 1:1.

Ha: la proporción de sexo de los delfines oscuros difiere de la relación 1:1.

RESULTADOS

Diversidad Génica ADNmitocondrial

La diversidad del delfín oscuro fue analizada a nivel local (tratando cada localidad de muestreo como una población independiente) y tomando a todas las localidades como una única población a partir de 413 pb mitocondriales de la región control. El segmento amplificado que corresponde a la región control fue obtenido de 119 individuos: 3 de la provincia de Buenos Aires (BA); 18 individuos del Golfo San Matías; 23 individuos del Golfo San José; 61 individuos del Golfo Nuevo; 12 individuos del Golfo San Jorge; un individuo de Ushuaia y un individuo de localidad desconocida. (Tabla 4.2). La diversidad haplotípica para toda la población de delfines oscuros en aguas del Mar Argentino fue $h = 0,85$ y la diversidad nucleotídica fue de $\pi = 0,005$, mostrando niveles altos de variabilidad génica. La diversidad haplotípica (h) a nivel de poblaciones locales presentó un rango de variación alta, tomando valores desde $h = 0,66$ – Buenos Aires hasta $h = 0,98$ – Golfo San Jorge). Por otro lado los valores de diversidad nucleotídica (π) se presentaron en el rango de valores bajos ($\pi = 0,0081$) a valores moderados ($\pi = 0,01$) (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Índices de diversidad genética para cada una de las poblaciones estudiadas. N: tamaño muestral, n_h : número de haplotipos, h : diversidad haplotídica, π : diversidad nucleotídica, S: número de sitios polimórficos.

Localidad	N	N sec	n_h	h	π	S
Buenos Aires	11	3	2	$0,667 \pm 0,3143$	$0,0081 \pm 0,007$	5
Golfo San Matías	26	18	12	$0,9412 \pm 0,0388$	$0,0111 \pm 0,006$	18
Golfo San José	27	23	11	$0,9051 \pm 0,0394$	$0,0082 \pm 0,0048$	13
Golfo Nuevo	85	61	26	$0,9432 \pm 0,0144$	$0,0101 \pm 0,0056$	29
Golfo San Jorge	21	12	11	$0,9848 \pm 0,0403$	$0,01234 \pm 0,0072$	19
Ushuaia	1	1	1	$1 \pm 0,5$		

Microsatélites

La diversidad alélica encontrada para cada localidad de muestreo fue similar y moderada-alta comparado al estudio de Cassens y colaboradores (2005). Para Golfo San Matías, el número de alelos varió desde 1 hasta 10, la heterocigosidad observada varió de 0,55-1 y la heterocigocis esperada desde 0,58 – 0,86. Para el Golfo San José el número de alelos presentes en la muestra fue de 2 alelos en el locus Di47 a 11 alelos para el locus Di7, la heterocigosidad observada varió de 0,54-0,95 y la heterocigocis esperada desde 0,51 – 0,86. Para Golfo Nuevo, el número de alelos varió desde 1 alelos en el locus Di47 a 12 alelos para el locus Di7, la heterocigosidad observada varió de 0,46-0,96 y la heterocigocis esperada desde 0,63 – 0,88. Por último, el Golfo San Jorge mostró un

variación de 2 alelos para el locus Di47 y 10 para el locus Di19, la heterocigocis observada varió 0 -1 y la heterocigocis esperada 0,09 - 0,87 (Tabla 4.3). No se encontraron desviaciones del equilibrio de H-W ni desequilibrio de ligamiento para los datos (Tabla, anexo 2).

Tabla 4.3: Microsatélites usados para el análisis en este estudio. A: número de alelos, Ho: heterocigocis observada, He: heterocigocis esperada.

Loci	Localidad											
	G. San Matías			G. San José			G. Nuevo			Golfo San Jorge		
	A	Ho	He	A	Ho	He	A	Ho	He	A	Ho	He
Di19	10	0,94	0,79	10	0,90	0,83	11	0,46	0,77	10	0,94	0,83
Di7	8	0,68	0,82	11	0,78	0,86	12	0,80	0,88	9	0,89	0,87
Di24	4	0,55	0,58	6	0,54	0,51	7	0,93	0,67	6	0,57	0,66
Di47	Locus monomórfico			2	0	0,08	Locus monomórfico			2	0	0,09
Texvet7	8	0,77	0,80	10	0,95	0,84	11	0,90	0,83	8	0,80	0,85
GATA053	5	1,00	0,72	5	0,94	0,62	4	0,82	0,63	4	1,0	0,85
Igf1	9	0,94	0,86	7	0,84	0,81	11	0,96	0,83	7	0,83	0,87

Historia Demográfica

Pruebas de Neutralidad

A nivel de poblaciones locales, se encontraron desviaciones de la neutralidad usando el índice F_s de F_u , el cual es considerado una buena prueba para detectar expansión poblacional (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Todas las poblaciones exceptuando la localidad de Buenos Aires presentaron un índice F_s de F_u negativo aunque solo para las localidades de Golfo San Matías, Golfo Nuevo y Golfo San Jorge fueron significativos; Golfo San José también mostró un índice negativo pero sin significancia estadística; Buenos Aires sin embargo, obtuvo un índice de F_u positivo pero no significativo pero se debe destacar que sólo se cuenta con 3 individuos para esta localidad. Valores negativos del índice es evidencia de un exceso de número de alelos, como sería de esperar en una expansión reciente de la población. Siguiendo a F_u (1997), F_s debe ser considerado como significativo si $P < 0,02$ por lo que las poblaciones de Golfo San Jorge y Golfo Nuevo sufrieron una expansión poblacional reciente.

De igual manera el estadístico D de Tajima fue negativo en todas las poblaciones estudiadas, excepto para Buenos Aires. Sin embargo, ninguno de los índices fueron significativos

estadísticamente. Valores negativos del estadístico D son indicativos de procesos de expansión poblacional (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Valores de la prueba de Tajima (D) y de la prueba de Fu (F S) a nivel de poblaciones locales. *: $p < 0,05$; ** $P < 0,02$

Localidad	Tajima D		"F" Fu	
	D	P ($D_{sim} < D_{obs}$)	Fs	P ($D_{sim} < D_{obs}$)
Buenos Aires	0,000	0,0802	2,356	0,7900
Golfo San Matías	-0,4953	0,3450	-3,7363	0,0380*
Golfo San José	-0,3933	0,3730	-2,7222	0,0800
Golfo Nuevo	-1,3665	0,06100	-12,6798	0,0000**
Golfo San Jorge	-0,88792	0,1990	-5,50941	0,0060**
Ushuaia	-	-	-	-

Distribuciones de diferencias pareadas o "Curvas de Mistmach"

Teniendo en cuenta una única población el análisis de distribuciones de diferencias pareadas o "Curvas de Mistmach", reveló una distribución unimodal para la población de delfín oscuro presente en el litoral argentino, un número promedio de diferencias pareadas $k = 2,687$, un índice de "raggedness" de $rg = 0,014$ y un índice de Ramos-Onsins & Rozas, R2 statistic: 0,0421 ($p < 0,05$) lo que estaría indicando una expansión poblacional reciente (Fig. 4.2). El tiempo relativo (τ) desde la expansión poblacional (medido en unidades mutacionales, $\tau = 2N\mu$) para la población del delfín oscuro en la costa de Argentina fue de 0,671. El tiempo fue de 16.000 años desde la expansión poblacional.

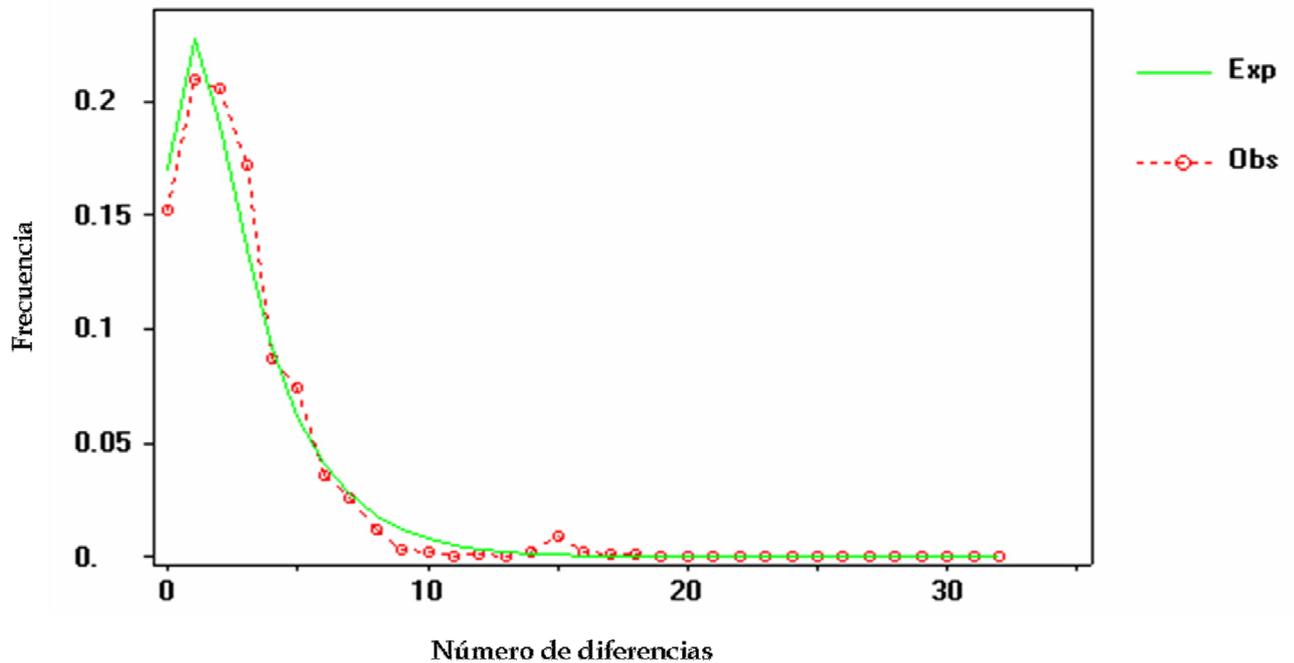


Figura 4.2. Distribuciones pareadas o “Curvas de Mismatch” para la población de delfín oscuro en la costa de Argentina. En rojo datos observados, en verde datos provenientes de la distribución teórica de un modelo de tamaño poblacional en expansión, con un $\theta_{inicial} = 2,016$, $\theta_{final} = 1.000$, $\tau = 0,671$.

A nivel local, el análisis de distribuciones de diferencias pareadas o “Curvas de Mismatch” de la región control del ADNmt, para las localidades de Golfo Nuevo, Golfo San José, Golfo San Matías y Golfo San Jorge sugiere una historia de expansión poblacional, reflejando una distribución unimodal y un número de diferencias pareadas $k_{GN} = 3,939$, $k_{SJ} = 3,289$, $k_{SM} = 5,5504$ y $k_{SJOR} = 5,015$ con un valor de estadístico de “raggedness” de $r_{GN}: 0,0103$, $r_{SJ}: 0,0167$, $r_{SM}: 0,0237$ y $r_{SJOR}: 0,0494$, índice de Ramos-Onsins & Rozas, $R2_{GN}: 0,0696$, $R2_{SJ}: 0,1193$, $R2_{SM}: 0,1233$ y $R2_{sjor}: 0,1022$ ($p > 0,05$) respectivamente pudiéndose inferir un modelo de expansión demográfica reciente o una expansión en el rango de distribución con altos niveles de migración entre los demos (Fig. 4.3 a,b,c,d).

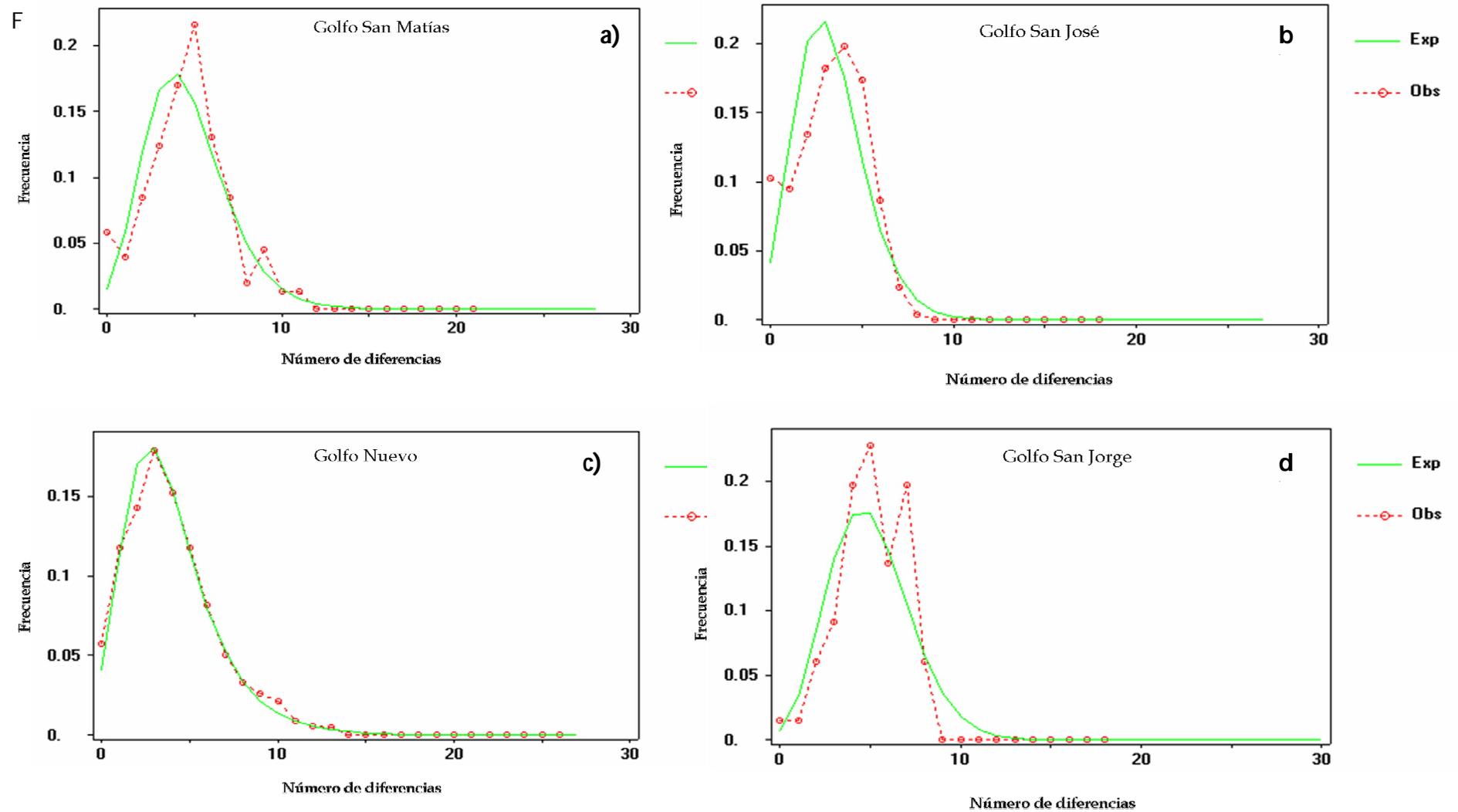


Figura 4.3. Distribuciones pareadas o "Curvas de Mismatch" para Buenos Aires. En rojo datos observados, en verde datos provenientes de la distribución teórica de un modelo de tamaño poblacional en expansión. Para Golfo San Matías con un $\theta_{inicial} = 0.994$, $\theta_{final} = 1.000$, $\tau = 3.568$. Para el Golfo Sa José con un $\theta_{inicial} = 0.485$, $\theta_{final} = 1.000$, $\tau = 2.804$. Para el Golfo Nuevo $\theta_{inicial} = 1.730$, $\theta_{final} = 1.000$, $\tau = 2.209$ y para el Golfo San Jorge $\theta_{inicial} = 0$, $\theta_{final} = 1.000$, $\tau = 5.015$.

Red de Haplotipos

En este análisis se detectaron 40 sitios variables que produjeron 33 haplotipos (Tabla 4.5 y Fig. 4.5, Fig. 4.6) a partir de un segmento de 413pb de la región control del ADN mitocondrial de 119 individuos.. La tabla construida con los datos de región control del ADNmt muestra un haplotipo más frecuente (H2) compartido por individuos asignados a las localidades de Golfo Nuevo, San José y San Matías. El H16 es exclusivo para Buenos Aires y el H33 es exclusivo para Ushuaia. Mientras que el Golfo San Matías posee 3 haplotipos exclusivos (H30, H31, H32). El Golfo San José posee 2 haplotipos exclusivos (H18, H19). El Golfo Nuevo posee 9 haplotipos exclusivos (H4, H6, H7, H9, H10, H11, H13, H14, H25) siendo la localidad mas diversa y con mayor número de haplotipos exclusivos. El golfo San Jorge tiene 8 haplotipos exclusivos (H20, H21, H22, H23, H24, H27, H28, H29). La red construida muestra un haplotipo más frecuente, H2 compartido por individuos del Golfo Nuevo, Golfo San José y Golfo San Matías, seguido por el haplotipo H1 compartido por animales de Buenos Aires, Golfo San Matías y Golfo Nuevo. La red de haplotipos proporciona evidencia de expansión poblacional reciente, relacionada con un patrón de relaciones entre los haplotipos "tipo estrella", en la que hay un haplotipo central muy frecuente y muchos haplotipos poco frecuentes derivados de este y separados por pocos pasos mutacionales (Fig. 4.5). Sin embargo debe tenerse en cuenta que, una red de haplotipos en forma de estrella está fuertemente influenciada por el tamaño muestral, habiéndose encontrado que la misma muchas veces desaparece al aumentar el N (Hein, Schierup & Wiuf 2004).

Tabla 4.5. Número de individuos por haplotipo por localidad de muestreo para el delfín oscuro.

Haplotipo	Localidad							N total
	BA	GSM	GSJ	GN	GSJor	U	D	
H1	2	1		8				11
H2		5	11	26				42
H3		4	1	2				7
H4				1				1
H5		1	3	4	1			9
H6				1				1
H7				2				2
H8		2		1	2			5
H9				1				1
H10				1				1
H11				1				1
H12		1	2	3	1			7
H13				3				3
H14				1				1
H15		1	2	3				6
H16	1							1
H17							1	1
H18			1					1
H19			1					1
H20					1			1
H21					1			1
H22					1			1
H23					1			1
H24					1			1
H25				2				2
H26			1	1				2
H27					1			1
H28					1			1
H29					1			1
H30		1						1
H31		1						1
H32		1						1
H33						1		1

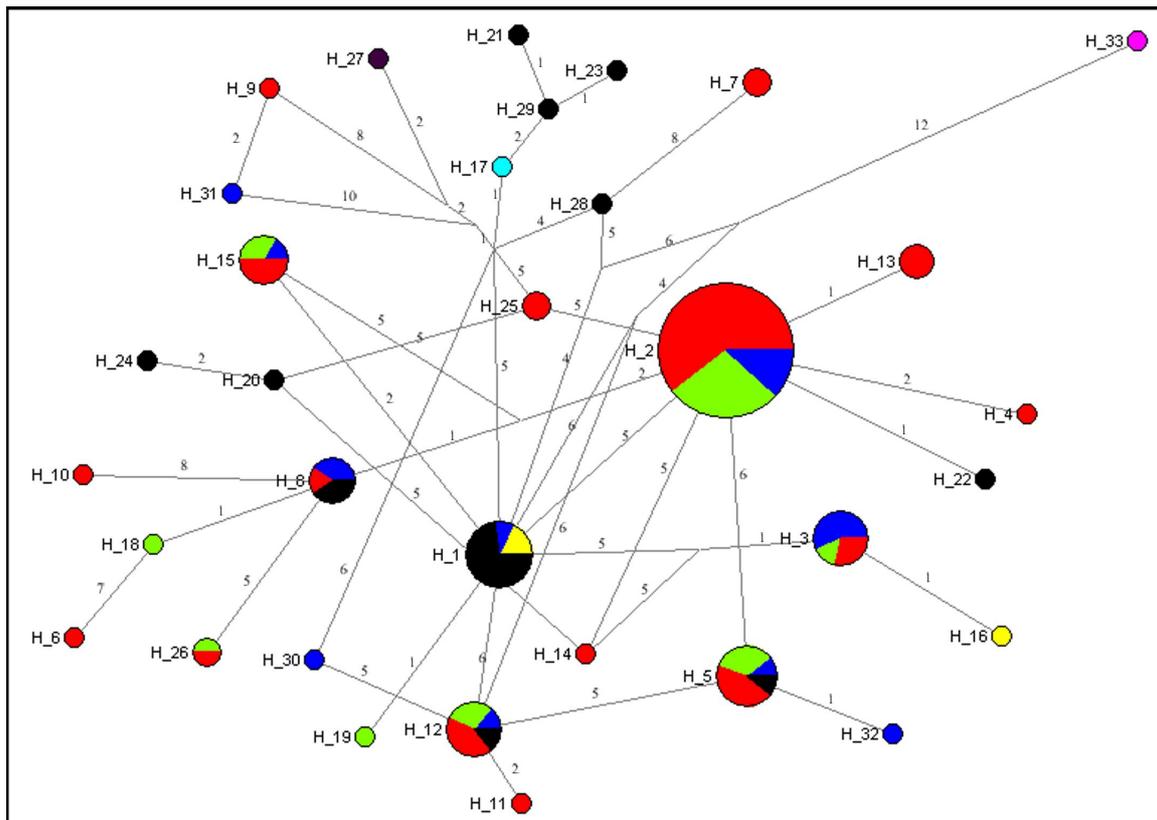


Figura 4.5. Red de haplotipos obtenida usando el algoritmo "median joining network" (Bandelt et al. 1999). La figura muestra una red de 33 haplotipos recuperados a partir de 6 localidades a lo largo del litoral argentino (BA = Buenos Aires; GSM = Golfo San Matías; GSJ = Golfo San José; GN = Golfo Nuevo; GSJor = Golfo San Jorge; U = Ushuaia; D = Desconocida). Cada círculo representa un solo haplotipo y el área de cada uno de ellos es proporcional al número de individuos; los colores indican la localidad muestreada. Amarillo: Buenos Aires, Azul: G. San Matías, Verde: G. San José, Rojo: G. Nuevo, Negro: G. San Jorge, Fucsia: Ushuaia, Celeste: Desconocida.

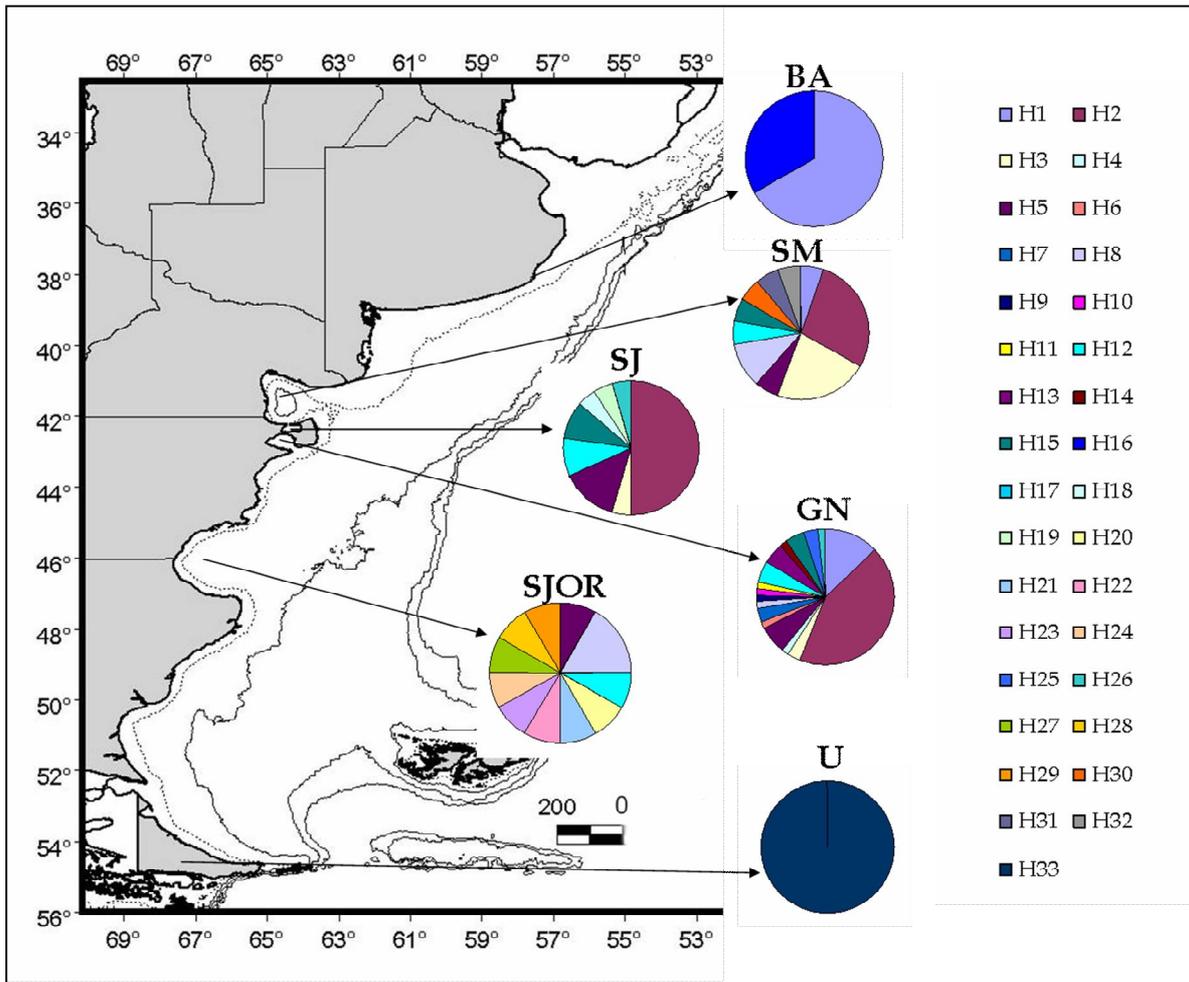


Figura 4.6: Ubicación geográfica de las 6 localidades de muestreo analizadas a lo largo del litoral argentino (BA = Buenos Aires; SM = Golfo San Matías; SJ = Golfo San José; GN = Golfo Nuevo; SJOR = Golfo San Jorge; U = Ushuaia;) y la distribución geográfica de los haplotipos obtenidos de un segmento de la región control del ADN mitocondrial. Cada color en el diagrama de tortas representa un solo haplotipo y el área de cada uno de ellos es proporcional al número de individuos (ver Tabla 4.5 para ver frecuencia de haplotipos); los colores indican los 33 haplotipos para el delfín oscuro.

Curvas de Rarefacción

La riqueza de haplotipos estimada a través de las curvas de rarefacción indica que los muestreos durante todo el rango de distribución de la especie en Argentina no ha alcanzado aún la asíntota por lo que es de esperar que se encuentre una mayor diversidad (Fig. 4.7). La extrapolación de los datos, con re-muestreo, muestra que todas las localidades se encuentran bien representadas (Tabla 4.6). Mientras que la localidad de Golfo san Jorge presenta valores de Chao 1 = 33 y Chao 2 = 11 sugiriendo que el muestreo quizás no represente lo que se espera para el sistema bajo estudio (Tabla 4.6).

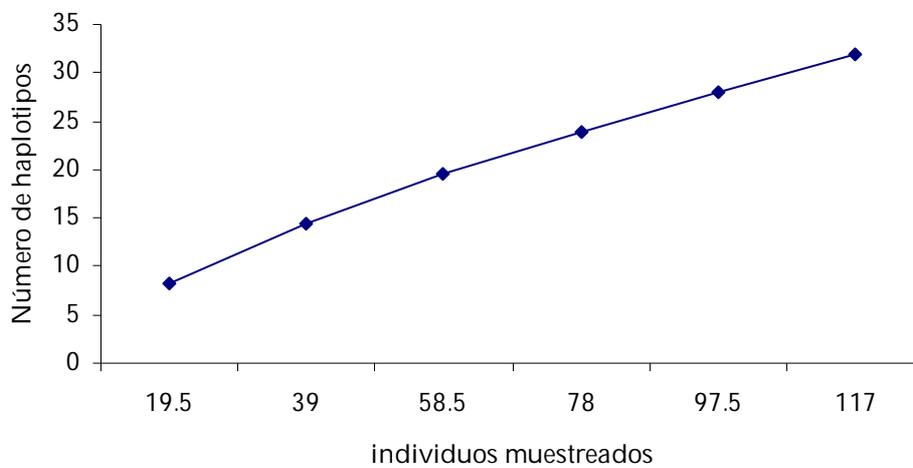


Figura 4.7: Curvas de rarefacción de la diversidad haplotípica observada de la región costera de delfines oscuros de la costa de Argentina.

Tabla 4.6: Valores medios asintóticos de dos estimadores de extrapolación y sus intervalos de confianza (IC), según corresponda, aplicados a los datos de la region control ADN mitocondrial.

	Hobs	Chao 1	Chao 2
	2		
Buenos Aires	media	2	2
	interv conf 95% lim inf	2	2
	interv conf 95% lim sup	4.06	5.28
	10		
Golfo San Matias	media	20.5	10
	interv conf 95% lim inf	12.03	11.09
	interv conf 95% lim sup	64.19	20.55
	8		
Golfo San Jose	media	10	8
	interv conf 95% lim inf	8.25	8.43
	interv conf 95% lim sup	24.01	16.88
	17		
Golfo Nuevo	media	24	17
	interv conf 95% lim inf	18.45	20.73
	interv conf 95% lim sup	50.75	33.06
	11		
Golfo San Jorge	media	33.5	11
	interv conf 95% lim inf	16.23	12.44
	interv conf 95% lim sup	107.77	22.36

Determinación de sexo

En todas las localidades de muestreo la relación de sexos de los delfines oscuros no difiere de la relación 1:1. Para cada una de las pruebas, no se rechazó la hipótesis nula (Tabla 4.7, Fig.4.8).

Tabla 4. 7. Prueba de Bondad de Ajuste por localidad de muestreo para el delfín oscuro.

Localidad	Hembras	Machos	Total	p
Desconocida	1	0	1	
Buenos Aires	2	1	3	
Golfo San Matías	10	8	18	1*
Golfo San José	11	11	22	0.7630*
Golfo Nuevo	36	27	63	0.5344*
Golfo San Jorge	16	11	27	0.6884*

* Los asteriscos indican no significancia de la puesta a prueba, $p > 0.05$.

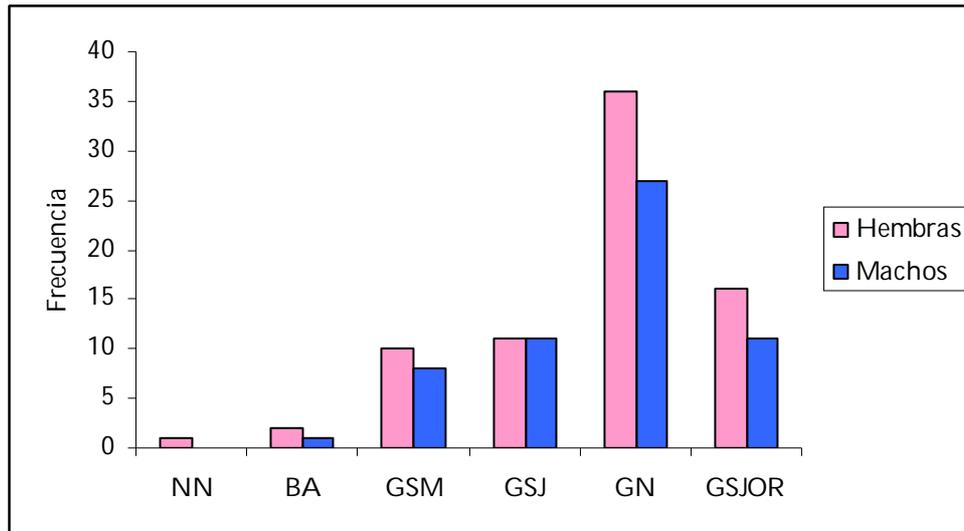


Figura 4.8. Frecuencia de sexos por localidad para el delfín oscuro en el litoral argentino.

DISCUSION

En el presente capítulo se estudiaron cambios en la diversidad genética y cambios demográficos en la población de delfines oscuros a lo largo de la costa de Argentina, especie impactada por las artes de pesca y actividades turísticas a lo largo de su distribución en el litoral argentino. Estos cambios en la diversidad génica y en la historia demográfica se estudiaron mediante el uso de marcadores de ADN mitocondrial y nuclear. Específicamente, se utilizaron secuencias de la región control del ADN mitocondrial y de 7 loci microsatélites a partir de individuos muestreados en 6 regiones que cubren toda la distribución del delfín oscuro en el Océano Atlántico Sud Occidental.

Existen estudios previos de la diversidad génica del delfín oscuro, pero ninguno en el litoral argentino, siendo este trabajo pionero en la región para la especie. La diversidad génica tanto del ADN mitocondrial como de los loci de microsatélites es similar a la encontrada para la especie en el resto de su distribución mundial (Cassens et al., 2003, 2005; Harlin-Cognato et al., 2003, 2007). Los resultados de este estudio muestran una alta diversidad haplotípica $h = 0,84$, no obstante la diversidad nucleotídica fue baja 0.051. En este contexto, y de acuerdo con las premisas propuestas por Grant y Bowen (1998), cuando π es pequeño y h grande, la población de delfín oscuro en la costa de Argentina pudo sufrir en el pasado procesos de expansión y contracción de sus poblaciones, asociada con los eventos de glaciación ocurridos durante el Pleistoceno. El crecimiento poblacional y su expansión geográfica produjeron, probablemente, una rápida diversificación de haplotipos con mínimas diferencias nucleotídicas.

En esta tesis se encontraron 33 haplotipos, a pesar de que el haplotipo más frecuente esté presente en la mayoría de las localidades muestreadas, existen haplotipos exclusivos para cada localidad, es decir, que existirían matrilineas residentes. El análisis de las curvas de rarefacción y los índices de diversidad indican que no alcanzó a mostrar toda la diversidad haplotípica existente en el sistema, sin embargo varias localidades de muestreo se encuentran bien representadas. De 33 haplotipos presentes en el estudio 8 haplotipos provienen de muestras de captura incidental, esto estaría indicando que algunos linajes maternos pueden estar sufriendo capturas de pesca diferenciales, sobre todo considerando la posibilidad de que los grupos matrilineales se pueden mover juntos y pueden ser afectados por fenómenos similares (Baker et al., 1994; Weinrich et al., 2006). Las muestras provenientes del Golfo San Jorge provienen de la captura incidental, esta población posee 8 haplotipos exclusivos, es decir, la distribución de las frecuencias de haplotipos observada podría implicar que algunos linajes maternos son más propensos a estar sujetos a tasas altas de capturas incidentales. Méndez y colaboradores (2008, 2010), encontraron para la franciscana, *Pontoporia blainvillei*, en la costa bonaerense que los grupos de madres con cría son más susceptibles a la captura incidental. De igual forma, la población del Golfo Nuevo está sujeta a impactos del turismo (Coscarella et al., 2003, Dans et al., 2008). Esta localidad es una de las más diversas en cuanto a su estructura génica, sin embargo es la que presenta mayor número de haplotipos exclusivos (9), es decir, linajes maternos únicamente presentes en este Golfo están sujetos a los impactos del turismo. Por lo tanto, las características génicas del delfín oscuro deberían tenerse en cuenta al momento de elaborar estrategias de manejo y conservación en particular en cada una de las unidades locales. Por otro lado, la localidad de Ushuaia, extremo sur de la distribución de la especie en el Mar Argentino, presenta un único haplotipo, esto podría estar indicando un grupo diferente genéticamente o una alta diversidad genética; este es el primer trabajo de genética para la especie que incluye muestras de esta zona.

La red de haplotipos en forma de estrella coincide con los resultados de la curva de diferencias pareadas (Curvas de Mismatch) y el índice de F_u , sugiriendo expansión poblacional reciente para la especie. La curva unimodal de las diferencias pareadas mostró una curva unimodal hacia la izquierda y el índice de F_u fue negativo y significativo reflejando una expansión de la población. A partir de la curva de diferencias pareadas se pudo estimar el tiempo de la expansión, el mismo fue de 16.000 años. Según Cassens y colaboradores (2005), estimaron la divergencia en 20.000 años entre la población de Argentina y Sudáfrica. Por lo que la expansión de la población de Argentina encontrada en este estudio podría estar dada por la reciente

separación con Sudáfrica, además que el tiempo de expansión coincide con la retracción del Último Máximo Glacial (Mercer, 1976).

Durante un período de 2,5 millones de años en el Pleistoceno, repetidos patrones de expansión y recesión de las capas de hielo de la Antártida influenciaron a nivel mundial la distribución de las temperaturas superficiales del mar y el flujo de las corrientes oceánicas (Mercer, 1976; Vuilleumier, 1985; Paul et al., 2003). Estos hechos geológicos históricos durante el Plio-Pleistoceno influyeron en los patrones contemporáneos de la estructura genética observados en los organismos marinos que viven en el Hemisferio Sur (Grant & Bowen, 2006). Los delfines de los géneros *Cephalorhynchus* y *Lagenorhynchus* habitan aguas templadas y templado-frías del Hemisferio Sur y comparten similitudes en su distribución y en el patrón de divergencia tanto morfológicas como genéticas (exclusivamente ADNmt); estas similitudes se han interpretado como el resultado de la utilización de corredores de dispersión presentes entre períodos glaciales en el Plio-Pleistoceno (Pichler et al., 2001; Cassens et al., 2003). Estos patrones actuales de divergencia y distribución observada en estos géneros de delfines inspiraron la hipótesis de la Deriva de los Vientos del Oeste (*WWD*, Westwind Drift), lo que sugiere una dispersión hacia el Este de los delfines a través de una ruta unidireccional, lineal con la corriente templada oceánica al Oeste del viento durante el Plio-Pleistoceno. La hipótesis *WWD*, explicaría la preferencia por las aguas templadas y la distribución de estos delfines en las zonas templadas y regiones de surgencia costera a lo largo del Sur de África, América del Sur y Nueva Zelanda dentro de las isotermas de 8 ° C y 16 ° C.

Sin embargo, Harlin-Cognato y colaboradores (2007) no encontraron apoyo a la hipótesis de la Deriva de los Vientos del Oeste (*WWD*). En cambio, los datos de los autores indican que los cambios en la productividad primaria y abundancia de presas relacionadas a los delfines oscuros han desempeñado un papel clave en la conformación de la filogeografía de estos delfines, con períodos de cambio del océano que coincide con los eventos importantes en la historia de esta especie de delfines de clima templado. Cambios en la temperatura superficial del mar tienen un fuerte efecto sobre las poblaciones de anchoíta, por lo que es factible que las fluctuaciones en la dinámica de esta especie podría desempeñar un papel importante en la historia de las poblaciones de delfines costeros. Siguiendo lo propuesto por Harlin-Cognato y colaboradores (2007), la historia demográfica de la población de delfines oscuros en Argentina podría seguir el mismo patrón filogeográfico. La expansión poblacional ocurrió hace 16.000 años, coincidiendo con la retracción del Último Máximo Glacial. Observando los patrones de las curvas de diferencias pareadas

(Curvas de Mismatch) y los índices de D Tajima y F_u en cada localidad muestreada en particular, las poblaciones de Golfo San Matías, Golfo San José y Golfo Nuevo en expansión poblacional o de rango de distribución. Es decir, los delfines oscuros iban expandiendo su rango a medida que las temperaturas del agua aumentaban y aparecían nuevas áreas productivas hacia el sur del continente. Además, se ha sugerido que algunas islas del Hemisferio Sur, incluyendo las Islas Malvinas, podrían haber permanecido habitables por lo menos durante la temporada de verano austral durante la última glaciación (Hoelzel et al., 2001). Por lo que pudo haber actuado como un conducto para la dispersión de algunos animales como los delfines oscuros hacia las Georgias del Sur o Islas Malvinas, por lo que se podría explicar la bimodalidad (población estable) en la curva de diferencias pareadas (curvas de Mismatch) de la población de delfines oscuros del Golfo San Jorge. Este patrón de distribución y dispersión en el Hemisferio Sur se ha encontrado en otras especies como ser el elefante marino del sur, *Mirounga leonina* (Hoelzel et al., 2001) y el lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens* (Túnez et al., 2010).

En resumen, la población del delfín oscuro presenta una alta diversidad haplotípica y una baja diversidad nucleotídica, presentando valores similares descriptos para ésta y otras especies de pequeños cetáceos en la costa de Argentina (Mendez et al., 2008; Pimper et al., 2010, 2012; Coscarella et al., 2008). Los valores de H_o y H_e , fueron similares a los encontrados para la especie (Cassens et al., 2005). Además se encontró que ciertos linajes maternos están siendo impactados por actividades turísticas así como también estuvieron sujetos a la captura incidental, aunque de menor incidencia la primera respecto de la última. La historia demográfica de la especie en el litoral argentino, refleja una expansión de población y expansión de rango a fines del Último Máximo Glacial. Por lo tanto, el monitoreo de los cambios en la diversidad genética adentro y entre las áreas a través del tiempo permitirán evaluar los efectos de las presiones antropogénicas (la captura incidental, actividades turísticas) y el cambio climático en la especie.

CONSIDERACIONES FINALES

Esta tesis constituye la primera investigación en cuanto al estudio de la estructura poblacional del delfín oscuro en el litoral argentino mediante el uso de marcadores moleculares. Si bien se han desarrollado trabajos de diversidad génica y estructura genética para el delfín oscuro en Argentina (Cassens *et al.*, 2003, 2005; Harlin-Cognato *et al.*, 2007), éstos fueron realizados a escala filogeográfica. Por lo que la información de la estructura poblacional a nivel local en la costa argentina era inexistente. No fue sino hasta hace algunos años cuando el Laboratorio de Mamíferos Marinos (CENPAT-CONICET) comenzó a estudiar la identificación de unidades de manejo en especies clave de mamíferos marinos del litoral marino patagónico que se comenzaron a utilizar los marcadores moleculares como herramienta para el estudio de la estructura poblacional.

Los resultados alcanzados en este trabajo tienen gran relevancia. Por un lado se obtuvo información acerca de la estructura génica de la población de delfines oscuros, utilizando marcadores moleculares neutros, ADN mitocondrial y microsatélites. Por otro lado, también se investigó la diversidad génica y los procesos demográficos históricos, información necesaria y de vital importancia a la hora de diseñar planes de manejo y conservación de la especie. Desde la perspectiva de la *Genética de la Conservación*, es imperante contar con información de la estructura genética de las poblaciones dado que se pueden aportar soluciones a problemas como por ejemplo: a) establecer especies prioritarias para la conservación, b) resolver incertidumbres taxonómicas, c) definir unidades evolutivamente significativas y d) unidades de manejo e, idealmente, poder proteger los procesos evolutivos que mantienen la diversidad biológica (Moritz, 2002).

En resumen, los resultados alcanzados durante el desarrollo de esta tesis permitieron ampliar el conocimiento sobre la ecología y la estructura poblacional de la especie, aportando además información para considerar y utilizar en el momento de tomar decisiones de conservación y manejo. Las principales conclusiones de esta tesis son las siguientes:

- La población de delfines oscuros en la costa de Argentina presenta filopatría por parte de las hembras y una alta dispersión de machos a lo largo de la costa. Esto se observa por la estructura poblacional encontrada mediante el análisis del ADN mitocondrial y la falta de estructura genética de la población encontrada con loci de microsatélites. De manera que la población se comporta como una única población con altas tasas de migración y flujo génico.

- La variabilidad genética encontrada en la población de delfín oscuro, indica que esta especie ha pasado por sucesos evolutivos relativamente recientes, como es el caso de expansión y contracción de las poblaciones asociados a los períodos de glaciaciones del Pleistoceno.
- Los análisis en la región control sugieren eventos de expansión poblacional en el pasado y describen un modelo de panmixia. El tiempo de expansión fue aproximadamente de 16.000 años, coincidiendo con el Último Máximo Glacial.
- Tanto las curvas de Mismatch como el índice de F_u , indicaron una expansión poblacional para el Golfo San Matías, Golfo Nuevo y Golfo San Jorge.
- Asimismo, los estudios realizados en este trabajo muestran que la especie presenta altos niveles de diversidad génica. Se encontró una alta diversidad haplotípica y una baja diversidad nucleotídica para la región control del ADN mitocondrial, sugiriendo una reciente expansión poblacional.
- Se encontró también una alta heterocigocis y alta diversidad alélica para los loci de microsatélites utilizados en esta tesis, siguiendo el mismo patrón encontrado en trabajos anteriores para la especie.
- Se identificaron 33 haplotipos para el delfín oscuro en el área de estudio, se construyó la red de haplotipos pero ésta no mostró diferencia alguna entre las poblaciones de la especie a lo largo de la costa. La red de haplotipos proporciona evidencia de expansión poblacional reciente, relacionada con un patrón de relaciones entre los haplotipos "tipo estrella", en la que hay un haplotipo central muy frecuente y muchos haplotipos poco frecuentes derivados de este y separados por pocos pasos mutacionales. Sin embargo, se encontraron haplotipos exclusivos para cada localidad de muestreo, sugiriendo la filopatría para ciertos linajes maternos.
- Cabe destacar que de los 3 individuos muestreados en Buenos Aires, que representa el límite norte de la distribución de la especie en Argentina, posee 2 haplotipos, el H16 haplotipo exclusivo para esta localidad y el H1 que comparte tanto con el Golfo San Matías y Golfo Nuevo.
- Ushuaia, que representa el límite sur de la distribución de la especie en Argentina, esta representada por un único haplotipo exclusivo. Es la primera vez que se incluye en un trabajo de genética del delfín oscuro, muestras del extremo sur, por lo que estaría indicando un linaje materno filopátrico en la Isla de Tierra del Fuego, que no se observó en muestras provenientes del continente.

- Si bien se cuenta con antecedentes de investigación sobre los grupos de delfines oscuros afectados por la actividad turística (Coscarella et al., 2003; Dans et al., 2008), estos estudios se realizaron sin la información genética de la población. Por lo que, dado que el Golfo Nuevo presenta 9 matrilineas exclusivas, indicando un alto grado de filopatría a esta zona, estos resultados deberían tenerse en cuenta al momento de diseñar un plan de manejo y conservación de la especie, además de reevaluar el impacto producido por la actividad comercial sobre los delfines oscuros.
- Asimismo, el Golfo San Jorge presentó 8 matrilineas exclusivas, todas las muestras de esta zona provienen de la captura incidental. Esta localidad es una de las áreas de pesca más importantes del país. Estudios previos indicaron que durante la década del '90 la captura incidental estuvo próxima al máximo nivel sustentable (Dans et al., 2003 a, b). Por lo que es probable que ciertos linajes maternos se encuentren más vulnerables y/o expuestos a la captura por parte de los buques de pesca.
- Por último, conocer la estructura poblacional de la especie, es de vital importancia hacia un manejo integrado, brindando herramientas efectivas para la conservación de la especie a la luz de los impactos producidos a lo largo del litoral argentino. La variabilidad genética de delfín oscuro en el Océano Sudoccidental se encuentra distribuida homogéneamente y no se detecta más de una Unidad de Manejo. La población se comporta como una sola población panmítica. Si la población de delfines se comporta como una población panmítica se reducen las posibilidades de que con la pérdida de una subpoblación o población local se presente un impacto negativo, determinante en el futuro de la especie desde el punto de vista genético.

ANEXO I

Pop-01 Protocolo para extracción de ácidos nucleicos de huesos

1. Cortar un fragmento de hueso (aproximadamente 0,5cm de espesor); limpiar toda la superficie del hueso con ayuda de un bisturí.
2. Colocar el fragmento de hueso o diente en un freezer a -80 °C por 24hs.
3. Triturar tres o cuatro veces, por 3 segundos, en molino mineralógico.
4. Realizar alícuotas del hueso o diente de 0,4ml en tres microtubos de 2ml (congelar el restante para eventual repetición del protocolo de extracción). En muestras en las que no se tuvo éxito en el primer intento, realizar alícuotas de hasta seis microtubos de 2ml
5. Adicionar 600ul de SEB, 35ul de proteinaza K, homogeneizar, 40ml de DDT.
6. Homogeneizar en vórtex, incubar en baño maría por toda la noche a 56°C.
7. Adicionar 600ul de solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y homogeneizar en vórtex hasta la formación de una emulsión lechosa.
8. Centrifugar por 3 minutos a 15000rpm.
9. Repetir desde paso 7.
10. Transferir la fase acuosa (sobrenadante) para Microcon 100, conteniendo 40ul de agua ultrapura.
11. Centrifugar a 4500rpm, hasta que la totalidad del volumen ha sido filtrado.
12. Descartar el líquido filtrado y adicionar 5000ul de agua ultrapura en la membrana.
13. Centrifugar a 4500rpm, hasta que la totalidad del volumen ha sido filtrado.
14. Repetir los pasos 12 y 13.
15. Adicionar desde 20 a 40ul de agua estéril (a temperatura ambiente) en el Microcon y pipetear varias veces, teniendo cuidado de no romper la membrana.
16. Invertir el Microcon en un tubo nuevo y centrifugar por 7 minutos a 7000rpm.
17. Incubar a 95°C por 10min (opcional).
18. ADN extraído y congelar a -20°C.

Opcional Descalcificación con EDTA

1. Cortar el fragmento de hueso (aproximadamente 0,5cm de espesor) limpiar toda la superficie del hueso con ayuda de un bisturí.
2. Colocar los fragmentos en solución de EDTA 0,5M pH 8 hasta cubrir por completo el hueso durante 7 días aproximadamente o hasta que los fragmentos estén blandos. En el caso de superar los 10 días, cambiar la solución de EDTA por una nueva.

3. Con auxilio de un bisturí, cortar pequeños pedacitos y colocar en un microtubo de 2ml.
4. Continuar con el proceso de extracción a partir del paso 5.

ANEXO II

Tabla A2: Test Exáctos de Hardy-Weinberg, se muestran los valores de p por localidad de muestreo por locus. Los test se realizaron utilizando metodo de cadenas de Markov implementado en el software Arlequín siguiendo Guo &Thompson (1992).

	Golfo San Matías	Golfo San José	Golfo Nuevo	Golfo San Jorge
Di19	0,083	0,458	0	0,090
Di7	0,040	0,422	0,518	0,991
Di24	0,362	0,250	0,005	0,576
Di47	Locus monomórfico	0,021	Locus monomórfico	0,024
Texvet7	0,027	0,698	0,014	0,532
GATA053	0,018	0,003	0,268	0,204
Igf1	0,628	0,837	0,799	0,204

ANEXO III

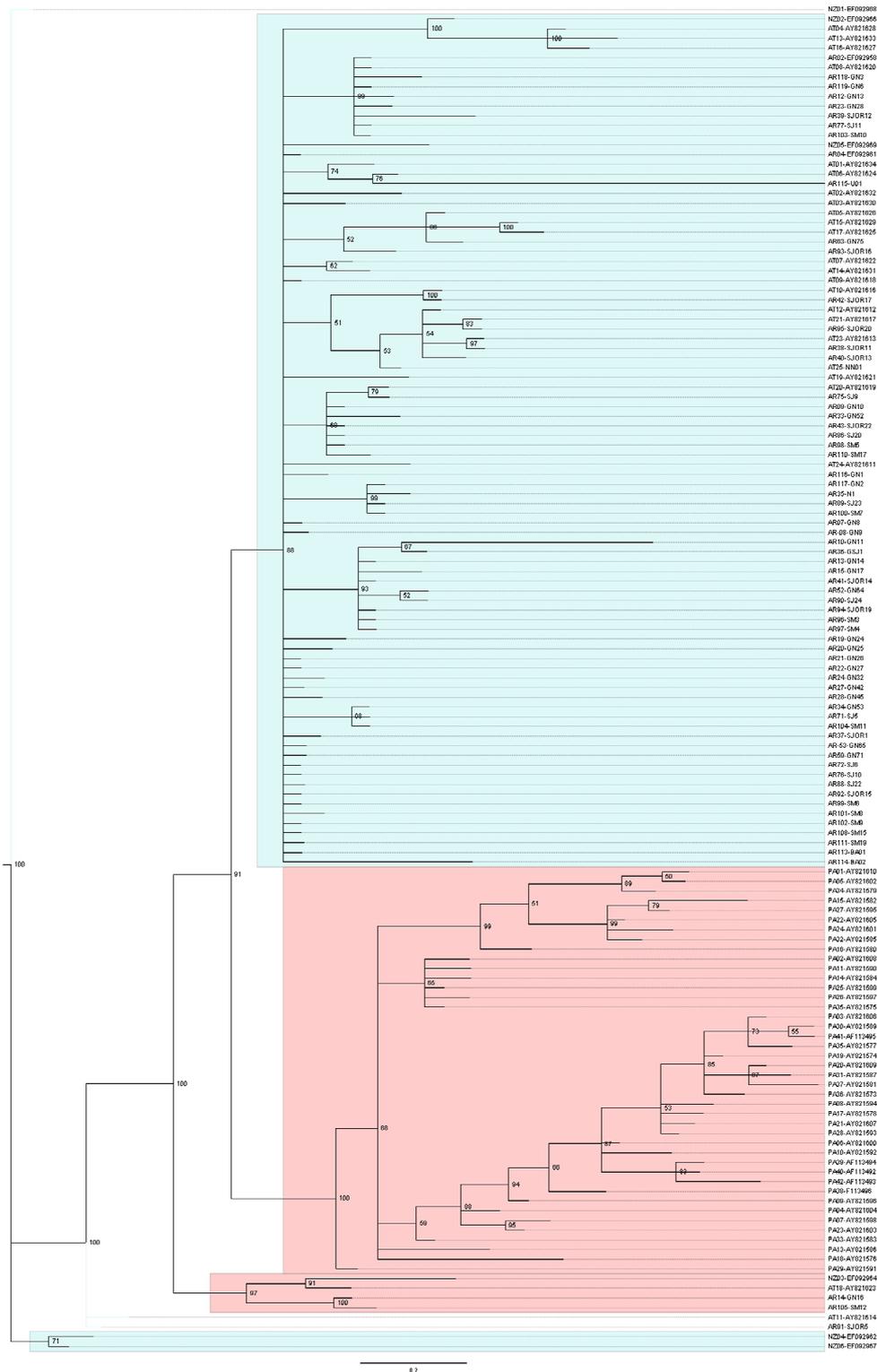


Figura A3: Árbol filogeográfico del delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*, estimado con Mr. Bayes. AR = Argentina; AT = Atlántico (Argentina y Sudafrica); NZ = Nueva Zelanda; PA = Pacífico. En celeste se indica el clado del Atlántico y en rosa el clado del Pacífico. Extraído de Loizaga de Castro et al., (2012).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams S.M., Lindmeier J.B. y D.D. Duvernell. (2006). Microsatellite analysis of the phylogeography, pleistocene history and secondary contact hypothesis for the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Molecular Ecology* 15:1109–1123.
- Akselman R. (1996). Estudios ecológicos en el Golfo San Jorge y adyacencias (Atlántico Sudoccidental). Distribución, abundancia y variación estacional del fitoplancton en relación a factores físico-químicos y la dinámica hidrológica. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 234 pp.
- Allendorf F. W. y G. Luikart. (2007). *Conservation and the Genetics of Populations* Blackwell Publishing, Oxford, UK, 642 pp.
- Altmann J. (1973). Observational study of Behavior: Sampling Methods. *Behaviour* 49: 227-267.
- Amaral A.R., Beheregaray L.B., Bilgmann K., Freitas L., Robertson K. M., M. Sequeira, Stockin, K.A., Coelho M.M y Möller L.M. (2012). Influences of past climatic changes on historical population structure and demography of a cosmopolitan marine predator, the common dolphin (genus *Delphinus*) *Molecular Ecology* doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05728.x
- Andersen L.W., Holm L., Sjegismund H.R., Clausen B., Kinze C.C. y V. Loeschcke. (1997). A combined DNA-microsatellite and isozyme analysis of the population structure of the harbour porpoise in Danish waters and West Greenland. *Heredity* 78: 270-276.
- Amos B. y Hoazel A.R. (1990). DNA fingerprinting cetacean biopsy samples for individual identification. *Report of the International Whaling Commission, Special Issue 12: 79–85.*
- Amos W. y Hoazel A.R. (1991). Long-term preservation of whale skin for DNA analysis. *Report of the International Whaling Commission, Special Issue, 13: 99–103.*
- Amos B., Schlotterer C. y D. Tautz. (1993). Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science* 260:670–672.
- Amos W. y J. Harwood. (1998). Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 353: 177-186.
- Arnason U., Gullberg A., Janke A. (2004). Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution. *Gene*, 333, 27–34.
- Austerlitz F., JungMuller B., Godelle B., Gouyon P.H. (1997). Evolution of coalescence times, genetic diversity and structure during colonization. *Theor Popul Biol* 51:148–164.

- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A. y N.C. Saunders. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 18:489-522.
- Avise J.C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, E.U.A. 447 pp.
- Avise J.C. y J.L. Hamrick (Eds). (1996). *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman & Hall, New York (512 pp.).
- Baker A.N. (1990). *Whales & Dolphins of New Zealand & Australia*. Victoria University Press, Wellington.
- Baker C.S., Palumbi S.R., Lambertsen R.H., Weinrich M.T., Calambokidis J. y S.J. O'Brien. (1990). Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nature* 344: 238–240.
- Baker C.S., Perry A., Bannister J.L., Weinrich M.T. y R.B. Abernethy. (1993). Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 90, 8239-8243.
- Baker C.S., Weinrich M.T., Early G. y S.R. Palumbi (1994). Genetic impact of an unusual group mortality among Humpback Whales. *Journal of Heredity* 85:52–54.
- Baldoni A. (1990). Renovación del agua de fondo del Golfo San Jorge. Seminario de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Buenos Aires, 24 pág.
- Ballard J.W.O. y M.C. Whitlock. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729-744.
- Balloux F. y Goudet J. (2002). Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Molecular Ecology* 11: 771-783.
- Bandelt H.J., Forster P. y A. Röhl. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37–48.
- Banguera-Hinestroza E., Cárdenas H., Ruiz-García M., Marmontel M., Gaitán E., Vázquez R., y F. García-Vallejo. (2002). Molecular Identification of Evolutionarily Significant units in the Amazon river dolphin *Inia sp.* (Cetacea: Iniidae). *The American Genetics Association* 93: 312–322.

- Banguera-Hinestroza E., Bjorge A., Reid R.J., Jepson P. y A.R. Hoelzel. (2010). The influence of glacial epochs and habitat dependence on the diversity and phylogeography of a coastal dolphin species: *Lagenorhynchus albirostris*. *Conservation Genetics*, 11, 1823–1836.
- Barrett-Lennard L., T.G. Smith y G.M. Ellis. (1996). A cetacean biopsy system using lightweight pneumatic darts, and its effect on the behavior of killer whales. *Marine Mammal Science* 12: 14-27.
- Barton N.H. (2000). Genetic hitchhiking. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 355: 1553–1562.
- Bearzi G. (2000). First report of a common dolphin (*Delphinus delphis*) death following penetration of a biopsy dart. *Journal of Cetacean Research and Management* 2: 217-221.
- Bekkevold D., André C., Dahlgren T.G., Clausen L.A.W., Torstensen E., Mosegaard H., Carvalho G.R., Christensen T.B., Norlinder E., Ruzzante D.E. (2005). Environmental correlates of population differentiation in Atlantic herring. *Evolution* 59:2656–2668.
- Bérubé M. y P.J. Palsbøll. (1996). Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology* 5: 283-287.
- Berta A. y J.L. Sumich. (1999). *Marine Mammals. Evolutionary Biology*. Academic Press. E.U.A. 494 pp.
- Bilgmann K., Griffiths O.J., Allen S.J. y L.M. Möller. (2007). A biopsy pole system for bow-riding dolphins: Sampling success, behavioral responses, and test for sampling bias. *Marine Mammal Science* 23: 218-225.
- Block B.A., Dewar H., Blackwell S.B., Williams T.D., Prince E.D., Farwell C.J., Boustany A., Teo S.L.H., Seitz A., Walli A., Fudge D. (2001). Migratory movements, depth preferences, and thermal biology of Atlantic blue W n tuna. *Science* 293:1310–1314
- Borrel A., Cantos G., Pastor T. y A. Aguilar. (2001). Organochlorine compounds in common dolphins (*Delphinus delphis*) from the Atlantic and Mediterranean waters of Spain. *Environmental Pollution* 114: 265-274.
- Bowen B.W., Bass A.L., Soares L., Toonen R.J. (2005). Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology* 14:2389–2402.

- Brownell R.L.Jr. (1974). Small odontocetes of the Antarctic. En V.C. Bushnell (eds). Antarctic Mammals. Antarctic Map Folio Series, Folio 18. American Geographic Society, NY.
- Brown W.M., George M.Jr. y A.C. Wilson. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 76: 1967-1971.
- Brown G.G. y M.V. Simpson. (1982). Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. Proceedings of the National Academy of Sciences 79: 3246-3250.
- Brown W.M. (1983). Evolution of animal mitochondrial DNA. 62-88 pp. en M. Nei & R. K. Koehn (eds). Evolution of genes and proteins. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Brown M. R., Corkeron P.J., Hale P.T., Schultz K. W. y M. M. Bryden. (1994). Behavioral responses of east Australian humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, to biopsy sampling. Marine Mammal Science 10: 391-400.
- Brownell R.L. y F. Cipriano. (1999). Dusky dolphin, *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828). In: Handbook of Marine Mammals (Ridgway SH, Harrison SR, eds.) Vol. 6: The second book of dolphins and porpoises, 85-104 pp.
- Buratti C., Cabreira A. y P. Martos. (2006). Patrones de distribución del efectivo patagónico de anchoita, *Engraulis anchoita*, en primavera tardía durante los años 1998, 1999 y 2004. INIDEP. Informe Técnico Nro. 45
- Caballero S., Trujillo F., Vianna J.A., Barrios-Garrido H., Montiel M.G., Beltrán-Pedrerros S., Marmontel M., Santos M.C., Rossi-Santos M., Santos F.R. y C.S. Baker. (2007). Taxonomic status of the genus *Sotalia*: species level ranking for "Tucuxi" (*Sotalia fluviatilis*) and "costero" (*Sotalia guianensis*) dolphins. Marine Mammal Science 23: 358-382.
- Caballero S., Jackson J., Mignucci-Giannoni A.A., Barrios-Garrido H., Beltrán-Pedrerros S., Montiel-Villalobos M., Robertson K.M. y C.S. Baker. (2008). Molecular systematics of South American dolphins *Sotalia*: Sister taxa determination and phylogenetic relationships, with insights into a multi-locus phylogeny of the Delphinidae. Molecular Phylogenetics and Evolution 46: 252-268.
- Camus P.A. y M. Lima. (2002). Populations, metapopulations and the open-closed dilemma: the conflict between operational and natural population concepts. Oikos 97: 433-438.
- Caswell H. (2001). Matrix population models. Construction, analysis and interpretation. Segunda Edición. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, 722 pp.

- Cassens I., Van Warebeek K., Best P.B., Crespo E.A. y J. Reyes. (2003). The phylogeography of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*): a critical examination of network methods and rooting procedures. *Molecular Ecology* 12: 1781-1792.
- Cassens I., Van Waerebeek K., Best P.B., Tzika A., Van Helden A.L. Crespo E.A. y M.C. Milinkovitch. (2005). Evidence for male dispersal along the coasts but no migration in pelagic waters in dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Molecular Ecology* 14: 107-121.
- Carreto J.I., Benavides H.R., Negri R.M y R. Akselman. (1985). Toxic dinoflagellate blooms in the Argentine Sea. En Anderson DM, White AW & Badem DG (Eds). *Toxic Flagellates*. Elsevier, New York 174-182 pág.
- Chao A. (1984). Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11:265-270
- Chao A. (1987). Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 43: 783-791
- Choudary M., Strassman J.E., Solís C.R. y D. C. Queller. (1993). Microsatellite variation in social insect. *Biochemical Genetics* 31: 87-96.
- Cipriano F., Hevia M. y M. Iñíguez. (2011). Genetic divergence over small geographic scales and conservation implications for Commerson's dolphins (*Cephalorhynchus commersonii*) in southern Argentina. *Marine Mammal Science* 27: 701–718.
- Clark P.U., Alley R.B. y Pollard D. (1999). Northern hemisphere ice sheet influences on global climate change. *Science*, 286, 1104– 1111.
- Clapham P.J. y D.K. Mattila. (1993). Reactions of humpback whales to skin biopsy sampling on a West Indies breeding ground. *Marine Mammal Science* 9: 382-391.
- Clement M., Posada D. y K.A. Crandall (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657–1659.
- Conover W.J. (1999). *Practical Nonparametric Statistics*. Tercera edición. John Wiley & Sons, Inc., 584 pp.
- Colwell R.K. (2005). EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>.
- Corcuera J., Monzon F., Crespo E.A., Aguilar A. y J.A. Raga. (1994). Interactions between marine mammals and the coastal fisheries of Necochea and Claromecó (Buenos Aires

- Province, Argentina). Gillnets and Cetaceans: Proceedings of the Symposium and Workshop on Mortality of Cetaceans in Passive Fishing Nets and Traps. Report of the International Whaling Commission, Special Issue 15, 283-290.
- Coscarella M.A., Dans S.L. Crespo E.A. y S.N. Pedraza. (2003). Potential impact of dolphin watching unregulated activities in Patagonia. *Journal of Cetacean Research and Management* 5: 77-84.
- Coscarella M.A., Hoelzel A.R., Crespo E.A., Pedraza S.N. y R. Loizaga de Castro. (2008). Identificación Unidades Poblacionales de *Cephalorhynchus commersonii* en el Mar Argentino (Parte II). En libro de resúmenes de la XIII Reunión de Trabajo de especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, 7º Congreso SOLAMAC.
- Crespo E.A. (1991). "Delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus*". In: H.L. Capozzo y M. Junín (eds.): Estado de conservación de los mamíferos marinos del Atlántico Sudoccidental. Informes y estudios del Programa de Mares Regionales del PNUMA, Nairobi, Kenya, No. 138, PNUMA: 42-45.
- Crespo E.A., Corcuera J. y A. Lopez Cazorla. (1994). Interactions between marine mammals and fisheries in some fishing areas of the coast of Argentina. Gillnets and Cetaceans. International Whaling Commission, Special Issue 15: 283-290.
- Crespo E.A., Pedraza S.N., Coscarella M., García N.A. Dans S.L. Iñíguez M., Reyes L.M., Koen Alonso M., Schiavini A.C.M. y R. González. (1997a). Distribution and school size of dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828), in the Southwestern South Atlantic Ocean. Report of the International Whaling Commission 47: 693-697.
- Crespo E.A., Pedraza S.N., Dans S.L., Koen Alonso M., Reyes L.M., Garcia N.A., Coscarella M. y A.C.M. Schiavini. 1997b. Direct and Indirect Effects of the Highseas Fisheries on the Marine Mammal Populations in the northern and central Patagonian Coast. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 22:189-207.
- Crespo E.A., Koen-Alonso M., Dans S.L., García N.A., Pedraza S.N., Coscarella M.A. y R. González (2000). Incidental Catch Of Dolphins In Mid-Water Trawls For Southern Anchovy Off Patagonia. *Journal of Cetacean Research and Management* 2: 11-16.
- Crow J.F. y M. Kimura. (1979). An introduction to population genetics theory. Harper & Row Burgess Publishing Press. New York. 591 pp.

- Cuchi Colleoni A.D. y J.I. Carreto. (2001). Variación estacional de la biomasa fitoplanctónica en el Golfo San Jorge. Resultados de las campañas de investigación: OB-01/00, OB-03/00, OB-07/00, OB-10/00 y OB-12/00. Informe Técnico Interno DNI-INIDEP N°49/00, 30 pp.
- Cypriano-Souza A.L., Fernández G.P., Lima-Rosa C.A.V., Engel M.H y S.L. Bonatto. (2010). Microsatellite Genetic Characterization of the Humpback Whale (*Megaptera novaeangliae*) Breeding Ground off Brazil (Breeding Stock A). *Journal of Heredity* 101: 189–200.
- Dans S.L. (1999a). Ecología Poblacional del Delfín oscuro, *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828) en el litoral Patagónico, Atlántico Sudoccidental. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires, 158pág.
- Dans S.L., Crespo E.A., García N.A., Reyes L.M., Pedraza S.N. y M. Koen Alonso (1997). Incidental mortality of Patagonian dusky dolphins in mid-water trawling: Retrospective effects from the early 1980s. *Report of the International Whaling Commission* 47: 699-703.
- Dans S.L., L.M. Reyes, S.N. Pedraza, J.A. Raga y E.A. Crespo. (1999). Gastrointestinal helminths of the dusky dolphin, *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828), off Patagonia, in the Southwestern Atlantic. *Marine Mammal Science* 15: 649-660.
- Dans S.L., Koen-Alonso M., Crespo E.A., Pedraza S.N. y García N.A. (2003a). Interactions between Marine Mammals and high seas fisheries in Patagonia under an integrated approach.. 100-115 pp. En: *Marine Mammals: Fisheries; Tourism and Management Issues*. Ed. N. Gales, M. Hindell y R. Kirkwood.
- Dans S.L., Koen-Alonso M., Pedraza S.N. y E.A. Crespo. (2003b). Incidental catch of dolphins in trawling fisheries off Patagonia, Argentina: Can populations persist? *Ecological Applications* 13: 754-762.
- Dans S.L., Crespo E.A., Pedraza S.N., Degradi M. y G. V. Garaffo. (2008). Dusky dolphins and tourist interaction: effect on diurnal feeding behavior. . *Marine Ecology Progress Series* 365: 273-285.
- Davis R.W., Ortega-Ortiz J.G., Ribic C.A., Evans W.E., Biggs D.C., Ressler P.H., Cady R.B., Leben R.R., Mullin K.D. y B. Würsig. (2002). Cetacean habitat in the northern oceanic Gulf of Mexico. *Deep Sea Research Parte I* 49:121-142.
- Degrati M., Garaffo G.V, Loizaga de Castro R., Dans S.L. y E.A. Crespo. (2006). Estructura Social de los delfines oscuros (*Lagenorhynchus obscurus*) en el Golfo Nuevo, Patagonia. En libro de

resúmenes de las VI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar y XIV Coloquio Argentino de Oceanografía.

- Degrati M., Dans S.L., Pedraza S.N., Crespo E.A. y G.V. Garaffo. (2008). Diurnal behaviour of dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, in Golfo Nuevo. *Journal of Mammalogy* 89: 1241-1247.
- Dupanloup I., Schneider S. y L. Excoffier. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571–2581.
- Desalle R., Templeton A., Mori I., Pletscher S. y J.S. Johnston. (1987). Temporal and spatial heterogeneity of mtDNA polymorphism in natural populations of *Drosophila mercatorum*. *Genetics* 116:2 15-223. *Genética* 116: 2 15-223.
- DeSalle R. y G. Amato. (2004). The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews* 5: 702-712.
- Desjardins P. y R. Morais. (1990). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology* 212: 599-634.
- Dewoody J.A. y J.C. Avise. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461-473.
- Doolittle D.P. (1987). *Population Genetics: Basic Principles*. Springer-Verlag, Berlín.
- Dowling T.E. y W.M. Brown. (1993). Population structure of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) as determined by restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Marine Mammal Science*, 9: 138-155.
- Duffield D.A. y R.S. Wells. (1991). The combined application of chromosome, protein and molecular data for the investigation of social unit structure and dynamics in *Tursiops truncatus*. *Report of the International Whaling Commission (Special Issue)*, 13, 155-169.
- Earl D.A. y B.M. vonHoldt. (2011). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Eisen J.A. (1999). Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D. B. & Schlöterer, C (eds.). *Microsatellites. Evolution and applications*. Oxford University Press. New York: 34-48.

- Escorza-Trevino S. y A.E. Dizon. (2000). Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology* 9:1049–1060.
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Excoffier L., Smouse P.E. y J.M. Quattro. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier L. (2004). Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13:853–864.
- Excoffier L., Laval G. y S. Schneider. (2005). Arlequin ver 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47–50.
- Fabiani A., Hoelzel A.R. y M.M.C. Muelbert. (2003). Long-Range Paternal Gene Flow in the Southern Elephant Seal. *Science* 299: 676.
- Fair P.A., Adams J., Mitchum G., Hulsey T.C., Reif J.S., Houde M., Muir D., Wirth E., Wetzel D., Zolman E., McFee W. y G.D. Bossart. (2010). Contaminant blubber burdens in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from two southeastern US estuarine areas: concentrations and patterns of PCBs, pesticides, PBDEs, PFCs, and PAHs. *Science of the Total Environment* 408: 1577-1597.
- Falabella, V., Campagna, C., y Croxall, J. (Eds). (2009). Atlas del Mar Patagónico. Especies y Espacios. Buenos Aires, Wildlife Conservation Society y BirdLife International. <http://www.atlas-marpatagonico.org>.
- Falconer D.S. y T.F.C. Mackay (Eds.). (1996). Introduction to quantitative genetics (4th edn.). Longman Group, Londres.
- Falush D., Stephens M. y J.K. Pritchard. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567–1587.
- Feijoo M., Lessa E.P., Loizaga de Castro R. y E.A. Crespo. (2011). Mitochondrial and microsatellite assessment of population structure of South American sea lion (*Otaria flavescens*) in the Southwestern Atlantic Ocean. *Marine Biology* 158:1857–1867.
- Ferris S.D., Sage R.D., Prager E.M., Ritte U. y A.C. Wilson. (1983). Mitochondrial DNA evolution in mice. *Genetics* 105, 681-721.

- Fontaine M.C., Baird S.J., Piry S., Ray N., Tolley K.A., Duke S., Birkun A. Jr., Ferreira M., Jauniaux T., Llavona A., Oztu Oztürk B., Oztürk A., Ridoux V., Rogan E., Sequeira M., Siebert U., Vikingsson G.A., Bouquegneau J.M., Michaux J.R. (2007). Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. *BMC Biology* 5:30.
- Forbes S.H., Hogg J.T., Buchanan F.C., Crawford A.M. y F.W. Allendorf. (1995). Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. *Molecular Biology and Evolution* 12: 1106- 1113.
- Fossi M.C., Marsili L., Casini S., Bearzi G., E. Politi, Zaradelli M. y S. Panigada. (2000). Skin biopsy of Mediterranean cetaceans for the investigation of interspecies susceptibility to xenobiotic contaminants. *Marine Environmental Research* 50: 517-521.
- Frankham R. (1996). Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, 10, 1500–1508.
- Frankham R., Ballou J.D. y D.A. Briscoe. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Freilich S.Y. (2004). *Genetic Diversity and Population Genetic Structure in the South American Sea Lion (*Otaria flavescens*) from Argentina and the Falkland Islands*. Tesis de Maestría, University of Durham, Durham, UK, 111pp.
- Fu Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Fullard K., Early G., Heide-Jorgensen M., Bloch D., Rosing-Asvid A. y W. Amos. (2000). Population structure of long-finned pilot whales in the North Atlantic: a correlation with sea surface temperature? *Molecular Ecology* 9: 949–958.
- Gagliardini D.A. y A. Rivas. (2004). Environmental characteristics of San Matías Gulf obtained from LANDSAT/TM and ETM+ data. *Gayana* 68:186-193.
- Gagliardini D.A., Amoroso R.O., Dell'Arciprete P., Yorio P. y J.M. Orensans. (2004). Detection of small-scale coastal oceanographic processes through landsat-tm/etm+images: implications for the study of biological processes along the patagonian coasts of Argentina. *Gayana* 68:194-200.

- García-Martínez J., Barrio E., Raga J.A. y A. Latorre. (1995). Mitochondrial DNA variability of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) in the Spanish Mediterranean Sea. *Marine Mammal Science*, 11: 185-199.
- Garaffo G.V., Loizaga de Castro R., Degradi M., Dans S.L. y E.A. Crespo. (2006). Residencia de delfines oscuros (*Lagenorhynchus obscurus*) en el área de Península Valdés. En libro de resúmenes de las VI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar y XIV Coloquio Argentino de Oceanografía.
- Garrafo G.V., Dans S.L., Crespo E.A., Pedraza S.N. y Degradi M. (2007). Habitat use of dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, in summer and autumn in Golfo Nuevo, Argentina. *Marine Biology* 152:165–177.
- Garaffo G.V., Dans S.L., Crespo E.A., Degradi M., Giudici P. y D.A. Gagliardini. (2010). Dusky dolphin: modeling habitat selection. *Journal of Mammalogy* 91:54–65.
- Garaffo G.V., Dans S.L., Pedraza S.N., Degradi M., Schiavini A., González R. y E.A. Crespo. (2011). Modeling habitat use for dusky dolphin and Commerson's dolphin in Patagonia. *Marine Ecology Progress Series* 421: 217–227.
- Gauthier J. y R. Sears. (1999). Behavioral response of four species of balaenopterid whales to biopsy sampling. *Marine Mammal Science* 15: 85-101.
- Goldstein D.B., Ruiz A., Cavalli-Sforza L.L. y Feldman M.W. (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.
- González E.G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59: 377-388.
- Goodall R.N.P. (1989). The lost whales of Tierra del Fuego. *Oceanus* 32: 89-95.
- Goodall R.N.P, de Haro J.C., Fraga F., Iñíguez M.A. y K.S. Norris. (1997). Sightings and behavior of Peale's dolphins, *Lagenorhynchus australis*, with notes on the dusky dolphin, *L. obscurus*, off southernmost South America. *Report of the International Whaling Commission* 47: 757-775.
- Gorgone A.M., Haase P.A., Griffith E.S. y A.A. Hohn. (2008). Modeling Response of Target and Nontarget Dolphins to Biopsy Darting. *Journal of Wildlife Management* 72: 926-932.
- Grant, W.S. y B.W. Bowen. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89:415-426.

- Grant S.W. y B.W. Bowen. (2006). Living in a tilted world: climate change and geography limit speciation in Old World anchovies (*Engraulis*: *Engraulidae*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 88: 673-689.
- Green M.L., Herzing D.L. y J.D. Baldwin. (2007). Noninvasive methodology for the sampling and extraction of DNA from free-ranging Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*). *Molecular Ecology Notes* 7: 1287–1292.
- Greenwood P.J. (1980). Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behavior* 28:1140–1162
- Guerrero R.A. y Piola A.R. (1997). Masas de agua en la plataforma continental. En: Boschi E. (ed.) *El Mar Argentino y sus Recursos Pesquero*, Tomo I: Antecedentes históricos de las exploraciones en el mar y las características ambientales. INIDEP, Mar del Plata, Argentina, 107-119.
- Guerrero R.A., Acha E.M., Framiñan M.B. y C.A. Lasta. 1997. Physical oceanography of the Río de la Plata estuary, Argentina. *Continental Shelf Research* 17: 727-742.
- Guerrero R.A. 1998. Oceanografía física del estuario del Río de la Plata y el sistema costero de El Rincón. En: Lasta C. (ed.). *Resultados de una campaña de evaluación de recursos demersales costeros de la Provincia de Buenos Aires y del litoral uruguayo*. Noviembre, 1994. INIDEP Informe Técnico 21, 29-54 pág.
- Guo S.W. y E.A. Thompson. (1992) Performing the exact test for Hardy Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometric* 48:361–372.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95–98.
- Hammond P.S., Bearzi G., Bjørge A., Forney K., Karczmarski L., Kasuya T., Perrin W.F., Scott M.D., Wang J.Y., Wells R.S. yB. Wilson. (2008). *Lagenorhynchus obscurus*. En: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 10 November 2010.
- Hancock J.M. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein D.B. y Schlöterer C. (eds.). *Microsatellites Evolution and applications*. Oxford University Press. New York: 1-9.
- Haney R.A., Silliman B.R., Fry A.J., Layman C.A., Rand D.M. (2007). The Pleistocene history of the sheepshead minnow *Cyprinodon variegatus*: non-equilibrium evolutionary

- dynamics within a diversifying species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43:743–754.
- Hansen J.E., Martos P. y A. Madirolas. (2001). Relationship between spatial distribution of the Patagonian stock of Argentine anchovy, *Engraulis anchoita*, and sea temperatures during late spring to early summer. *Fisheries Oceanography* 10:193–206.
- Hanski I. y O.E. Gaggiotti (Eds). (2004). *Ecology, genetics and evolution of metapopulations*. 696pp. Elsevier-Academic Press, San Diego.
- Harlin A.D., Würsig B., Baker C.S. y T.M. Markowitz. (1999). Skin swabbing for genetic analysis: Application to dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Marine Mammal Science* 15: 409–425.
- Harlin A.D., Markowitz T., Baker C.S., Würsig B. y R.L. Honeycutt. (2003). Genetic structure, diversity, and historical demography of New Zealand's dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*). *Journal of Mammalogy* 84: 702–717.
- Harlin-Cognato A.D. y R.L. Honeycutt. (2006). Multi-locus phylogeny of dolphins in the subfamily Lissodelphininae: character synergy improves phylogenetic resolution. *BMC Evolutionary Biology*, 6: 1-16.
- Harlin-Cognato A.D., Markowitz T., Würsig B., Honeycutt R.L. (2007). Multi-locus phylogeography of the dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*): passive dispersal via the west-wind drift or response to prey species and climate change? *BMC Evolutionary Biology* 7: 131.
- Hartl D.L. (1988). *A Primer of Population Genetics* (2nd edn.). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hayano H., Yoshioka M., Tanaka M. y M. Amano. (2004). Population differentiation in the pacific white-sided Dolphin *Lagenorhynchus obliquidens* inferred from mitochondrial DNA and microsatellite analyses. *Zoologica Science* 21:989–999.
- Hedrick P.W. (1985). *Genetics of Populations*. Jones and Barlett Publishers, Boston, MA.
- Hedrick P.W. (2001). Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution* 16: 629-636.
- Hein J., Schierup M.H., y C. Wiuf. (2004). *Gene Genealogies, Variation and Evolution: A Primer in Coalescent Theory*. Oxford University Press, Oxford. 276 pp.

- Hewitt G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biol J Linn Soc* 58:247–276.
- Hewitt G.M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907–913
- Ho S.W. y B. Shapiro. (2011). Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology* 11:423-434.
- Hoelzel A.R. y G.A. Dover. (1988). Molecular techniques for examining genetic variation and stock identity in cetacean species. Report International Whaling Commission (Special issue) 11:81–120.
- Hoelzel A.R. (1989). Territorial behaviour of the European robin; the importance of vegetation density. *Ibis*, 131: 432-436.
- Hoelzel A.R. y G.A. Dover. (1991). Genetic differentiation between sympatric killer whale populations. *Heredity* 66:191–195.
- Hoelzel, A. R. and Dover, G. A. (1991a) *Molecular genetic ecology*. Oxford: Oxford UP.
- Hoelzel A.R., Hancock J.A. y G.A. Dover. (1991). Evolution of the Cetacean Mitochondrial D-Loop Region. *Molecular Biology and Evolution* 8: 475-493.
- Hoelzel A.R., Halley J., O'Brien S.J., Campagna C., Arnbom T., Le Boeuf B., Rails K., y G.A. Dover.(1993). Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. *Journal of Heredity* 84: 443-449.
- Hoelzel A.R., Dalheim M., y Stern S.J. (1998a). Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the eastern North Pacific and genetic differentiation between foraging specialists. *Journal of Heredity*, 89: 121-128.
- Hoelzel A.R. (1998b). Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages, implications for conservation policy. *Journal of Heredity*, 89: 451-458.
- Hoelzel A.R. (1998c). *Molecular Analysis of Populations: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Hoelzel A.R., Le Bouef B.J., Campagna C. y J. Reiter. (1999). Alpha male paternity in elephant seals. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 46: 298-306.
- Hoelzel A.R., Campagna C. y T. Arnbom. (2001). Genetic and morphometric differentiation between island and mainland southern elephant seal populations. *Proceedings of the Royal Society B* 268: 325-332, doi: 10.1098/rspb.2000.1375.

- Hooker S.K., Baird R.W., Al-Omari S., Gowans S. y H. Whitehead. (2001). Behavioral reactions of northern bottlenose whales (*Hyperoodon ampullatus*) to biopsy darting and tag attachment. *Fishery Bulletin* 99: 303–308.
- Hubisz M.J., Falush D., Stephens M. y J.K. Pritchard. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322–1332.
- IGM (1998). *Atlas Geográfico de la República Argentina*. Buenos Aires: Instituto Geográfico Militar.
- Isla F.I. y C.A. Lasta. (2007). *Manual de Manejo Costero para la Provincia de Buenos Aires*. Editorial Universidad Nacional de Mar del Plata – IDRC – EUDEM. I.S.B.N: 9789875441828. 280 pág.
- Jefferson T.A., Leatherwood S. y M.A. Webber. (1993). *FAO Species identification guide. Marine mammals of the world*. UNEP/FAO, Rome, 320 pp.
- Jefferson T.A. y S.K. Hung. (2008). Effects of biopsy sampling on Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) in a polluted coastal environment. *Aquatic Mammal* 34: 310–316.
- Kashi Y., King D. y M. Soller. (1997). Simple repetitive DNA sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics*, 13: 74-78.
- Kashi Y. y M. Soller. (1999). Functional roles of microsatellites and minisatellites. En: Goldstein D.B y Schlöterer C. (eds.). *Microsatellites. Evolution and applications*. Oxford University Press. New York: 10-23.
- Keller L.F., Jeffery K.J., Arcese P., Beaumont M.A., Hochachka W.M., Smith J.N.M. y M.W.Bruford. (2001). Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 1387-1394.
- Kimura M. (1953). "Stepping stone" model of population. *Annual Report of the National Institute Genetics, Japan* 3: 63-65.
- Kimura M. y J.F. Crow. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.
- Kimura M. (1971). Theoretical foundation of population genetics at the molecular level. *Theoretical Population Biology* 2: 174-208.

- Kimura M. y T. Ohta. (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 75: 2868-2872.
- Kimura M. y G. H. Weiss. (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 461-576.
- Kiszka J.J., Simon-Bouhet B., Charlier F., Pusineri C. y V. Ridoux. (2010). Individual and group behavioural reactions of small delphinids to remote biopsy sampling. *Animal Welfare* 19: 411-417.
- Kiszka J.J., Simon-Bouhet B., Martinez L., Pusineri C., Richard P. y V. Ridoux . (2011). Ecological niche segregation within a community of sympatric dolphins around a tropical island. *Marine Ecology Progress Series* 433: 273-288.
- Koen Alonso M., Crespo E.A., García N.A., Pedraza S.N. y M.A Coscarella. (1998). Diet of dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, in waters off Patagonia, Argentina. *Fishery Bulletin* 96: 366-374.
- Krepper C.M. y A.L. Rivas. (1979). Análisis de las características oceanográficas de la zona austral de la plataforma continental argentina y aguas adyacentes. *Acta Oceanográfica Argentina* 2: 55-82.
- Kruglyak S., Durrett R.T., Chung M.D. y C.F. Aquadro. (1998). Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 10774 -10778.
- Krützen M., Barré L.M., Möller L.M., Heithaus M.R., Simms C. y W. B. Sherwin. (2002). A biopsy system for small cetaceans: darting success and wound healing in *Tursiops* spp. *Marine Mammal Science* 18: 863-878.
- Krützen M., Sherwin W.B., Berggren P. y N. Gales. (2004). Population structure in an inshore cetacean revealed by microsatellite and mtDNA analysis: bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) in Shark Bay, Western Australia. *Marine Mammal Science* 20: 28–47.
- Kumar S., Tamura K. y M. Nei. (2004). MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150–163.
- L'Abbé D., Duhaime J.F., Lang B.F. y R. Morais. (1991). The transcription of DNA in chicken mitochondria initiates from one major bidirectional promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 266:10844–10850.

- Lagercrantz U., Ellegren H. y L. Andersson. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 21: 1111-1115.
- Lambertsen R.H. (1987). A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. *Journal of Mammalogy* 68: 443-445.
- Larkin, M.A. y col. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics*. Bd. 23, S. 2947-2948.
- Lázaro M., Lessa E.P. y H.Hamilton. (2004) . Geographic genetic structure in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Marine Mammal Science* 20:201-214.
- Leatherwood S. y Reeves R.R. (1983). *The Sierra Club Handbook of Whales and Dolphins*. Sierra Club Books, San Francisco, CA .
- LeDuc R.G., Perrin W.F. y A.E.Dizon (1999). Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. *Marine Mammal Science* 15: 619-648.
- LeDuc R.G. (2009). Delphinids, overview. En: *Encyclopedia of Marine Mammals* (eds Perrin WF, Wu rsig B and Thewissen JGM), pp. 298–302. Academic Press, New York.
- Levin D.A. (1981). Dispersal versus gene flow in plants. *Annals of Missouri Botanical Garden* 68:233-253.
- Levinson G. y G.A. Gutman. (1987). High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* 15:5323–5338.
- Li Y.C., Abraham B.K., Fahima T., Avigdor B. y Nevo E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.
- Lichter A.A. y A. Hooper. (1984). *Guía para el reconocimiento de los cetáceos del Mar Argentino*. Fundación Vida Silvestre, Buenos Aires, Argentina. 96pp.
- Lichter A.A. (1986). Avistaje y reconocimiento de cetáceos en el mar argentino y la Antártida. Enero/Febrero 1984. *Actas de la I Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur*, Buenos Aires, Argentina 147-156.
- Loizaga de Castro R., Degradi M., Garaffo G.V., Dans S.L. y E.A. Crespo. (2006). Potencialidad de la técnica de fotoidentificación para la estimación de abundancia del delfín

oscuro (*Lagenorhynchus obscurus*) en los Golfos Norpatagónicos. Libro de resúmenes de VI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar y XIV Coloquio Argentino de Oceanografía.

Loizaga de Castro, R., Martinazzo L.B., Hoelzel A.R. y E.A. Crespo. (2012). Phylogeography and Demographic History of the dusky dolphin, *Lagenorhynchus obscurus*. XV Reunión de Trabajo de especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, 9º Congreso SOLAMAC. Puerto Madryn, Argentina.

Louge E.B., Reta R. y B.A. Santos. (2001). Análisis de la temperatura y de la salinidad en el área de cría de merluza (*Merluccius hubbsi*) (Enero 1995- Enero 2001). Informe Técnico Interno. DNI INIDEP N°47/01, 17 pp.

Lusqueños A. y A.J. Valdez. (1971). Aportes al conocimiento de las masas de agua del Atlántico Sudoccidental. Servicio de Hidrografía Naval, Buenos Aires H659, 48 pp.

Mann J. (1999). Behavioral Sampling Methods for Cetaceans: a review and critique. Marine Mammal Science 15:102-122.

Mantel N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res 27:209–220.

Martin A.R. y R.R.Reeves. (2002). Diversity and zoogeography. In: Hoelzel R (ed) Marine mammal biology—an evolutionary approach, pp 1–37.

May-Collado L. y I. Agnarsson. (2006). Cytochrome b and Bayesian inference of whale phylogeny. Molecular Phylogenetics and Evolution 38: 344–354.

Mazio C. y C. Vara. (1983). Las mareas del Golfo San Matías, Argentina. Informe Técnico del SHN, Dpto. Oceanografía: 67pp.

McFadden C.J. (2003). Behavioral flexibility of feeding dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) in Admiralty Bay, New Zealand. Tesis de Maestría, Texas A&M University, College Station. 81pp.

Mendez M., Rosenbaum H.C. y P. Bordino. (2008). Conservation genetics of the franciscana dolphin in Northern Argentina: population structure, by-catch impacts, and management implications. Conservation Genetics 9: 419-435.

Mendez M., Rosenbaum H.C., Subramaniam A., Yackulic C. y P. Bordino. (2010a). Isolation by environmental distance in mobile marine species: molecular ecology of franciscana dolphins at their southern range. Molecular Ecology 19: 2212-2228.

- Mendez M., Rosenbaum H.C., Wells R.S, Stamper A. y P. Bordino. (2010b). Genetic evidence highlights potential impacts of by-catch to cetaceans. *Plos One* 5: 1-7.
- Mercer J.H. (1976). Glacial history of southernmost South America. *Quaternary Research* 6:125–166
- Mianzán H.W., Lasta C.A., Acha E.M., Guerrero R.A., Macchi G.J. y C. Bremen. (2001). The Río de la Plata estuary, Argentina e Uruguay. En: Seeliger, U., de Lacerda, L.D., Kjerfve, B. (Eds.), *Ecological Studies: Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. Springer-Verlag, Berlin, 186-204.
- Milinkovitch M. C. (1994). Exfoliated cells ad the most accessible DNA source for captive whales and dolphins. *Marine Mammal Science* 10: 125-128.
- Mills L.S. y F.W. Allendorf. (1996). The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology* 10: 1509–1518.
- Mitchell E. (1975). Porpoise, dolphin and small whale fisheries of the world: status and problems. *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources Monograph* 3: 1–129.
- Möller L.M. y L.B. Beheregaray. (2001). Coastal bottlenose dolphins from Southeastern Australia are *Tursiops truncatus* according to sequences of the mitochondrial DNA control region. *Marine Mammal Science* 17: 249–263.
- Möller L.M. y L.B. Beheregaray. (2004). Genetic evidence for sex-biased dispersal in resident bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Molecular Ecology* 13: 1607–1612.
- Möller L.M., Bilgmann K., Charlton-Robb K. y L. Beheregaray. (2008). Multi-gene evidence for a new bottlenose dolphin species in southern Australia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 674–681.
- Moritz C. (2002). Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systems Biology* 51: 238-254.
- Mouzo F.H., Garza M.L., Izquierdo J.F. y R.O. Zibecchi (1978). Rasgos de la geología submarina del Golfo Nuevo. *Acta Oceanográfica Argentina*, 2.
- Natoli A., Peddemors V.M. y A.R. Hoelzel. (2004). Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 363–375.

- Natoli A., Birkun A., Aguilar A., López A. y A.R. Hoelzel (2005). Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). Proceedings of the Royal Society B 272: 1217–1226.
- Natoli A., Cañadas A., Peddemors V.M., Aguilar A., Vaquero C., Fernández-Piqueras C. y A.R. Hoelzel. (2006). Phylogeography and alpha taxonomy of the common dolphin (*Delphinus sp.*). Journal of Evolutionary Biology 19: 943–954.
- Natoli A., Cañadas A., Vaquero C., Politi E., Fernández-Navarro P. y A.R. Hoelzel. (2008). Conservation genetics of the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) in the Mediterranean Sea and in the eastern North Atlantic Ocean. Conservation Genetics 9: 1479-1487.
- Nei M. (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, Nueva York, Nueva York.
- Nei M. y S. Kumar. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford: Oxford UP.
- Neff B.D. y M.R. Gross. (2001). Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. Evolution, 55: 1717-1733.
- Norris K.S. (1961). Standardized methods for measuring and recording data on the smaller cetaceans. Journal of Mammalogy 42: 471–476.
- Norris K.S. y T.P. Dohl. (1980). Behavior of the Hawaiian spinner dolphin, *Stenella longirostris*. Fishery Bulletin 77:821–849.
- Ohta T. y M. Kimura. (1973). A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. Genetics Research 22: 201-204.
- Page R.D.M. y Holmes E.C. (1998) Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach. Blackwell Science, Oxford, U.K.
- Palsbøll P.J., F. Larsen y E.S. Hansen. (1991). Sampling of skin biopsies from free-ranging cetaceans in west Greenland: Development of new biopsy tips and bolt designs. En A. R. Hoelzel & G. P. Donovan, edt. Genetic ecology of whales and dolphins. The International Whaling Commission, Cambridge. Special Issue 13: 71-89
- Palsbøll P.J., Bérubé M., Larsen A.H. y H. Jørgensen. (1997). Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales. Molecular Ecology 6: 893-5.

- Parsons K.M., J.F. Dallas, D.E. Claridge, J.W. Durban, K.C. Balcomb, P.M. Thompson y L. R. Noble. (1999). Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. *Molecular Ecology* 8: 1766-1768.
- Parsons K. M., Duban J.W. y D.E. Claridge. (2003). Comparing two alternative methods for sampling small cetaceans for molecular analysis. *Marine Mammal Science* 19: 224-231.
- Pastene L.A., Goto M., Kanda N., Zerbini A.N., Kerem D., Watanabe K., Bessho Y., Hasegawa M., Nielsen R., Larsen F. y P.J. Palsbøll. (2007). Radiation and speciation of pelagic organisms during periods of global warming: the case of the common minke whale, *Balaenoptera acutorostrata*. *Molecular Ecology* 16: 1481–1495.
- Pastene L.A., Acevedo J., Goto M., Zerbini A.N., Acuña P. y A. Aguayo-Lobo. (2009). Population structure and possible migratory links of common minke whales, *Balaenoptera acutorostrata*, in the Southern Hemisphere. *Conservation Genetics* 11: 1553-1558.
- Patenaude N.J. y B.N. White. (1995). Skin biopsy sampling of beluga whale carcasses: Assessment of biopsy darting factors for minimal wounding and effective sample retrieval. *Marine Mammal Science* 11: 163-171.
- Patenaude N.J., Portway V.A., Schaeff C.M., Bannister J.L., Best P.B., Payne R.S., Rowntree V.J., Rivarola M., Baker C.S. (2007). Mitochondrial DNA diversity and population structure among Southern right whales (*Eubalaena australis*). *Journal of Heredity* 98:147–157.
- Paul A. y C. Schafer-Neth. (2003). Modeling the water masses of the Atlantic Ocean at the Last Glacial Maximum. *Paleoceanography* 18:3.1-3.26.
- Pearson C.E. y Sinden R.R. (1998a). Slipped strand DNA, dynamic mutations and human disease. In Wells, R.D. and Warren, S.T. (eds), *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases*. Academic Press, San Diego, CA, 585-621 pp.
- Pearson C.E. y R.R. Sinden. (1998b). Trinucleotide repeat DNA structures: dynamic mutations from dynamic DNA. *Current Opinion in Structural Biology* 8: 321-330.
- Petruska J., Hartenstine M.J. y M.F. Goodman. (1998). Analysis of strand slippage in DNA polymerase expansions of CAG/CTG triplet repeats associated with neurodegenerative disease. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 5204-5210.
- Pichler F.B., Dawson S.M., Slooten E. y C.S. Baker. (1998). Geographic isolation of Hector's dolphin populations described by mitochondrial DNA sequences. *Conservation Biology* 12:1–8.

- Pichler F.B. y C.S. Baker. (2000). Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. *Proceeding of the Royal Society, London B*, 267: 97–102.
- Pichler F.B., Robineau D., Goodall R.N.P., Meÿer M.A., Olavarría C. y C.S. Baker. (2001). Origin and radiation of southern hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). *Molecular Ecology*, 10, 2215-2223.
- Pimper L.E., Remis M.I., Goodall R.N.P. y C.S. Baker. (2009). Teeth and Bones as Sources of DNA for genetic diversity and sex identification of Commerson's Dolphins (*Cephalorhynchus commersonii*) from Tierra del Fuego, Argentina. *Aquatic Mammals* 35: 330-333.
- Pimper L.E., Baker C.S., Goodall R.N.P., Olavarría C. y M.I. Remis (2010). Mitochondrial DNA variation and population structure of Commerson's dolphins (*Cephalorhynchus commersonii*) in their southernmost distribution. *Conservation Genetics* 11: 2157-2168.
- Pimper L.E., Goodall R.N.P. y M.I. Remis. (2012). First mitochondrial DNA analysis of the spectacled porpoise (*Phocoena dioptrica*) from Tierra del Fuego, Argentina. *Mammalian Biology* doi:10.1016/j.mambio.2012.02.002.
- Piola A. R. y L. Scasso. (1988). Circulación en el Golfo San Matías. *Geoacta* 15:33-51.
- Piola A. (2008a). Bahía Blanca. Atlas de Sensibilidad Ambiental de la Costa y el Mar Argentino. Mapas de Temperatura superficial del Mar. <<http://atlas.ambiente.gov.ar>>.
- Piola A. (2008b). Bahía Blanca. Atlas de Sensibilidad Ambiental de la Costa y el Mar Argentino. Mapas de Salinidad superficial media anual del mar. <<http://atlas.ambiente.gov.ar>>.
- Posada D. y K.A. Crandall. (2001). Intraspecific gene genealogies: tress grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* 16:37-45.
- Pastene L.A., Goto M., Kanda N., Zerbini A.N., Kerem D., Watanabe K. y col. (2007) Radiation and speciation of pelagic organisms during periods of global warming: the case of the common minke whale, *Balaenoptera acutorostrata*. *Molecular Ecology* 16: 1481–1495.
- Pritchard J.K., Stephens M. y P. Donnelly (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Primmer C.R., Raudsepp T., Chowdhary B.P., Møller A.P. y H. Ellegren. (1997). A low frequency of microsatellite in the avian genome. *Genome Research* 7: 471-482.

- Quérrouil S., Silva M.A., Freitas L., Prieto R., Magalhães S., Dinis A., Alves F., Matos J.A., Mendonça D., Hammond P. y R.S. Santos. (2007). High gene flow in oceanic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) of the North Atlantic. *Conservation Genetics* 8: 1405–1419.
- Quérrouil S., Freitas L., Dinis A., Alves F., Cascão I., Prieto R., Silva M.A., Magalhães S., Matos J.A. y R.S. Santos. (2010). Sex bias in biopsy samples collected from free-ranging dolphins. *European Journal of Wildlife Research* 56: 151–158.
- Ramos-Onsins, S.E. y J. Rozas. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19:2092-2100.
- Rassmann K., Schlöterer C. y D. Tautz. (1991). Isolation of simple sequence loci for use in polymerasa chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12: 113-118.
- Ray N., Currat M. y L.Excoffier (2003). Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. *Molecular Biology and Evolution* 20:76–86.
- Reeb C.A. y J.C. Avise. (1990). A genetic discontinuity in a continuously distributed species - mitochondrial-DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics* 124:397–406.
- Reeves, R.R., B.D. Smith, E.A. Crespo and G. Notarbartolo di Sciara. (2003). Dolphins, Whales and Porpoises: 2002-2010 Conservation Action Plan for the World's Cetaceans. IUCN/SSC Cetacean Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 139 pp.
- Reta R. (1986). Aspectos oceanográficos y biológicos- pesqueros del Golfo San Jorge. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad del Sur, 133 pp.
- Riesberg L.H. y J.M. Burke. (2001). The biological reality of species: gene flow, selection and collective evolution. *Taxon* 50:235-255.
- Robineau D., Goodall R.N.P., Pichler F.B. y C.S. Baker. (2007). Description of a new subspecies of Commerson's dolphin, *Cephalorhynchus commersonii* (Lacépede, 1804), inhabiting the coastal waters of the Kergüelen Islands. *Mammalia* 71:172–180.
- Rogers A.R. y H. Harpending. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552–569.
- Rogers A. (1995). Genetic evidence for a Pleistocene population explosion, *Evolution* 49: 608–615.
- Romero M.A., Dans S.L., García N.A., Svendsen G., González R. y E.A. Crespo. (2012). Feeding habits of two sympatric dolphin species off North Patagonia, Argentina. *Marine Mammal Science* 28: 364–377.

- Rooney A.P., Merritt D.B. y Derr J.N. (1999). Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Heredity* 90: 228-231.
- Rosa S., Milinkovitch M.C., Van Waerebeek K., Berck J., Oporto J., Alfaro-Shigueto J., Van Bresselem M.F., Goodall N. y I. Cassens. (2005). Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among South American Burmeister's porpoises (*Phocoena spinipinnis*). *Conservation Genetics* 6: 431-443.
- Rozas J., Sánchez-Del Barrio J.C., Messeguer X. y R. Rozas. (2003). DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Sabatini M. (2004). Características ambientales, reproducción y alimentación de la merluza (*Merluccius hubbsi*) y la anchoita (*Engraulis anchoita*) en su hábitat reproductivo patagónico. Síntesis y Perspectivas. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* 16:5-25.
- Saccheri I.J. y M.W. Bruford. (1993). DNA fingerprinting in a butterfly *Bicyclus anynana* (Satyridae). *Journal of Heredity* 84: 195-200.
- Saiki R.K., Gelfond D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. y H.A. Erlich (1998). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Schneider S., Roessli D. y L. Excoffier. (2000). Arlequin ver 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Schiavini A., Pedraza S.N., Crespo E.A. González R. y S.L. Dans (1999). Abundance of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) off north and central Patagonia, Argentina, in spring and a comparison with incidental catch in fisheries. *Marine Mammal Science* 15: 828-840.
- Schlöterer C. y D. Tautz (1992). Slippage synthesis of microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 20: 211-215.
- Schonewald-Cox C.M., Chambers S.M., MacBryde B. y W.L. Thomas (eds). (1983). Genetics and conservation: a reference manual for managing wild animal and plant populations. Menlo Park, California: Benjamin/Cummings.
- Schug M.D., Mackay T.F.C. y C.F. Aquadro. (1997). Low mutation rate of microsatellites in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics* 15: 99-102.

- Scribner K.T. y J.M. Pearce. (2000). Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. In: A. Barker (Ed.). *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science Limited. London: 235-271.
- Secchi E.R., Wang J.Y., Murray B.W., Rocha-Campos C.C. y B.N.White. (1998). Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Canadian Journal of Zoology* 76: 1622-1627.
- Secchi E.R., Danilewicz D., Ott P.H. (2003). Applying the phylogeographic concept to identify Franciscana dolphin stocks: implications to meet management objectives. *Journal of Cetacean Research and Management* 5: 61-68.
- Shane SH, Wells R, Würsig B. (1986) Ecology, behavior, and social organization of the bottlenose dolphin, a review. *Marine Mammal Science*, 2, 34-63.
- Sibly R.M., Meade A., Boxal N., Wilkinson M., Corne D. W.y J.C. Whittaker (2003). The structure of interrupted human AC microsatellites. *Molecular Biology and Evolution* 20: 453-459.
- Siegel S. y N.J. Castellan, (1995). *Estadística no Paramétrica aplicada a la ciencia de la conducta*. Cuarta edición, 437 pp.
- Slade R.W., Moritz C., Hoelzel A.R. y H.R. Burton. (1998). Molecular Population Genetics of the Southern Elephant Seal, *Mirounga leonina*. *Genetics* 149: 1945–1957.
- Slatkin M. (1985). Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematic* 16: 393-430.
- Slatkin M. y R.R. Hudson. (1991). Pairwise comparison of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing population. *Genetics* 129: 555-562.
- Slatkin M. (1994). Gene flow and population structure. En: *Ecological Genetics* (Ed Real LA). Pp. 3-18. Princeton University Press.
- Slater G.J., Price S.A., Santini F., Alfaro M.E. (2010). Diversity versus disparity and the radiation of modern cetaceans. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 277, 3097–3104.
- Smolker R.A., Richards A.F., Connor R.C. y J.W. Pepper. (1992). Sex differences in patterns of association among Indian Ocean bottlenose dolphins. *Behaviour* 123:38–69.

- Soulé M.E. (1980). Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. En "Conservation Biology: An Ecological-Evolutionary Perspective", ed. M.E. Soulé & B.A. Wilcox. Sinauer Associates, Sunderland, 151-169 pp.
- Soulé M.E. (1986a). Conservation Biology and the "real world". En "Conservation Biology: The science of scarcity and diversity", ed. M.E. Soulé. Sinauer Associates, Sunderland, 1-12 pp.
- Soulé M.E. (Ed.). (1986b). Conservation Biology: The science of scarcity and diversity. Sinauer Associates, Sunderland.
- Soulé, M.E. (Ed.). (1987). Viable Populations for Conservation. Cambridge University Press.
- Stevick P.T., Allen J., Clapham P.J., Katona S.K., Larsen F., Lien J., Mattila D.K., Palsbøll P.J., Sears R., Sigurjonsson J., Smith T.D., Vikingsson G., Oien N. y Hammond P.S. (2006) Population spatial structuring on the feeding grounds in North Atlantic humpback whales. *Journal of Zoology (Londres)* 270:244–255.
- Strand M., Prolla T.A., Liskay, R.M. y T.D. Petes. (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutation affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-276.
- Szapkievich V.B., Capozzo H.L., Crespo E.A., Bernabeu R.O., Comas C. y M. Mudry (1999). Genetic relatedness in two southern sea lion (*Otaria Flavescens*) rookeries in the southwestern Atlantic. *Mammalian Biology* 54: 246-250.
- Tagliorette A. y P. Losano (1996). Demanda turística en áreas costeras protegidas de la Patagonia. Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica. GEF/PNUD, WCS/FPN, Informe técnico N° 25: 1-29.
- Taguchi M., Chivers S.J., Rosel O.E., Matsuishi T., Abe S. (2010). Mitochondrial DNA phylogeography of the harbour porpoise *Phocoena phocoena* in the North Pacific. *Marine Biology*, 157, 1489–1498.
- Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.
- Tautz D., Trick M. y G. Dover. (1986). Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652-656.
- Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Tautz D. y C. Schlotterer. (1994). Simple sequences. *Current Opinion in Genetics & Development* 4: 832-837.

- Toonen R.J. y S. Hughes. (2001). Increased throughput for fragment analysis on an ABI 377 automated sequencer using a 100-laser rapid load membrane combination and STRand software. *Bio Techniques* 31: 1320–1324.
- Tóth E., Strassmann J.E., Nogueira-Neto P., Imperatriz-Fonseca V.L. y D. Queller. (2002). Male production in stingless bees: variable outcomes of queen-worker conflict. *Molecular Ecology* 11: 2661-2667.
- Túnez J.I., Centrón D., Cappozzo H.L. y M.H. Cassini. (2007) Geographic distribution and diversity of mitochondrial DNA haplotypes in South American sea lions (*Otaria flavescens*) and fur seals (*Arctocephalus australis*). *Mammalian Biology* 72:193-203.
- Túnez J.I., Cappozzo H.L., Nardelli M. y M.H. Cassini. (2010). Population genetic structure and historical population dynamics of the South American sea lion, *Otaria flavescens*, in north-central Patagonia. *Genetica* 138: 831-841.
- Valsecchi E. y B. Amos. (1996). Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology* 5: 151-156.
- Valenzuela L.O., M. Sironi, V.J. Rowntree y J. Seger. (2009). Isotopic and genetic evidence for culturally inherited site fidelity to feeding grounds in southern right whales (*Eubalaena australis*). *Molecular Ecology* 18: 782-791.
- Van Waerebeek K. (1992a). Records of dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828) in the eastern South Pacific. *Beaufortia* 43: 45–61.
- Van Waerebeek K. (1992b) Population identity and general biology of the dusky dolphin *Lagenorhynchus obscurus* (Gray 1828) in the southeastern Pacific. Tesis doctoral, University of Amsterdam.
- Van Waerebeek K., Reyes J.C. y J. Alfaro. (1993a). Helminth parasites and phoronts of dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828) from Peru. *Aquatic Mammal* 19: 159-169.
- Van Waerebeek K. (1993b). Geographic variation and sexual dimorphism in the skull of the dusky dolphin, *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828). *Fishery Bulletin US* 91: 754–774.
- Van Waerebeek K. (1993c). External features of the dusky dolphin, *Lagenorhynchus obscurus* (Gray 1828) from Peruvian waters. *Estudios Oceanológicos* 12: 37–53.
- Van Waerebeek K. y A. Read. (1994). Reproduction of the dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, from coastal Peru. *Journal of Mammalogy* 75: 1054-1062.

- Van Waerebeek K., Van Bree P.J.H. y P.B. Best. (1995). On the identity of *Prodelphinus petersii* Luetken, 1889 and records of dusky dolphin *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828) from the southern Indian and Atlantic Oceans. *African Journal of Marine Science* 16: 25-35.
- Van Waerebeek K. (2002). Pacific White-Sided Dolphin and Dusky Dolphin *Lagenorhynchus obliquidens* and *Lagenorhynchus obscurus*. In: *Encyclopedia of marine mammals* (Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM, eds.) Academic Press, San Diego, pp. 859-861.
- Van Waerebeek K., Van Bresselem M.F., Felix F., Alfaro Shigueto J., Garcia Godos A., Chavez Lisambart L., Onton K., Montes D. y R. Bello (1997). Mortality of dolphins and porpoises in coastal fisheries off Peru and Southern Ecuador in 1994. *Biological Conservation* 81: 43-49.
- Vucetich J.A. y T.A. Waite. (2000). Is one migrant per generation sufficient for the genetic management of fluctuating populations? *Animal Conservation* 3: 261–266.
- Vuilleumier B.S. (1971). Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science* 173:771–780.
- Walker J.L., Potter C.W. y S.A. Macko. (1999). The diets of modern and historic bottlenose dolphin population reflected through stable isotopes. *Marine Mammal Science* 15: 335-350.
- Waples R.S y O. Gaggiotti. (2006). What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity *Molecular Ecology* 15: 1419–1439.
- Weber J.L. y C. Wong. (1993). Mutation in human short tandem repeat polymorphisms. *Human Molecular Genetic* 2: 1123-1128.
- Weinrich M.T., Lambertsen R.H., Baker C.S., Schilling M.R. y C.R. Belt. (1991). Behavioral responses of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the southern gulf of Maine to biopsy sampling. En A. R. Hoelzel and G. P. Donovan, editores. *Genetic ecology of whales and dolphins*. The International Whaling Commission, Cambridge. Special Issue 13: 91–97.
- Weinrich M.T., Lambertsen R.H., Belt C.R., Schilling M.R., Iken H.J. y S.E. Syrjala. (1992). Behavioral reactions of humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, to biopsy procedures. *Fishery Bulletin* 90: 588-598.
- Weinrich M.T., Rosenbaum H., Baker C., Blackmer A.L. y H. Whitehead. (2006). The influence of maternal lineages on social affiliations among humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on their feeding grounds in the southern gulf of Maine. *Journal of Heredity* 97:226– 234.

- Weir B.S. y C.C Cockerham. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.
- Wells R.D. (1996). Molecular basis of genetic instability of triplet repeats. *Journal of Biological Chemistry* 271: 2875-2878.
- Weller D.W., Cockcroft V.G., B. Würsig, Lynn S.K. y D. Fertl. (1997). Behavioural responses of bottlenose dolphins to remote biopsy sampling and observations of surgical biopsy wound healing. *Aquatic Mammals* 23: 49-58.
- Whitlock M.C. y D.E. McCauley. (1999). Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal to $1/(4Nm + 1)$. *Heredity* 82:117-25.
- Wright S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28:114-138.
- Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.
- Wright S. (1969). *Evolution and Genetics of Populations, vol.2. The theory of gene frequencies.* University of Chicago Press, Chicago
- Würsig B. y M. Würsig. (1980) Behaviour and ecology of the dusky dolphin, *Lagenorhynchus obscurus*, in the south Atlantic. *Fishery Bulletin* 77: 871-890.
- Würsig B. y R. Bastida. (1986). Long-range movement and individual associations of two dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) off Argentina. *Journal of Mammalogy* 67: 773-774.
- Würsig B., Würsig M. y F.Cipriano (1989). Dolphins in different worlds. *Oceanus* 32: 71-75.
- Würsig B., Cipriano F., Slooten E., Constantine R., Barr K. y S. Yin. (1997) Dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) off New Zealand: Status of present knowledge. Report International Whaling Commission 47: 715-722.

TRABAJO DE RESPALDO

Según lo establecido por el reglamento de la Carrera de Doctorado de la Universidad Nacional de Comahue, se presenta el siguiente trabajo de respaldo a la Tesis Doctoral:

Ttulo: "Behavioural responses of argentine coastal dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, to a biopsy pole system"

Autores: Rocío Loizaga de Castro, A. Rus Hoelzel y Enrique A. Crespo.

Año de publicación: 2013

Revista: Animal Welfare

Behavioural responses of Argentine coastal dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) to a biopsy pole system

R Loizaga de Castro^{*†‡}, AR Hoelzel[§] and EA Crespo^{†‡}

[†] Laboratorio de Mamíferos Marinos, Centro Nacional Patagónico, CENPAT-CONICET, Bvd Brown 2915, CP U9120ACV Puerto Madryn, Chubut, Argentina

[‡] Universidad de la Patagonia San Juan Bosco Bvd Brown 3150, CP U9120ACV Puerto Madryn, Chubut, Argentina

[§] School of Biological and Biomedical Sciences, University of Durham, South Road, Durham DH1 3LE, UK

* Contact for correspondence and requests for reprints: rocio@cenpat.edu.ar

Abstract

In recent years, analysis of tissue samples has become a powerful tool in cetacean ecology since it provides information for effective conservation and management policies. Biopsy samples taken for such studies have been obtained by various means including crossbows, rifles, and pole systems. We investigated sampling success and the reaction of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) off the coast of Argentina to a biopsy pole system from 2008 to 2009. Using ad libitum behavioural sampling, we documented individual behavioural reactions to biopsy sampling immediately after a biopsy was taken. Log-linear models were used to determine whether there were significant differences in behavioural response for different group size, composition or behavioural context. In total, 109 sampling attempts were made and 58 biopsy samples were obtained (53.21% success rate). The intensity of individual response was influenced by group size and composition. Small groups (typically mother/calf) reacted more frequently than larger groups (generally mixed-age adults and juveniles). The behaviour of the animals prior to our approach for biopsy sampling also affected their response. Milling dolphins appeared to respond more intensively than dolphins socialising or travelling. In conclusion, biopsy sampling with the biopsy pole system presented here show generally mild and short-term reactions, though behaviour, group size and group composition affected the response. This information can be used to minimise the impact of biopsy sampling, and facilitate the collection of data critical to effective conservation strategies.

Keywords: animal welfare, Argentina, behavioural response, biopsy pole system, dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*

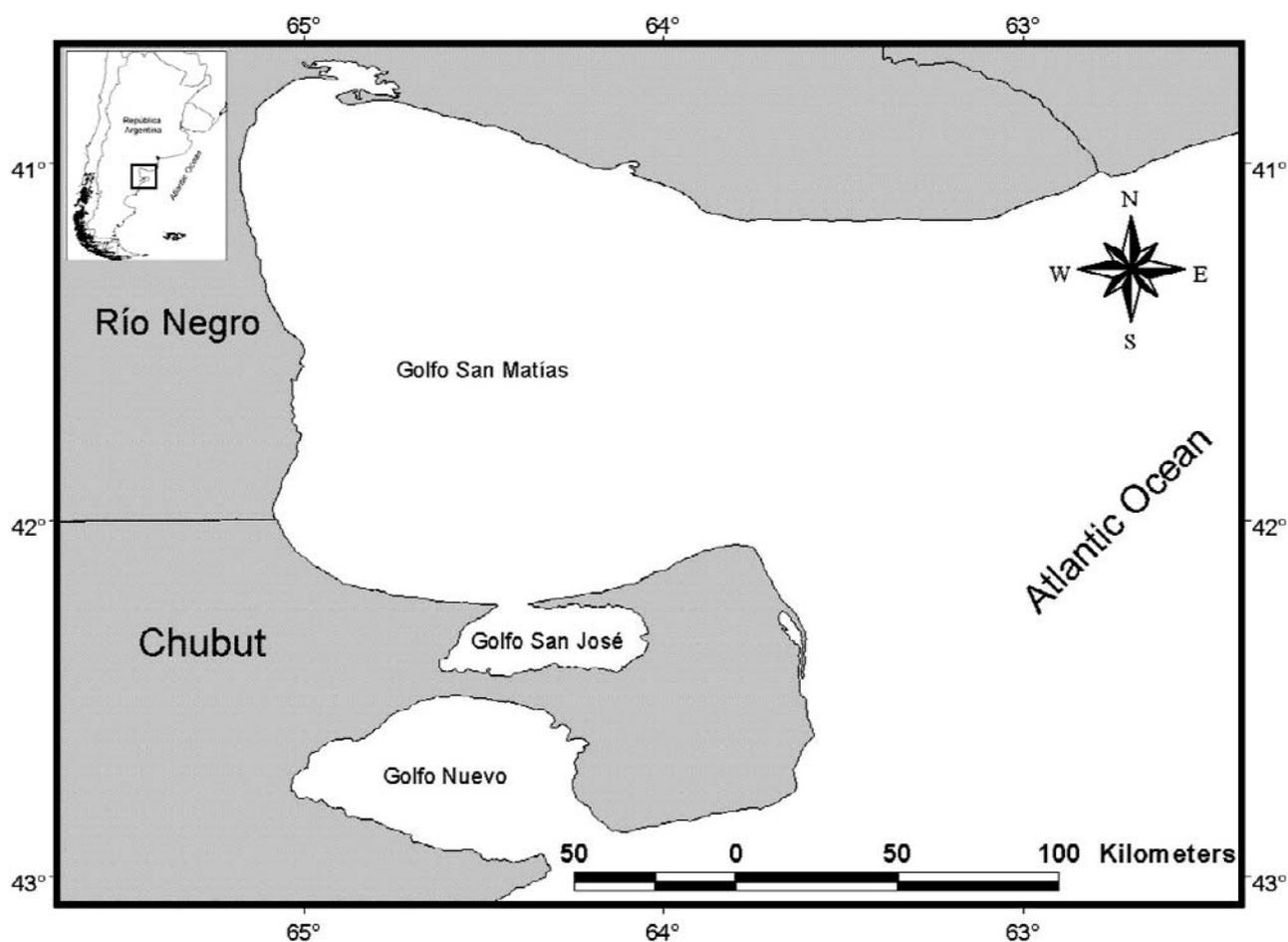
Introduction

Biopsy sampling from free-ranging cetaceans has been demonstrated to be useful for addressing questions regarding population genetics (Baker *et al* 1990; LeDuc *et al* 1999; Kiszka *et al* 2010), stable carbon and nitrogen isotope analyses (eg Walker *et al* 1999; Valenzuela *et al* 2009; Kiszka *et al* 2011) and contaminant levels (eg Fossi *et al* 2000; Fair *et al* 2010). Biopsy samples taken for genetic studies have been obtained using crossbows (Lambertsen 1987; Palsbøl *et al* 1991; Weinrich *et al* 1991, 1992; Gauthier & Sears 1999; Bearzi 2000; Hooker *et al* 2001; Gorgone *et al* 2008; Kiszka *et al* 2010; Quérouil *et al* 2010), rifles (Barret-Lennard *et al* 1996; Krützen *et al* 2002; Parsons *et al* 2003), pole systems (Bilgmann *et al* 2007), skin swabs (Hoelzel 1989; Milinkovitch 1994; Harlin *et al* 1999) or faecal sampling (Parsons *et al* 1999, 2003; Green *et al* 2007). Each of these procedures involves a degree of intrusion or disturbance, and so efforts have been made to minimise the impact (Weinrich *et al* 1991; Clapham & Mattila 1993; Brown *et al* 1994; Patenaude & White 1995;

Gauthier & Sears 1999). Many of these studies have involved large baleen whales and remote biopsy systems (eg crossbows, rifles, etc). For small cetaceans, there are ample data on remote biopsy sampling systems (eg Weller *et al* 1997; Krützen *et al* 2002; Gorgone *et al* 2008; Jefferson & Hung 2008; Kiszka *et al* 2010; Quérouil *et al* 2010), but only one published study examined the behavioural response to a biopsy pole system (Bilgmann *et al* 2007).

Biopsy sampling, using either remote or pole system, is the most efficient method to obtain epithelial material for DNA analysis (Amos & Hoelzel 1990; Baker *et al* 1990, 1993; Hoelzel & Dover 1991; Hoelzel *et al* 1998; Gorgone *et al* 2008; Kiszka *et al* 2010). However, as an intrusive technique, it presents inherent costs. For instance, Bearzi (2000) reported the death of a common dolphin (*Delphinus delphis*) following biopsy sampling using a remote biopsy device (variable-power CO₂ dart projector); the dart stuck in the dorsal muscle mass and less than 2 min after the hit, the dolphin began catatonic head-up sinking and the animal died 16 min later. This case highlights the

Figure 1



Study area, consisting of three gulfs, Golfo San Matias (GSM), Golfo San José (GSJ) and Golfo Nuevo (GN).

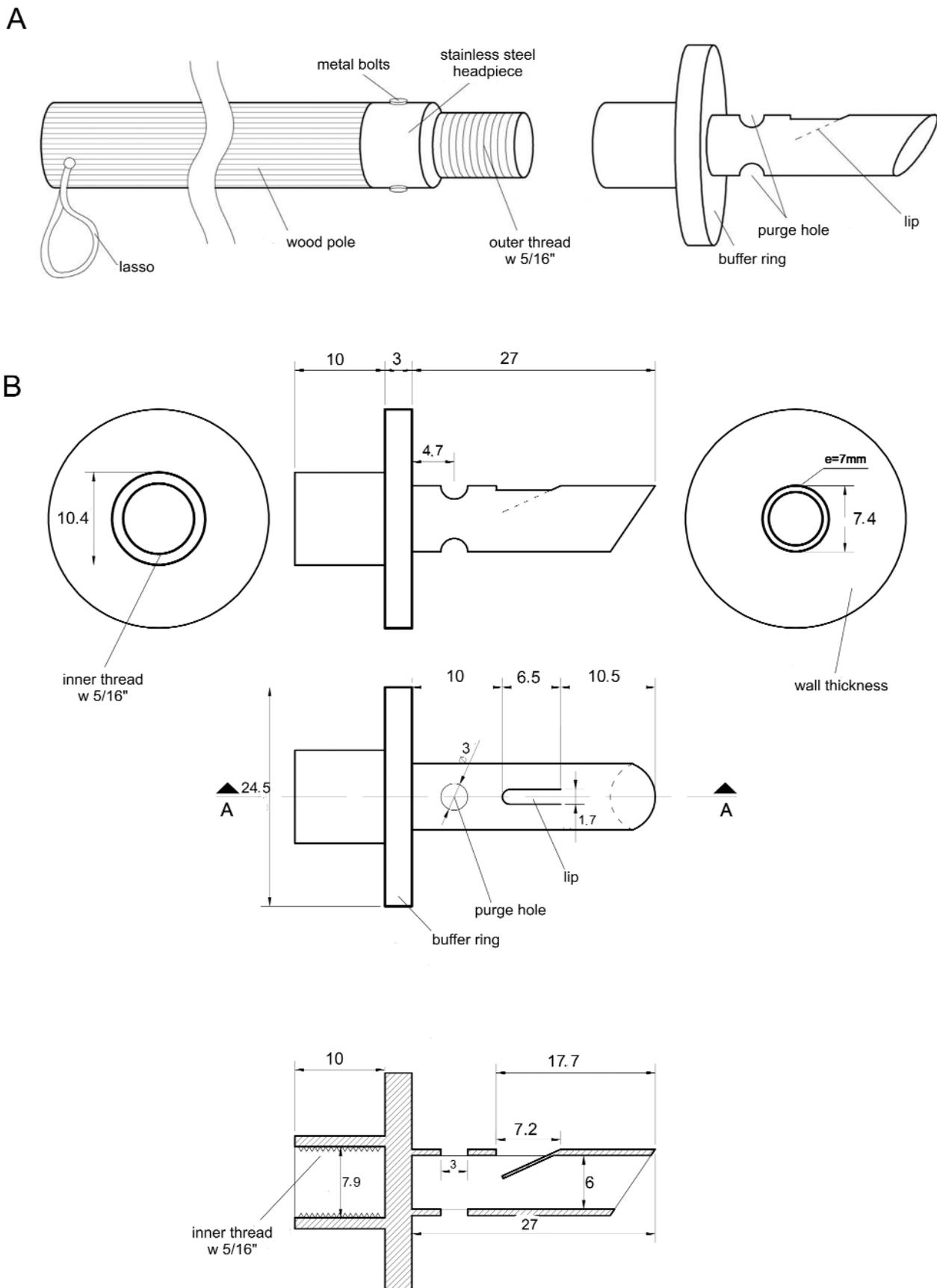
need for research into the potential impact of biopsy procedures. Such research, along with effective planning, can minimise the adverse effects of biopsy sampling.

When selecting a sampling technique to obtain biopsy samples, the conservation status of the species and target population, as well as the potential behavioural response of the target animals, should be considered (Bilgmann *et al* 2007). One of the problems with less-invasive sampling, such as faeces or skin-swabbing sampling, is that DNA may not be sufficient in quality and quantity to support the required molecular analyses (Harlin *et al* 1999; Parsons *et al* 1999). Biopsy samples provide sufficient DNA for repeated, multimarker genetic analyses, as well as isotopic or contaminants analysis (Amos & Hoelzel 1990; Borrel *et al* 2001; Natoli *et al* 2005, 2008; Valenzuela *et al* 2009; Cypriano-Souza *et al* 2010).

We investigated sampling success and behavioural response to the biopsy pole system for bow-riding dolphins in the context of different group sizes, group composition and behaviour. Biopsy samples were taken from dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) off the Argentine coast during 2008–2009. The species is subject to incidental mortality in purse seine and

trawling fisheries, and it was suggested that by-catch during the 1990s was probably close to the maximum sustainable level (Corcuera *et al* 1994; Crespo *et al* 1997; Dans *et al* 2003). In the last decade, substantial biological information for this species was obtained including abundance estimations (Schiavini *et al* 1999), reproductive biology (Dans *et al* 1997), diet composition (Koen Alonso *et al* 1998), parasite fauna (Dans *et al* 1999; Berón Vera *et al* 2008), behavioural ecology (Degradi *et al* 2008); habitat use (Garaffo *et al* 2007; 2010, 2011) and tourism interactions (Coscarella *et al* 2003; Dans *et al* 2008). However, aspects of the life history and stock identity still must be elucidated in order to model the dynamics of the population and the partitioning of genetic diversity among populations. This includes natural mortality factors and the identification of potential structure which may be affected differentially by fishery or tourism activities. Therefore, biopsy sampling is an important component of the broader study in support of effective conservation in the face of ongoing impact from fisheries and tourism. The primary objective of this study, therefore, is the development of a biopsy strategy that will entail minimal negative impact.

Figure 2



Showing (A) schematic of the biopsy pole system and detail of distal part, including biopsy tip and (B) detailed schematic of the biopsy tip.

Materials and methods

Study area

We collected data during 2008 and 2009 in northern Patagonia, Argentina (see Figure 1); in the area that includes three gulfs, Golfo San Matías (GSM; 40°45' S-42°14' S and 65°05'-63°48' W), Golfo San José (GSJ; 42°25' S-42° 13' S and 64°37' W-64°02' W) and Golfo Nuevo (GN; 42°29' S-42°56' S and 65°03' W-64°0' W).

Biopsy sampling

Collection of samples was approved by Secretaría de Turismo and Dirección de Fauna y Flora Silvestre de la Provincia del Chubut (Research permit No 23/07) and Government Agency Provincia de Río Negro. Skin samples were exported under CITES permit No 032423, 31374/75/76, extended by Ministerio de Salud y Ambiente Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina.

Biopsy samples were collected from a 6-m rigid-hull inflatable boat with a 60-horsepower (hp) and 4-stroke engine. The biopsy pole was 1.5-m long and made of wood (modified from Bilgmann *et al* 2007). The distal part of the pole contained a stainless steel headpiece with a 10-mm long outer thread (W 5/16"). The biopsy tips were stainless steel with a 10-mm posterior inner thread (W 5/16") that screwed into the headpiece. A 24.5-mm diameter, 3-mm thick buffer ring prevented deeper penetration. The biopsy tip was 27 mm in length and 7 mm in diameter, with a sharpened tip, a porthole at the base, and an internal 3-mm barb to hold the sample in place (Figure 2).

Once a sample was taken, wearing latex gloves, we extracted it from the biopsy tip by unscrewing the tip from the pole and, using sterilised forceps, pushed the sample into centrifuged tubes with a saturated NaCl/20% dimethyl sulphoxide solution (Amos & Hoelzel 1991). Once in the laboratory, the samples were stored at -20°C until further analysis. Prior to each sampling day, biopsy tips were scrubbed using a toothbrush and then boiled for 20 min. Finally, we flamed the biopsy tip after dipping it into 100% ethanol and applied a broad-spectrum antibiotic (Iodo Povidona, Pervinox, Laboratorio Pheonix, Buenos Aires, Argentina). The biopsy tips were stored until use in a clean plastic container.

In all locations, we attempted to sample dusky dolphins that were travelling parallel and close to the vessel (bow-riding dolphins). Depending on the distance of the dolphin, the biopsy pole was either dropped or thrown lightly towards the animal, aiming at the body areas lateral to the base of the dorsal fin. The pole was held at an angle of between 60 and 90° to the water surface. Biopsy sampling took place only in a sea state less than Beaufort 3 and during daylight hours, because these conditions permitted the dolphins' movements to be observed.

When a group of dolphins was sighted, location (recorded using GPS), group size and composition, and the predominant group activity were recorded prior to biopsy sampling and after if any parameters changed. A group was defined as

any collection of individuals located in close proximity (< 10 m) from one another (Smolker *et al* 1992). According to their composition, groups were classified as: adults and juveniles (consisting of animals of different lengths, all of which were larger than calves), mother/calf (when more than 80% of the individuals were mothers with their calves), and mixed (a combination of adults, juveniles, and calves, all of which formed a single unit). Age was assessed based on the body length of an individual. Dusky dolphins reach sexual maturity at the age of 6–7 years (Dans *et al* 1997), although three-year-old animals have almost the same length as adults (approximately 1.70 m; Dans 1999). Smaller animals were presumed to be juveniles; individuals that were less than two-thirds of adult length (and that were consistently accompanied by an adult) were considered calves (up to one year of age; Dans 1999). For mother/calf groups we left the group if no samples were taken after 10 min in order to avoid further harassment. Group size was assigned to one of the following categories: < 10, 11–20, 21–50, 51–70 and more than 70 animals (Degradi *et al* 2008).

Predominant group activity was defined as the activity in which most animals were engaged (Mann 1999) and assigned by instantaneous scan sampling (Altmann 1974). Activities were classified into one of the five categories: feeding (F); travelling (T); socialising (S); resting (R); and milling (M) (after Degradi *et al* 2008). During feeding, group members swam in circles or in a zigzag pattern, apparently to enclose a school of fish. Travelling consisted of persistent movement, with all group members swimming in the same direction. Socialising was characterised by frequent interactions between individuals, usually in the form of body contact and aerial displays. Resting involved individuals remaining stationary; apparently floating motionless on the surface. Milling consisted of low-speed movements with frequent changes in direction, resulting in little apparent overall directional movement by the group (for a review, see Degradi *et al* 2008). We conducted biopsy sampling during all behavioural categories, except for resting dolphins which were not sampled because they usually avoid the vessel.

Using *ad libitum* methods (Altmann 1974), we documented the response to the sampling procedure by recording the behaviour of each sampled dolphin after a biopsy was taken. We classified its reaction into one of the five categories following a protocol from Bilgmann *et al* (2007) and Krützen *et al* (2002): 0 for no noticeable reaction and the individual continues to bow-ride; 1 for a flinch, but the individual continues to bow-ride; 2 for an individual that accelerates underwater and leaves the bow; 3 for an individual that accelerates and leaves the bow followed by a single leap/porpoise ('porpoising' was, as described by Norris & Dohl [1980], a high-speed surface piercing motion in which long jumps are alternated with periods of swimming close to the surface); and 4 for an individual that accelerates and leaves the bow followed by multiple leaps and/or porpoises. The behavioural response of the individual was recorded whether the sampling attempt was successful (having collected a biopsy sample) or unsuccessful (no biopsy sample collected or pole thrown into the water but dolphin

Table 1 Behavioural responses of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) to biopsy pole system.

Response	Hit/miss			
	SM	GSJ	GN	Total
Category 0: no noticeable reaction and the individual continues to bow-ride	14/0	5/15	11/35	30/50
Category 1: for a flinch, but the individual continues to bow-ride	0/0	0/0	2/0	2/0
Category 2: for an individual that accelerates underwater and leaves the bow	2/0	12/0	12/0	26/0
Category 3: for an individual that accelerates and leaves the bow followed by a single leap/porpoise	0/0	0/0	0/1	0/1
Category 4: for an individual that accelerates and leaves the bow followed by multiple leaps and/or porpoises	0/0	0/0	0/0	0/0
Total	16/0	17/15	25/36	58/51

SM = Golfo San Matias; GSJ = Golfo San José; GN = Golfo Nuevo.

not hit). Categories 0–2 were considered mild and 3 and 4 as strong reactions to biopsy sampling. During a typical sampling event, the person taking the biopsy pole stood at the front of the vessel, with another observer close behind recording the biopsy sampling response and taking notes on the sampled individual (eg colour pattern, scars on the dorsal fin, and sex if possible). The second person, wearing latex gloves during the entire sampling event, was responsible also for changing the biopsy tips and preserving the sample.

Statistical analysis

Location, group size, behavioural state of the group and success or failure of the attempt were assessed as possible factors determining the individual's response to biopsy sampling. Frequencies were arranged in two-way contingency tables (hit \times miss) for all data combined and a Yates-corrected Chi-squared test (χ^2) was applied when necessary. Also, the frequency data were arranged in three-way contingency tables (group size \times sample \times reaction; group composition \times sample \times reaction and behavioural state \times sample \times reaction). These tables were analysed by means of log-linear models to determine whether there was a significant behavioural response in the context of variation in group size, composition or behaviour. Each hypothesis of interest was tested incorporating the corresponding interaction to the null model (Caswell 2001). A four-way contingency table was not possible because of the large number of cells with a value of 0 (Caswell 2001). In all cases, a critical significance level of $\alpha = 0.05$ was used. In order to compensate for the small sample sizes in the tests, behavioural responses to biopsy sampling (1–4) were combined as reaction and (0) as no reaction to the biopsy sampling. Sampling events from different locations were pooled after confirming no significant differences due to location.

Sex ratio

To detect if there was a sex bias in the collection of samples, animals were genetically sexed using sex-chromosome specific primers ZFX and ZFY (Bérubé & Palsbøll 1996). The observed sex-ratio was tested for deviation from the expected 1:1 ratio using a Chi-squared test.

For all data analyses, SPSS version 15 statistical software was used (Pardo & Ruiz 2002).

Results

Biopsy sampling

In total, 109 sampling attempts were made between January 2008 and January 2009, and 58 biopsy samples were obtained (53.2% success rate). No significant differences were found between locations in the dolphin's response to biopsy sampling ($\chi^2 = 3.70$, $P = 0.146$, $df = 2$). No significant difference in response to hit versus miss was detected for all data combined ($\chi^2 = 0.11$, $P = 0.7358$, $df = 1$, Yates corrected χ^2). The most frequent behavioural response observed to biopsy sampling was accelerating and leaving the bow (category 2; Table 1), while the second most frequent response was no noticeable reaction and the individual continues to bow-ride (category 0; Table 1). When the biopsy attempt hit the water, biopsy sampling failed, no noticeable reaction was recorded and the individual continued bow-riding (Category 0; Table 1). On just one occasion the individual accelerated and left the research vessel leaping and porpoising (Category 3; Table 1). No individuals exhibited a category 4 reaction (Table 1). Most dolphins returned to the research vessel after being sampled and continued bow-riding. It was easy to observe the round, white biopsy wound and to avoid these animals for further sampling.

A total of 93 groups of dolphins were encountered during this study. Groups of 11–20, 21–50 and > 70 animals were the most commonly encountered; groups of < 10 and 51–70 dolphins occurred least frequently and at similar frequencies. With regard to age structure, groups of adults and juveniles were most frequently sighted, whereas mother and calf groups and mixed groups were sighted less frequently. Group size was significantly associated with group age composition ($\chi^2 = 93.06$, $df = 8$, $P < 0.001$; Figure 3). The larger groups were typically mixed, whereas the smaller groups were composed primarily of adults and juveniles without calves, taking into account that mother/calf groups were avoided most of the time during the sampling to minimise harassment and stress. All but one of the mother and calf groups encountered contained < 20 individuals (Figure 3).

Dolphins in larger groups reacted to the biopsy pole sampling less frequently than dolphins in smaller groups

Figure 3

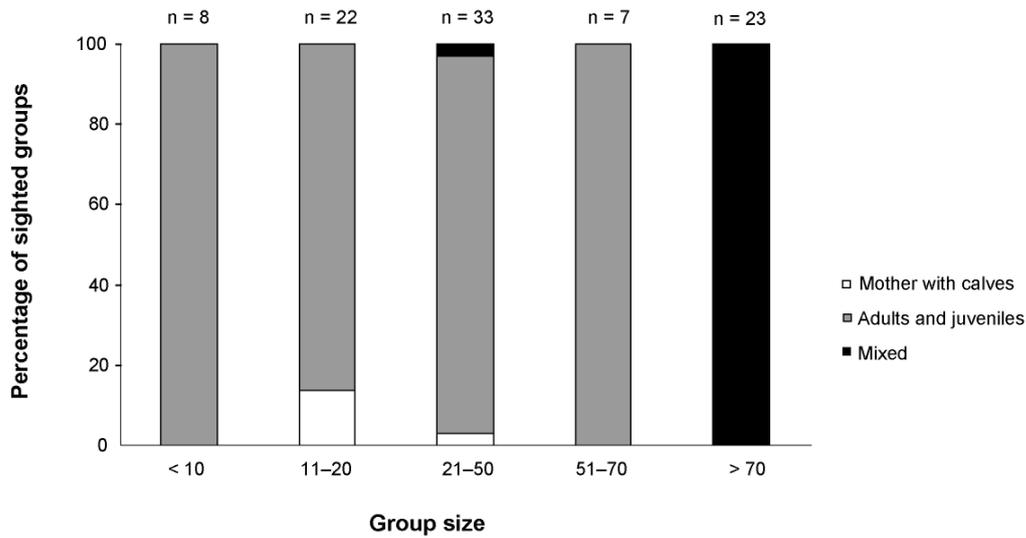
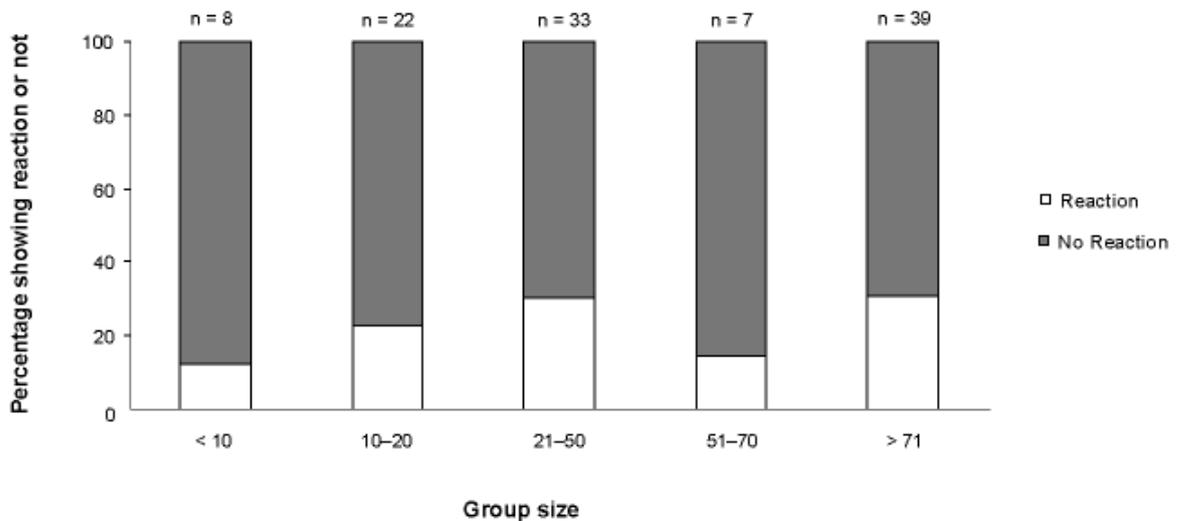
Group sizes and composition for dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*; n = 93) in the study area.

Figure 4

Group sizes of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*; n = 109) and percentage of animals with reaction or no reaction to biopsy sampling.

(Figure 4). The behavioural response to successful compared to unsuccessful sampling attempts was significantly related to group size ($\Delta G = 30.47$, $df = 10$, $P < 0.001$). Group composition also related to whether or not dolphins reacted to the biopsy sampling, with mother/calf groups reacting more frequently to biopsy sampling than adults and juveniles or mixed groups ($\Delta G = 28.41$, $df = 3$, $P < 0.001$; Figure 5).

The behaviour that dolphins exhibited prior to biopsy sampling was related to the occurrence of a reaction of bow-riding dolphins to the pole-sampling procedure ($\Delta G = 33.24$, $df = 10$, $P < 0.001$; Figure 6), although no group changed its behaviour during biopsy sampling.

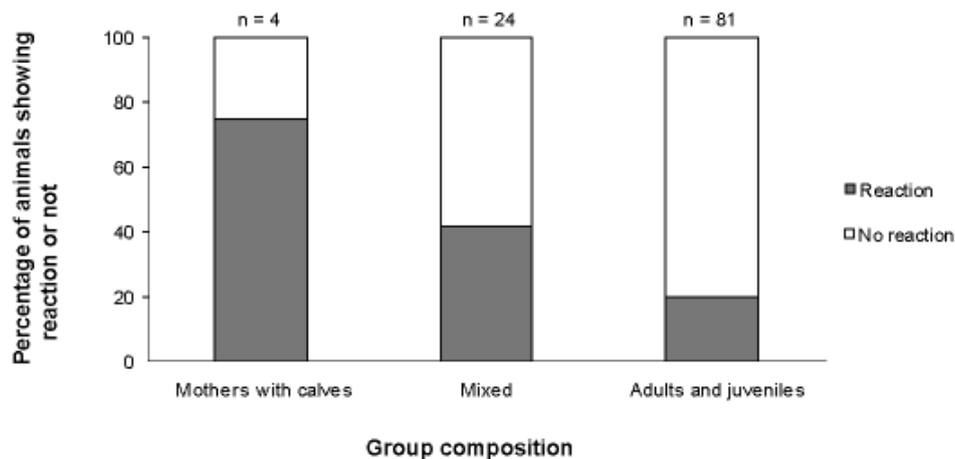
Milling dolphins responded more intensively than dolphins involved in social or travel activities (Figure 6).

No significant difference from a 1:1 sex ratio was detected for sampled individuals at any of the three locations (P -values varied from 0.5344 to 1.0).

Discussion

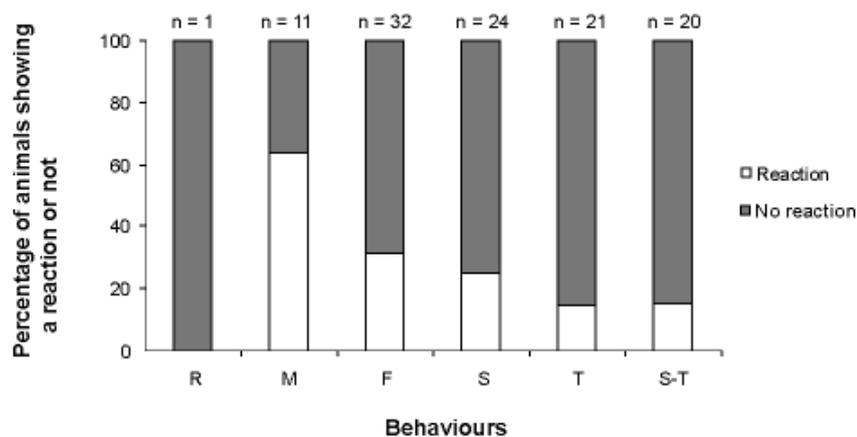
The biopsy pole system used in this study is a useful method for obtaining skin and blubber samples from coastal dusky dolphins off the coast of Argentina. This is the second study recording the behavioural response to biopsy sampling using a biopsy pole system, although that study involved a different species of dolphins in another region (Bilgman *et al*

Figure 5



Group composition of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*; n = 109) and percentage of animals with reaction or no reaction to biopsy sampling.

Figure 6



Behaviours of dusky dolphin groups (*Lagenorhynchus obscurus*; n = 109) and percentage of animals with reaction or no reaction to biopsy sampling. R = resting, M = milling, F = feeding, S = socialising, T = travelling, S-T = socialising-travelling.

2007). Here, our goal was to identify the features that can alter the behaviours of biopsied dolphins so that researchers can reduce stress and keep negative impacts low.

The overall biopsy success rate in this study was 53%. When divided into the three locations, 100% of the sampling attempts on dolphins in Golfo San Matías were successful, 53% in Golfo San José and 41% in Golfo Nuevo. Bilgmann *et al* (2007), using the biopsy pole, reported that 87.5% of the sampling attempts on bottlenose dolphins (*Tursiops* spp) in New South Wales (NSW), 62.5% on bottlenose dolphins in South Australia (SA), 77.8% on common dolphins in NSW, and 72.5% on common dolphins in SA were successful. However, the majority of biopsy-sampling studies used remote biopsy systems, such as crossbow or rifles. The success rate reported using remote biopsy methods was 65% for killer whales (*Orcinus orca*) (Barret-

Lennard *et al* 1996), 68% (Krützen *et al* 2002), 67% (Gorgone *et al* 2008), and 11.5% (Parson *et al* 2003) for bottlenose dolphins; 65% for pantropical spotted dolphin (*Stenella attenuata*), 70% for spinner dolphins (*Stenella longirostris*), 77% for Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*) and 78% for the melon-headed whale (*Peponocephala electra*) (Kiszka *et al* 2010). Thus, the reported success rates were mostly quite similar using both sampling methods. Both methods are practical to implement, although should perhaps be used in different situations (bow-riding versus not bow-riding) and in some cases for answering different questions. For example, when an animal needs to be identified to assess social structure, the remote system may be less disruptive, while the pole system might be more useful when addressing questions of population structure in general. Using both the pole and remote

systems in combination can reduce the overall time spent biopsy sampling and, consequently, the time spent with or near the animals. Therefore, the combination of pole and remote biopsy systems is recommended to facilitate research objectives and help reduce harassment and animal stress.

The animals showed mild reactions to the biopsy sampling procedure regardless of being hit or missed; this might indicate that the reaction was mainly caused by the unexpected disturbance rather than the biopsy sampling. In addition, when a vessel comes close to the dolphins during biopsy sampling, it may cause unintentional and unseen behavioural responses by dolphins that are not recorded by researchers. Responses may be caused by the closeness of the approach or to the type of vessel (large, noisy vessel versus small, quiet vessel). Coscarella *et al* (2003) and Dans *et al* (2008) found that dusky dolphins changed their behaviour in the presence of commercial vessels, especially with respect to feeding and travel behaviours. In this study, we used a similar type of vessel throughout to control for that variable, and during dolphin feeding behaviours we kept at a distance of > 100 m to help avoid interference with this behaviour.

During this study we recorded a strong reaction only once. On that occasion the dolphin left the research vessel and then began leaping and porpoising. It is worth noting that our perception of response is limited to activities at the surface, and significant underwater responses are possible. Bilgmann *et al* (2007), using a biopsy pole, found the same behavioural responses to successful and unsuccessful biopsy sampling for common and bottlenose dolphins. The results from this study on dusky dolphins and Bilgmann *et al* (2007) suggest that the biopsy pole technique generally produces moderate behavioural responses in small coastal cetacean species, whether individuals are hit or missed, and that the different species react similarly to the sampling procedure.

Therefore, the biopsy method used in this study mainly produced mild, short-term reactions, which is consistent with previous studies using pole and remote sampling methods (eg Weinrich *et al* 1992; Clapham & Mattila 1993; Brown *et al* 1994; Barrett-Lennard *et al* 1996; Weller *et al* 1997; Krützen *et al* 2002; Bilgmann *et al* 2007; Gorgone *et al* 2008; Kiszka *et al* 2010). It appears that the targeted dusky dolphins also have not altered their long-term behaviour since they are currently still easily approachable for systematic surveys.

The behavioural response to biopsy sampling using the pole method was significantly associated with group size, with dolphins that belong to the largest groups reacting less than those from smaller groups. Also, Kiszka *et al* (2010) found the same pattern for spinner and pantropical spotted dolphins. At the same time, dusky dolphin group size is significantly associated with group age composition, such that the largest groups are typically mixed groups, whereas the smallest groups are composed primarily of mothers and calves (Degradi *et al* 2008). Mother and calf groups reacted more frequently to biopsy sampling than adults and juveniles and mixed groups. Therefore, it could not be determined if group size or composition (or possibly both) was the causative factor.

During biopsy sampling we found that dolphins that were engaged in active behaviours, such as socialising, travelling or feeding, reacted less frequently to biopsy sampling than dolphins engaged in milling. Kiszka *et al* (2010) found that resting and socialising spinner dolphin groups showed a stronger response than milling and travelling groups. Degradi *et al* (2008) found that the most common diurnal behaviour of dusky dolphins was travelling, followed by milling and feeding, and they also found that mother and calf pairs spent more time milling and resting, whereas larger groups of adults and juveniles as well as mixed-age-class groups spent more time travelling and feeding. Hence, as a preventive measure, wherever possible, we recommend undertaking biopsy sampling from travelling dusky dolphins in large groups.

Dusky dolphin sex ratio was not biased in favour of males or females, based on samples collected in the three different Argentine gulfs. Several other studies also showed no significant bias (Krützen *et al* 2002, 2004; Möller & Beheregaray 2004; Bilgmann *et al* 2007). Skewed sex ratio was reported in samples of New Zealand's dusky dolphins, obtained by skin swabbing (Harlin *et al* 2003). In that study, the sex ratio varied between locations and collecting periods and was assumed to reflect seasonal variations in space occupation. Altogether, these results indicate that segregation by age and sex might occur in dusky dolphins and depends upon season and location. Further work is required along the Argentine coast to determine the dusky dolphins' spatio-temporal pattern and environmental determinants of age and sex segregation.

Animal welfare implications and conclusion

The biopsy pole system designed here is cost effective, easy to apply, and easy to set up multiple times during a boat trip. As a consequence, the time between biopsy attempts is minimal compared to the time involved in recovering the sample using long-distance devices, such as the recovery of bolts or darts when crossbow, pistol or rifles are used. Therefore, the pole system used in this study reduces the biopsy sampling time and helps to avoid harassment and animal stress. This implies that dolphin welfare can be improved if this method is used, where it is practical to do so. We also recommend that dolphins should be sampled only while travelling, in order to further minimise negative effects of sampling. Other advantages include a greatly reduced risk of the biopsy tip remaining attached in the animal, and increased accuracy, minimising hits to sensitive parts of the animal's body. For the remote systems, tether lines could become entangled, and the higher pressure applied to permit recoil of an untethered dart has, on at least one occasion, resulted in deep penetration and the death of a common dolphin (Bearzi 2000). In conclusion, biopsy sampling with the pole-system device presented here, is secure and easy, providing genetic samples with sufficient DNA for a multiple genetic marker approach, and blubber for isotopic or contaminant analysis.

Acknowledgements

The authors are indebted to many people and institutions that collaborated in this research. We would like to thank Centro Nacional Patagónico (National Research Council of Argentina) and Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco for logistic and institutional support. Also, we thank the Molecular Ecology Group, School of Biological and Biomedical Sciences, University of Durham, for lab support. Funds were received from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT No 11679 and 33934), Project PNUD ARG-02/018 (B- B27) and the Mohamed bin Zayed Species Conservation Fund. We also thank Andrés Isola for helping with the schematic diagram of the biopsy pole and biopsy tip; to the members of Laboratory 3 at Durham University and members of the Marine Mammal Laboratory of CENPAT for helping to collect samples in the field. Finally, we thank Robin Vaughn, Larissa Rosa de Oliveira and two anonymous referees who provided valuable and helpful comments during the revision of the manuscript. At the time this manuscript was written, RLC was supported by a PhD Fellowship from National Research Council of Argentina (CONICET).

References

- Altmann J** 1974 Observational study of behaviour: sampling methods. *Behaviour* 49: 227-267. <http://dx.doi.org/10.1163/156853974X00534>
- Amos B and AR Hoelzel** 1990 DNA fingerprinting cetacean biopsy samples for individual identification. *Report of the International Whaling Commission, Special Issue 12*: 79-85
- Amos W and AR Hoelzel** 1991 Long-term preservation of whale skin for DNA analysis. *Report of the International Whaling Commission, Special Issue, 13*: 99-103
- Baker CS, Palumbi SR, Lambertsen RH, Weinrich MT, Calambokidis J and O'Brien SJ** 1990 Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nature* 344: 238-240
- Baker CS, Perry A, Bannister JL, Weinrich MT, Abernethy RB, Calambokidis J, Lien J, Lambertsen RH, Urbán J, Vasquez O, Clapham PJ, Alling A, O'Brien SJ and Palumbi SR** 1993 Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8239-8243
- Barrett-Lennard L, Smith TG and Ellis GM** 1996 A cetacean biopsy system using lightweight pneumatic darts, and its effect on the behavior of killer whales. *Marine Mammal Science* 12: 14-27. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1996.tb00302.x>
- Bearzi G** 2000 First report of a common dolphin (*Delphinus delphis*) death following penetration of a biopsy dart. *Journal of Cetacean Research and Management* 2: 217-221
- Berón-Vera B, Crespo EA and Raga JA** 2008 Parasites in stranded cetaceans of Patagonia. *Journal of Parasitology* 94: 946-948. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-1296.1>
- Bérubé M and Palsbøll PJ** 1996 Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology* 5: 283-287
- Bilgmann K, Griffiths OJ, Allen SJ and Möller LM** 2007 A biopsy pole system for bow-riding dolphins: sampling success, behavioural responses, and test for sampling bias. *Marine Mammal Science* 23: 218-225. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.2006.00099.x>
- Borrel A, Cantos G, Pastor T and Aguilar A** 2001 Organochlorine compounds in common dolphins (*Delphinus delphis*) from the Atlantic and Mediterranean waters of Spain. *Environmental Pollution* 114: 265-274. [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00213-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00213-X)
- Brown MR, Corkeron PJ, Hale PT, Schultz KW and Bryden MM** 1994 Behavioural responses of east Australian humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, to biopsy sampling. *Marine Mammal Science* 10: 391-400. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1994.tb00496.x>
- Caswell H** 2001 *Matrix Population Models. Construction, Analysis and Interpretation, 2nd Edition*. Sinauer Associates, Inc: Sunderland, Mass, USA
- Clapham PJ and DK Mattila** 1993 Reactions of humpback whales to skin biopsy sampling on a West Indies breeding ground. *Marine Mammal Science* 9: 382-391. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1993.tb00471.x>
- Corcuera J, Monzon F, Crespo EA, Aguilar A and Raga JA** 1994 Interactions between marine mammals and the coastal fisheries of Necochea and Claromecó (Buenos Aires Province, Argentina). In: Perrin WF, Donovan GP and Barlow J (eds) *Gillnets and Cetaceans: Report of the International Whaling Commission, Special Issue 15*: 283-290
- Coscarella MA, Dans SL, Crespo EA and Pedraza SN** 2003 Potential impact of dolphin watching unregulated activities in Patagonia. *Journal of Cetacean Research and Management* 5: 77-84
- Crespo EA, Pedraza SN, Dans SL, Koen Alonso M, Reyes LM, García NA and Coscarella M** 1997 Direct and indirect effects of the highseas fisheries on the marine mammal populations in the Northern and Central Patagonian coast. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 22: 189-207. <http://dx.doi.org/10.2960/J.v22.a15>
- Cypriano-Souza AL, Fernández GP, Lima-Rosa CAV, Engel MH and Bonatto SL** 2010 Microsatellite genetic characterisation of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) breeding ground off Brazil (breeding stock A). *Journal of Heredity* 101: 189-200. <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esp097>
- Dans SL** 1999 *Ecología poblacional del delfín oscuro (Lagenorhynchus obscurus [Gray, 1828]) en el litoral patagónico, Atlántico sudoccidental*. PhD Dissertation, Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. [Title translation: Population ecology of the dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus* [Gray, 1828]) on the patagonian coast, South-west Atlantic]
- Dans SL, Crespo EA, Pedraza SN and Koen Alonso M** 1997 Notes on the reproductive biology of female dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) off the Patagonian coast. *Marine Mammal Science* 13: 303-307. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1997.tb00633.x>
- Dans SL, Crespo EA, Koen Alonso M and Pedraza SN** 2003 Incidental catch of dolphins in trawling fisheries off Patagonia, Argentina: can populations persist? *Ecological Application* 13: 754-762. [http://dx.doi.org/10.1890/1051-0761\(2003\)013\[0754:ICODIT\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1890/1051-0761(2003)013[0754:ICODIT]2.0.CO;2)

- Dans SL, Crespo EA, Pedraza SN, Degradi M and Garaffo GV** 2008 Dusky dolphins and tourist interaction: effect on diurnal feeding behavior. *Marine Ecology Progress Series* 365: 273-285
- Dans SL, Reyes LM, Pedraza SN, Raga JA and Crespo EA** 1999 Gastrointestinal helminths of the dusky dolphin, *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828), off Patagonia, in the Southwestern Atlantic. *Marine Mammal Science* 15: 649-660. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00834.x>
- Degrati M, Dans SL, Pedraza SN, Crespo EA and Garaffo GV** 2008 Diurnal behaviour of dusky dolphins, *Lagenorhynchus obscurus*, in Golfo Nuevo. *Journal of Mammalogy* 89: 1241-1247. <http://dx.doi.org/10.1644/07-MAMM-A-110.1>
- Fair PA, Adams J, Mitchum G, Hulsey TC, Reif JS, Houde M, Muir D, Wirth E, Wetzel D, Zolman E, McFee W and Bossart GD** 2010 Contaminant blubber burdens in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from two southeastern US estuarine areas: concentrations and patterns of PCBs, pesticides, PBDEs, PFCs, and PAHs. *Science of the Total Environment* 408: 1577-1597. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.12.021>
- Fossi MC, Marsili L, Casini S, Bearzi G, Politi E, Zaradelli M and Panigada S** 2000 Skin biopsy of Mediterranean cetaceans for the investigation of interspecies susceptibility to xenobiotic contaminants. *Marine Environmental Research* 50: 517-521. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00127-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00127-6)
- Garaffo GV, Dans SL, Pedraza SN, Crespo EA and Degradi M** 2007 Habitat use by dusky dolphin in Patagonia: how predictable is their location? *Marine Biology* 152: 165-167. <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-007-0686-0>
- Garaffo GV, Dans SL, Crespo EA, Degradi M, Giudici P and DA Gagliardini** 2010 Dusky dolphin: modeling habitat selection. *Journal of Mammalogy* 91: 54-65. <http://dx.doi.org/10.1644/09-MAMM-A-105R1.1>
- Garaffo GV, Dans SL, Pedraza SN, Degradi M, Schiavini A, González R and Crespo EA** 2011 Modeling habitat use for dusky dolphin and Commerson's dolphin in Patagonia. *Marine Ecology Progress Series* 421: 217-227. <http://dx.doi.org/10.3354/meps08912>
- Gauthier J and Sears R** 1999 Behavioural response of four species of balaenopterid whales to biopsy sampling. *Marine Mammal Science* 15: 85-101. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00783.x>
- Gorgone AM, Haase PA, Griffith ES and Hohn AA** 2008 Modeling response of target and non-target dolphins to biopsy darting. *Journal of Wildlife Management* 72: 926-932
- Green ML, Herzing DL and Baldwin JD** 2007 Non-invasive methodology for the sampling and extraction of DNA from free-ranging Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*). *Molecular Ecology Notes* 7: 1287-1292. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01858.x>
- Harlin, AD, Würsig B, Baker CS and Markowitz TM** 1999 Skin swabbing for genetic analysis: application to dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Marine Mammal Science* 15: 409-425. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00810.x>
- Harlin AD, Markowitz T, Baker CS, Würsig B and Honeycutt RL** 2003 Genetic structure, diversity, and historical demography of New Zealand's dusky dolphin (*Lagenorhynchus obscurus*). *Journal of Mammalogy* 84: 702-717. [http://dx.doi.org/10.1644/1545-1542\(2003\)084<0702:GSDAHD>2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1644/1545-1542(2003)084<0702:GSDAHD>2.0.CO;2)
- Hoelzel AR** 1989 Territorial behaviour of the European robin; the importance of vegetation density. *Ibis* 131: 432-436. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-919X.1989.tb02793.x>
- Hoelzel AR and GA Dover** 1991 Mitochondrial D-loop DNA variation within and between populations of the minke whale. *Report of the International Whaling Commission* 13: 171-182
- Hoelzel AR, Dahlheim M and Stern SJ** 1998 Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the Eastern North Pacific and genetic differentiation between foraging specialist. *Journal of Heredity* 89: 121-128. <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/89.2.121>
- Hooker SK, Baird RW, Al-Omari S, Gowans S and Whitehead H** 2001 Behavioral reactions of northern bottlenose whales (*Hyperoodon ampullatus*) to biopsy darting and tag attachment. *Fishery Bulletin* 99: 303-308
- Jefferson TA and Hung SK** 2008 Effects of biopsy sampling on Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) in a polluted coastal environment. *Aquatic Mammal* 34: 310-316. <http://dx.doi.org/10.1578/AM.34.3.2008.310>
- Kiszka JJ, Simon-Bouhet B, Charlier F, Pusineri C and Ridoux V** 2010 Individual and group behavioural reactions of small delphinids to remote biopsy sampling. *Animal Welfare* 19: 411-417
- Kiszka JJ, Simon-Bouhet B, Martinez L, Pusineri C, Richard P and Ridoux V** 2011 Ecological niche segregation within a community of sympatric dolphins around a tropical island. *Marine Ecology Progress Series* 433: 273-288. <http://dx.doi.org/10.3354/meps09165>
- Koen Alonso M, Crespo EA, García NA, Pedraza SN and Coscarella MA** 1998 Diet of dusky dolphin, *Lagenorhynchus obscurus*, in waters off Patagonia, Argentina. *Fishery Bulletin* 96: 366-374
- Krützen M, Barré LM, Möller LM, Heithaus MR, Simms C and Sherwin WB** 2002 A biopsy system for small cetaceans: darting success and wound healing in *Tursiops* spp. *Marine Mammal Science* 18: 863-878. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01078.x>
- Krützen M, Sherwin WB, Berggren P and Gales N** 2004 Population structure in an inshore cetacean revealed by microsatellite and mtDNA analysis: bottlenose dolphins (*Tursiops* spp) in Shark Bay, Western Australia. *Marine Mammal Science* 20: 28-47. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.2004.tb01139.x>
- Lambertsen RH** 1987 A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. *Journal of Mammalogy* 68: 443-445. <http://dx.doi.org/10.2307/1381495>
- LeDuc RG, Perrin WF and Dizon AE** 1999 Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. *Marine Mammal Science* 15: 619-648. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00833.x>
- Mann J** 1999 Behavioural sampling methods for cetaceans: a review and critique. *Marine Mammal Science* 15: 102-122. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00784.x>
- Milinkovitch MC** 1994 Exfoliated cells are the most accessible DNA source for captive whales and dolphins. *Marine Mammal Science* 10: 125-128. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1994.tb00400.x>
- Möller LM and Beheregaray LB** 2004 Genetic evidence for sex-biased dispersal in resident bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Molecular Ecology* 13: 1607-1612. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02137.x>

- Natoli A, Birkun A, Aguilar A, Lopez A and Hoelzel AR** 2005 Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of the Royal Society* 272: 1217-1226. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2005.3076>
- Natoli A, Cañadas A, Vaquero C, Politi E, Fernández-Navarro P and Hoelzel AR** 2008 Conservation genetics of the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) in the Mediterranean Sea and in the eastern North Atlantic Ocean. *Conservation Genetics* 9: 1479-1487. <http://dx.doi.org/10.1007/s10592-007-9481-1>
- Norris KS and Dohl TP** 1980 Behavior of the Hawaiian spinner dolphin, *Stenella longirostris*. *Fishery Bulletin* 77: 821-849
- Palsbøll PJ, Larsen F and Hansen ES** 1991 Sampling of skin biopsies from free-ranging cetaceans in west Greenland: development of new biopsy tips and bolt designs. In: Hoelzel AR and Donovan GP (eds) *Genetic Ecology of Whales and Dolphins. The International Whaling Commission, Special Issue 13*: 71-89
- Pardo A and Ruiz MA** 2002 *SPSS 11. Guía Para el Análisis de Datos*. McGraw-Hill: Madrid, Spain.
- Parsons KM, Dallas JF, Claridge DE, Durban JW, Balcomb KC, Thompson PM and Noble LR** 1999 Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. *Molecular Ecology* 8: 1766-1768. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00723-8.x>
- Parsons KM, Duban JW and Claridge DE** 2003 Comparing two alternative methods for sampling small cetaceans for molecular analysis. *Marine Mammal Science* 19: 224-231. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.2003.tb01104.x>
- Patenaude NJ and White BN** 1995 Skin biopsy sampling of beluga whale carcasses: assessment of biopsy darting factors for minimal wounding and effective sample retrieval. *Marine Mammal Science* 11: 163-171. <http://dx.doi.org/10.1111/j.17487692.1995.tb00515.x>
- Quérouil S, Freitas L, Dinis A, Alves F, Cascão I, Prieto R, Silva MA, Magalhães S, Matos JA and Santos RS** 2010 Sex bias in biopsy samples collected from free-ranging dolphins. *European Journal of Wildlife Research* 56: 151-158. <http://dx.doi.org/10.1007/s10344-009-0299-7>
- Schiavini ACM, Pedraza SN, Crespo EA, González R and Dans SL** 1999 Abundance of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*) off north and central Patagonia, Argentina, in spring and comparison with incidental catch in fisheries. *Marine Mammal Science* 15: 828-840. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00845.x>
- Smolker RA, Richards AF, Connor RC and Pepper JW** 1992 Sex differences in patterns of association among Indian Ocean bottlenose dolphins. *Behaviour* 123: 38-69. <http://dx.doi.org/10.1163/156853992X00101>
- Valenzuela LO, Sironi M, Rowntree VJ and Seger J** 2009 Isotopic and genetic evidence for culturally inherited site fidelity to feeding grounds in southern right whales (*Eubalaena australis*). *Molecular Ecology* 18: 782-791. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04069.x>
- Walker JL, Potter CW and Macko SA** 1999 The diets of modern and historic bottlenose dolphin population reflected through stable isotopes. *Marine Mammal Science* 15: 335-350. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00805.x>
- Weinrich MT, Lambertsen RH, Baker CS, Schilling MR and Belt CR** 1991 Behavioural responses of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the southern gulf of Maine to biopsy sampling. In: Hoelzel AR and Donovan GP (eds) *Genetic Ecology of Whales and Dolphins. The International Whaling Commission, Special Issue 13*: 91-97
- Weinrich MT, Lambertsen RH, Belt CR, Schilling MR, Iken HJ and Syrjala SE** 1992 Behavioural reactions of humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, to biopsy procedures. *Fishery Bulletin* 90: 588-598
- Weller DW, Cockcroft VG, Würsig B, Lynn SK and Fertl D** 1997 Behavioural responses of bottlenose dolphins to remote biopsy sampling and observations of surgical biopsy wound healing. *Aquatic Mammals* 23: 49-58