



Conexión migratoria entre zonas de cría del Pacífico Este y áreas de alimentación en la Península Antártica basado en coincidencias de genotipos individuales

Migratory connections among breeding grounds off the Eastern Pacific and feeding areas in the Antarctic Peninsula based on genotype matching

Susana Caballero^{1*}, Debbie Steel², Logan Pallin³, Natalia Botero-Acosta⁴, Fernando Felix⁵, Carlos Olavarría⁶,
ID 0000-0002-9285-3873 ID 0000-0001-5898-2850 ID 0000-0001-8024-9663 ID 0000-0001-5976-2577 ID 0000-0002-3165-7748

Maria Claudia Diazgranados⁷, Sandra Bessudo⁸, Ari Friedlander^{2,3} y C. Scott Baker²
ID 0000-0001-8237-9840 ID 0000-0003-3819-2004 ID 0000-0003-2183-2036

1. Laboratorio de Ecología Molecular de Vertebrados Acuáticos (LEMVA), Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, carrera 1 No. 18A-10, Bogotá, Colombia. sj.caballero26@uniandes.edu.co
 2. Marine Mammal Institute and Department of Fisheries and Wildlife, Oregon State University, 2030 SE Marine Science Drive, Newport, OR 97365, USA
 3. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California Santa Cruz, Coastal Biology Building, 130 McAllister Way, Santa Cruz, CA 95060, USA
 4. Fundación Macuáticos Colombia, Calle 27 No. 79-167, Medellín, Colombia
 5. Museo de Ballenas, Salinas, Ecuador/PO Box 09-06-2370, Guayaquil, Ecuador.
 6. Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Raúl Bitrán 1305, La Serena, Chile.
 7. Programa Marino, Conservation International, Carrera 13 No. 71-41, Bogotá, Colombia.
 8. Fundación Malpelo y otros Ecosistemas Marinos, Carrera 11 No. 87-51, Bogotá, Colombia.
- * Autor de correspondencia.

RESUMEN

En este estudio, se analizaron 114 muestras de ADN colectadas en diferentes localidades en la zona de reproducción de la población G (stock G), incluyendo la costa de Ecuador y localidades en el norte y sur del Pacífico colombiano, así como muestras obtenidas en la primera expedición científica colombiana a la Antártica en el estrecho de Gerlache. Se genotipificaron 15 loci microsatélites y se realizaron comparaciones de los genotipos obtenidos. Para estas comparaciones se utilizó una base de datos genéticos de individuos tanto en zonas de reproducción de Colombia y la zona de alimentación alrededor de la península Antártica. Se confirmó la conectividad existente entre las zonas de alimentación alrededor de la península Antártica y las zonas de reproducción en Colombia y Ecuador utilizando marcadores microsatélites. Se encontraron recapturas entre localidades en un mismo año, pero también se obtuvieron algunas recapturas en una misma localidad entre años diferentes, tanto en zonas de reproducción como de alimentación. Se encontraron recapturas de individuos en muestras colectadas con 20 años de diferencia, dando información preliminar sobre la longevidad de los animales de esta población.

PALABRAS CLAVE: *Megaptera novaeangliae*, Pacífico sudeste, Genotipificación, Microsatélite, Conexión migratoria.

ABSTRACT

We analysed 114 DNA samples collected in different locations within the stock G breeding grounds, including Ecuador and the northern and southern Pacific of Colombia. We genotyped 15 microsatellite loci, sexed all samples, and performed genotype comparisons. Genotype comparisons were done using a DNA register of previously genotyped individuals from the Colombian breeding ground and the Antarctic Peninsula feeding Area. We confirmed connectivity between feeding grounds in Antarctic Peninsula and breeding grounds in Colombia and Ecuador using microsatellite loci. We found recaptures within each sampling location in the same year, but we also found a few recaptures in the same locations between years both in breeding and feeding grounds. Interestingly, we found recaptures between breeding and feeding grounds using samples collected 20 years apart, providing some information about longevity in this stock. Further comparisons with other data sets (Brazil, North Pacific) are needed to understand the migratory connectivity of this stock.

KEYWORDS: *Megaptera novaeangliae*, Southeastern Pacific, Genotyping, Microsatellite, Migratory connectivity.

DOI: <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2021.50.SuplEsp.933>

Publicado por INVEMAR

Este es un manuscrito de acceso abierto bajo la licencia CC Reconocimiento-No Comercial-Compartir Igual

Published by INVEMAR

This is an open Access article under the CC BY-NC-SA

INTRODUCCIÓN

Las ballenas jorobadas tienen una distribución cosmopolita, con poblaciones distribuidas en las tres cuencas oceánicas: Atlántico Norte, Pacífico Norte y el hemisferio sur. Para el hemisferio sur, la Comisión Ballenera Internacional (International Whaling Commission, IWC) reconoce seis sub poblaciones o stocks (IWC, 1998). La identidad de cada una de estas sub poblaciones está definida de acuerdo con su distribución en zonas de alimentación en altas latitudes y sus áreas de cría en zonas del trópico. Las conexiones migratorias existentes entre estas zonas de cría y alimentación han sido sugeridas según evidencia obtenida por estudios comparativos basados en foto identificación (v. g., Acevedo *et al.* 2017, Flórez-González *et al.* 1998, Garrigue *et al.* 2002, Stevick *et al.* 2004), análisis de ADN mitocondrial (v. g., Baker *et al.* 1998, Olavarría *et al.* 2007, Félix *et al.* 2012) y, recientemente, por comparación de genotipos a nivel individual (Steel *et al.* 2017).

Se describió una conexión migratoria entre lugares de reproducción y cría en la costa Pacífica de Colombia y las zonas de alimentación alrededor de la Península Antártica (sub población o stock G) a partir de análisis genéticos (Caballero *et al.* 2000, 2001; Olavarría *et al.* 2007). Cuando se compara la sub población G con otras sub poblaciones del Hemisferio Sur, se encuentra que la población que visita y se reproduce anualmente en el Pacífico Colombiano presenta una diferenciación genética significativa con respecto a las demás de esta región (Olavarría *et al.* 2007). Adicionalmente se ha reportado una diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) relativamente altas para esta zona de reproducción (Caballero *et al.* 2001, Olavarría *et al.* 2007). La zona de reproducción del Pacífico Colombiano puede tener una importancia particular ya que se ha sugerido como un posible corredor para flujo genético en el pasado y actualmente, permitiendo el intercambio genético entre los grupos del Pacífico Norte y el Hemisferio Sur. Esto ha sido sugerido con base en la identificación de haplotipos de la región control del ADN mitocondrial que se encuentran compartidos entre la zona de reproducción del Pacífico Colombiano y las zonas de alimentación del Pacífico Norte (Caballero *et al.* 2001, Baker y Medrano-González 2002)

Otras áreas del Pacífico Sudeste han sido reconocidas también como zonas de reproducción de la sub población G. Estas incluyen la costa de Ecuador y las Islas Galápagos en el sur y la frontera entre Panamá y Colombia en el norte (Félix *et al.* 2011, Félix *et al.* 2012).

INTRODUCTION

Humpback whales have a cosmopolitan distribution with populations in all three major ocean basins: North Atlantic, North Pacific and Southern Hemisphere. In the Southern Hemisphere, six breeding stocks are recognised by the IWC (IWC, 1998). The identity of each of these stocks has been defined because of their distribution in high latitude feeding grounds and breeding grounds in tropical sites. The migratory connections between summer and winter grounds have been suggested for these stocks based on photo ID comparisons (e.g., Flórez-González *et al.*, 1998; Garrigue *et al.*, 2002; Stevick *et al.*, 2004; Acevedo *et al.* 2017) and mitochondrial DNA analyses (e.g., Baker *et al.*, 1998; Olavarría *et al.*, 2007; Félix *et al.*, 2012) and recently, by genotype matching (Steel *et al.*, 2017).

A migratory connection between breeding sites off the Pacific Coast of Colombia and the feeding grounds off the Antarctic Peninsula (Breeding Stock G) was described based on genetic analyses (Caballero *et al.*, 2000, 2001; Olavarría *et al.*, 2007). Among Southern Hemisphere stocks, the population that overwinters, and breeds, in the Colombian Pacific is significantly differentiated genetically from other populations in the region (Olavarría *et al.*, 2007). Relatively high haplotype (h) and nucleotide (π) diversities have been reported for humpbacks in this breeding ground (Caballero *et al.*, 2001; Olavarría *et al.*, 2007). The Colombian breeding ground may be of particular importance as it has been suggested as a possible corridor for past or present genetic exchange between North Pacific and Southern Hemisphere humpbacks. This has been suggested due to the identification of shared control region haplotypes found between the Colombian breeding ground and breeding and feeding areas in the North Pacific (Caballero *et al.*, 2001; Baker and Medrano-González, 2002)

Other areas in the southeastern Pacific have also been recognized as breeding grounds for stock G. These include the coast of Ecuador and the Galapagos Islands in the south, and the border between Panama and Colombia in the north (Félix *et al.*, 2011, 2012). There appears to be some population stratification among locations constituting this breeding ground, since some haplotypes found in Ecuador have only been previously described in the Magellan Strait and not in the Antarctic Peninsula (Félix *et al.*, 2012). Further molecular studies in these regions will

Parece existir también sub estructuración o estratificación poblacional entre las localidades que constituyen esta zona de reproducción, ya que algunos haplotipos encontrados en muestras de Ecuador solo han sido previamente descritos en el Estrecho de Magallanes y no alrededor de la Península Antártica (Félix *et al.* 2012). Estudios moleculares en estas zonas adicionales podrán ayudar a clarificar si esta posible sub estructuración existe entre localidades de esta zona de reproducción (Félix *et al.* 2012), ya que estudios de foto identificación (Acevedo *et al.*, 2017) y marcaje satelital también la sugieren (Guzmán and Félix, 2017).

En este trabajo presentamos resultados de comparaciones a nivel individual a partir de genotipos realizados a partir de muestras colectadas en diferentes localidades de alimentación y reproducción del Pacífico sudeste, incluyendo la costa de Ecuador, el Pacífico Colombiano y la Península Antártica.

ZONA DE ESTUDIO

Se colectaron muestras de piel de ballenas jorobadas durante la temporada de reproducción en Salinas, Ecuador, entre 2006 y 2010 (N=55), cerca de Nuquí, Golfo de Tribugá, Departamento del Choco, en la zona norte del Pacífico Colombiano entre 2015 y 2016 (N=43), en Bahía Málaga y la Isla Gorgona, Departamento del Valle del Cauca en el sur del Pacífico Colombiano (N=2), y en el Estrecho de Gerlache, en la Península Antártica, como parte de la primera expedición Colombiana a la Antártica en 2014 (N=14) (Tabla 1 y Figura 1).

Tabla 1. Resumen de las muestras y de los perfiles de ADN de las zonas de reproducción y las zonas de alimentación de la subpoblación o stock G, que incluyen el sexo de las muestras. QC hace referencia a las muestras que cumplieron con los estándares de control de calidad y fueron incluidas en los análisis finales.

	# Muestras / # Samples	# QC Muestras / # QC samples	# Individuos / # Individuals	# Machos / # Males	# Hembras / # Females
Ecuador	55	51	48	36	12
Norte Colombia / Northern Colombia	43	43	41	28	15
Sur Colombia / Southern Colombia	2	2	2	1	1
Península Antártica / Antarctic Peninsula	14	14	10	7	7
Total	114	110	101	72	35

allow for clarification of possible population stratification or fine-scale population structure among location in this breeding ground (Félix *et al.*, 2012). Stratification of the BSG at breeding grounds has also been found using photo-identification (Acevedo *et al.*, 2017) and satellite tagging (Guzmán and Félix, 2017).

Here we present results from genotype matching for samples from different locations among the southeastern Pacific breeding ground, including Coastal Ecuador, the Colombian Pacific Coast, and the Antarctic Peninsula.

STUDY AREA

Skin samples were collected from humpback whales during field seasons around Salinas, Ecuador between 2006 and 2010 (N=55), close to Nuquí, Tribuga Gulf, in the Northern Colombian Pacific in 2015 and 2016 (N=43), in Bahía Málaga and Gorgona Island, in the Southern Colombian Pacific (N=2), and in the Gerlach Strait, Antarctic Peninsula, as part of the first Colombian Antarctic Expedition in 2014 (N=14) (Table 1 and Figure 1).

Table 1. Summary of samples and DNA profiles from breeding grounds and Antarctic feeding grounds of stock G, including sex of the samples. QC refers to samples that passed the quality control parameters and were included in the analysis.

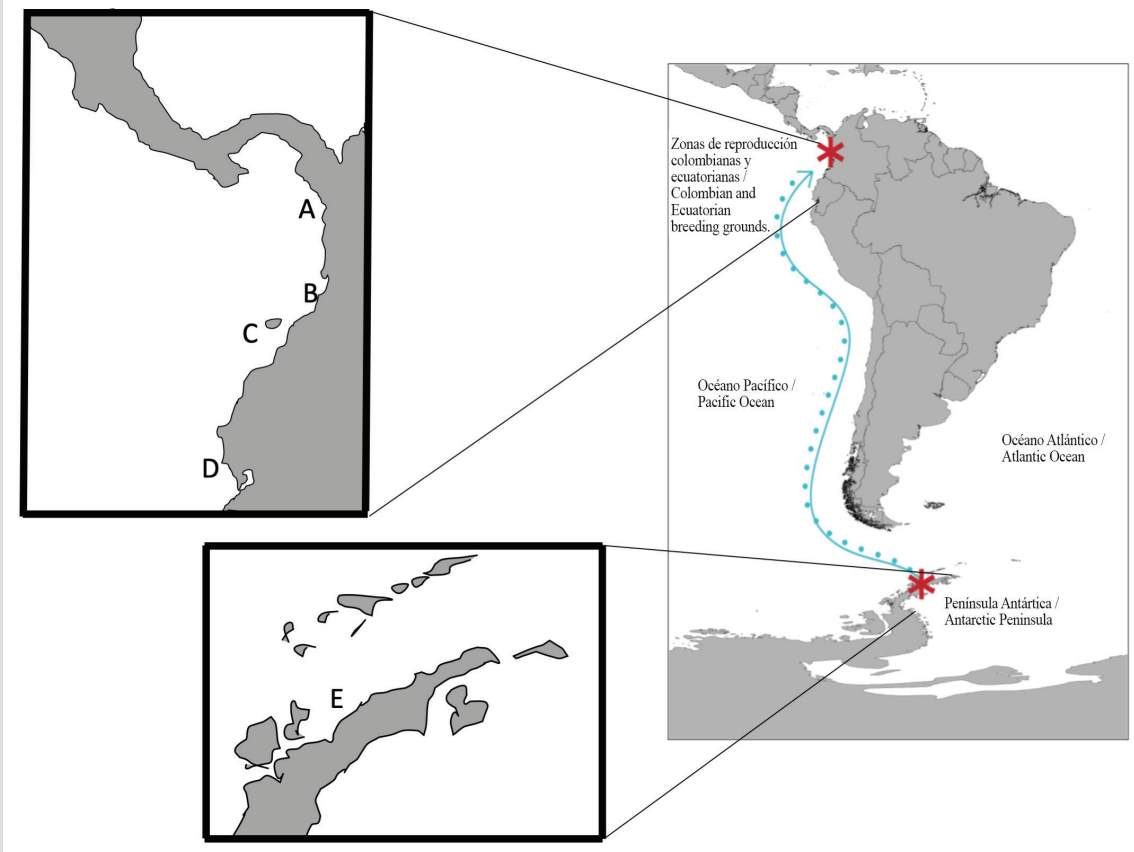


Figura 1. Localidades de muestreo en las zonas de alimentación y de reproducción para la subpoblación G: **A.** Nuquí, Departamento del Chocó, Colombia (Norte de Colombia), **B.** Bahía Málaga y **C.** Isla Gorgona Departamento del Valle del Cauca, Colombia, **D.** Salinas, Ecuador, and **E.** Estrecho de Gerlache, Península Antártica. En azul, ruta migratoria.

Figure 1. Sampling locations among the breeding and feeding grounds of Stock G: **A.** Nuquí, Colombia (Northern Colombia), **B.** Málaga Bay and **C.** Gorgona Island, Colombia, **D.** Salinas, Ecuador, and **E.** Gerlach Strait, Antarctic Peninsula. In blue, migratory route.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron biopsias de piel utilizando el rifle modificado Paxarms (Krützen *et al.* 2002) y se colectó piel desprendida, flotando en el agua, utilizando una malla para atraparla (ver Félix *et al.*, 2012). Las muestras fueron preservadas en etanol al 95 % y mantenidas 4 °C hasta su análisis en el laboratorio. Se extrajo ADN total utilizando proteinasa K para digerir el tejido, seguido por un protocolo clásico de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.* 1989). Se genotipificaron 15 loci microsatélites siguiendo los protocolos de Constantine *et al.* (2012) y de Steel *et al.* (2017) utilizando los primers o cebadores previamente publicados: Ev1, Ev14, Ev21, Ev37, Ev94, Ev96, Ev104 (Valsecchi y Amos 1996) GATA417, GATA28 (Palsboll *et al.* 1997) rw31, rw 4-10, rw48 (Waldick *et al.* 1999) and GT211, GT575, GT23 (Bérubé *et al.* 2000). La identificación individual fue confirmada con sexaje molecular y secuenciación de la región control del ADN mitocondrial (mtDNA) siguiendo los

MATERIALS AND METHODS

Skin biopsies were collected using the Paxarms modified rifle (Krützen *et al.*, 2002) and sloughed skin was collected from the water scooping it with a net (see Félix *et al.*, 2012). Samples were preserved in ethanol 95 % and stored at 4° C before laboratory analysis. DNA was extracted following a skin tissue digestion with proteinase K and a standard phenol-chlorophorm extraction method (Sambrook *et al.*, 1989). Genotyping of 15 microsatellite loci followed protocols from (Constantine *et al.*, 2012) and (Steel *et al.*, 2017) using previously published primers: Ev1, Ev14, Ev21, Ev37, Ev94, Ev96, Ev104 (Valsecchi and Amos, 1996) GATA417, GATA28 (Palsboll *et al.*, 1997) rw31, rw 4-10, rw48 (Waldick *et al.*, 1999) and GT211, GT575, GT23 (Bérubé *et al.*, 2000). Individual identification was also confirmed by molecular sex identification and sequencing of the mitochondrial control region (mtDNA) following the protocols from

protocolos de Olavarria *et al.* (2007). Cada loci microsatélite fue amplificado por PCR de manera independiente y luego todos los productos de amplificación fueron combinados (multiplex) para su montaje en el secuenciador ABI 3730 xl DNA (Applied Biosystems), utilizando el marcador de peso 500LIZ™. La identificación de los alelos se realizó utilizando el programa ABI PRISM GeneMapper 4.0 (Life Technologies). Las muestras amplificadas para 10 loci o menos se consideraron de baja calidad y se eliminaron de la base de datos. Los genotipos de alta calidad fueron resueltos utilizando el programa CERVUS (Marshall *et al.* 1998) requiriendo una coincidencia exacta de al menos ocho loci, soportado por la información del sexo y el haplotipo mitocondrial. Los valores de la probabilidad (PI) de identidad se encontraron en el rango entre 2.1×10^{-7} y 5.7×10^{-12} para el criterio de mínimo de ocho loci coincidentes. Se realizaron comparaciones de los genotipos generados utilizando dos “registros” de ADN (definiendo como “registros” una base de datos electrónica de perfiles de ADN) para individuos de ballenas jorobadas previamente identificados para la zona de reproducción de la costa Pacífica de Colombia (N = 111; 1991-1999) y la zona de alimentación alrededor de la Península Antártica (N = 70; 1989-1999) mantenidas por el South Pacific Whale Research Consortium (Steel *et al.* 2017) y, por un acuerdo de colaboración, también se compararon con un archivo de 508 muestras individuales colectadas en la Península Antártica en años recientes (2010-2016; Pallin 2018). Adicionalmente, y con el fin de confirmar los patrones de estructura poblacional previamente descritos para la subpoblación del Pacífico sudeste, dicha estructura poblacional fue evaluada con el programa STRUCTURE® v. 2.3 (Pritchard, *et al.* 2000) que asigna individuos a grupos utilizando un modelo Bayesiano que minimiza el desequilibrio de ligamiento y las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg. Se corrió el modelo de panmixia con correlación de frecuencias alélicas para estimar el número más probable de grupos genéticos (K) en la muestra (*length burn-in period*: 10 000; MCMC: 100 000). Este programa evalúa diferentes valores de K utilizando diversos modelos de ancestría. Se corrieron diez réplicas en STRUCTURE y los resultados fueron visualizados en el programa Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012). En este análisis se incluyeron 254 muestras de la Península Antártica, de Colombia y de Ecuador y para realizar comparaciones se incluyó un grupo de muestras de Brasil (n=50) (Cypriano-Sousa *et al.*, 2016) y del Pacífico Sur (Nueva Caledonia, n = 50; Polinesia Francesa y Samoa Americana, n = 100; Tonga, n= 50) (Steel *et al.* 2017)

(Olavarria *et al.*, 2007). Microsatellite loci were amplified individually and PCR products were multiplexed for loading in an ABI 3730 xl DNA sequencer (Applied Biosystems), using 500LIZ™ size standard. Allele calling was done using ABI PRISM GeneMapper Software 4.0 (Life Technologies). Samples which amplified at less than 10 loci were considered poor quality and were removed from the dataset. Quality genotypes were resolved using the program CERVUS (Marshall *et al.*, 1998) requiring the exact match of at least eight loci, supported by information on sex and mtDNA control region haplotype. Probability of identity (PI) values ranged between 2.1×10^{-7} and 5.7×10^{-12} for the minimum criterion of eight matching loci. Genotype comparisons were done using a DNA ‘register’ (i.e., a searchable electronic database of DNA profiles) of previously genotyped individuals from the Colombian breeding ground (N = 111; 1991-1999) and the Antarctic Peninsula feeding Area (N = 70; 1989-1999) both held by the South Pacific Whale Research Consortium (Steel *et al.*, 2017) and, through a collaborative agreement, to a more recent collection from Antarctic Peninsula of 508 individuals (2010-2016; Pallin, 2018). Additionally, in order to confirm previously described patterns of genetic structure for the Eastern Pacific humpback whale stock, these were evaluated using STRUCTURE® v. 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000) which assigns individuals to groups using a Bayesian model-based method that minimizes linkage disequilibrium and deviations from Hardy-Weinberg expectations. The admixture model with correlated allele frequencies was selected to estimate the most likely number of gene pools (K) in the sample (*length burn-in period*: 10 000; MCMC: 100 000). This software also evaluates different K values using population ancestry models. Ten replicates were run in STRUCTURE and results were visualized in Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012). For this analysis, 254 samples from Antarctic Peninsula, Colombia and Ecuador were used for comparisons with a subset of samples from Brazil (n=50) (Cypriano-Sousa *et al.*, 2016) and from the South Pacific (New Caledonia, n = 50; French Polynesia and American Samoa, n = 100; Tonga, n= 50) (Steel *et al.*, 2017)

RESULTADOS

Ciento catorce muestras fueron obtenidas a partir de biopsias remotas o de piel desprendida en tres localidades del Pacífico sudeste y de la Península Antártica. Se buscó obtener perfiles genéticos de estas muestras para realizar comparaciones con los genotipos de los registros de ADN del South Pacific Whale Research Consortium, que incluyen 16 loci microsatélite, haplotipos de ADN mitocondrial y sexo (Steel *et al.* 2017). Para todas las muestras se logró determinar el sexo y el haplotipo mitocondrial, información utilizada para poder aclarar recapturas potenciales (Tabla 1). De los 15 microsatélites utilizados, uno (EV21) no amplificó apropiadamente y no fue incluido en los análisis. Cuatro muestras, todas de Ecuador, no amplificaron para lograr el mínimo de calidad requerida de 10 loci para análisis y no fueron incluidas en la base de datos.

Las comparaciones realizadas con el resto de los 110 genotipos revelaron nueve coincidencias (matches) dentro de las localidades, tres en Ecuador, dos en Colombia y cuatro en la Península Antártica. (Tabla 1). Todas estas recapturas se dieron dentro de una misma temporada de campo con la excepción de un individuo, que fue muestreado en Ecuador en 2009 y nuevamente en 2010. Luego de eliminar estas recapturas dentro de cada localidad, los 101 genotipos restantes fueron comparados con individuos muestreados en 181 Colombia (N = 111) y la Península Antártica (N = 70) 20 años antes, y con un catálogo genético contemporáneo de la Península Antártica (Pallin *et al.* 2017, N = 510; 2010 - 2016) (Tabla 2). Considerando el solapamiento espacial y temporal entre 10 individuos muestreados en la Península Antártica incluidos en este estudio y en el catálogo de Pallin *et al.* (2018), estas dos bases de datos fueron comparadas primero y luego se unieron para realizar comparaciones posteriores con otras colectas temporales y espaciales. Se identificaron dos recapturas; un individuo muestreado en 2013 y nuevamente en 2015 y una muestra obtenida en 2015 y nuevamente en 2016. Luego de quitar dichas recapturas, un total de 518 individuos se definieron en la colección contemporánea de genotipos de la Península Antártica. Al comparar estos genotipos con los perfiles de los 70 individuos colectados 20 años antes, se encontraron dos recapturas en la misma región con un espacio temporal de 18 años, una hembra muestreada en 1997 y nuevamente en el 2015 (Tabla 3). Por el contrario, no se encontró ninguna recaptura al comparar las bases de datos de genotipos obtenidos en años recientes en las localidades de la zona de reproducción (Colombia

RESULTS

One hundred and fourteen samples were obtained from skin biopsies or sloughed skin from three locations in the southeastern Pacific and the Antarctic Peninsula. We attempted to provide comparable DNA profiles of these samples for comparison to those held in the DNA register of the South Pacific Whale Research Consortium, including 16 microsatellite loci, mtDNA haplotypes and sex identification (Steel *et al.*, 2017). All samples provided sex and mtDNA, information that helped in confirming potential recaptures (Table 1). Of the 15 microsatellite loci tried, one (EV21) failed to amplify and was dropped from further analyses. Four samples, all from Ecuador, failed to amplify for the minimum quality control (QC) criteria of 10 loci and were removed from the dataset.

Comparison of the remaining 110 genotypes revealed nine internal region matches, three within Ecuador, two within Colombia and four within the Antarctic Peninsula dataset (Table 1). All recaptures were within a field season with the exception of one individual, which was sampled in Ecuador in 2009 and again in 2010. After within-region replicates were removed the 101 individual genotypes were compared to 181 individuals sampled in Colombia (N = 111) and the Antarctic Peninsula (N = 70) almost 20 years earlier and to a large contemporary genetic catalogue from the Antarctic Peninsula (Pallin *et al.*, 2017, N = 510; 2010 - 2016) (Table 2). Given the spatial and temporal overlap between the 10 individuals sampled in the Antarctic Peninsula as part of this study and the Pallin *et al.* (2018) genetic catalogue, these two datasets were compared first and then merged for later comparisons to the other temporal and spatial collections. Two recaptures were identified between the two datasets; one individual sampled in 2013 and again in 2015 and one sampled in 2015 and again in 2016. After removing these recaptures, a total of 518 individuals remained in the contemporary collection of DNA profiles from Antarctic Peninsula. Comparing genotypes of these individuals to genotypes of 70 individuals collected in the same region two decades earlier revealed two recaptures each spanning 18 years, one female sampled in 1996 and again in 2014 and another female sampled in 1997 and again in 2015 (Table 3). In contrast, no recaptures were found when comparing the recent breeding ground genetic catalogues (Colombia 2015-2017 and Ecuador 2006-2010) to the previous breeding ground genetic catalogue (Colombia 1991-1999) (Table 3). A comparison of genotypes between the three



2015-2017 y Ecuador 2006-2010) ni con el catálogo de genotipos de años anteriores (Colombia 1991-1999) (Tabla 3). Una comparación de genotipos entre las localidades de la zona de reproducción y las de alimentación reveló cinco recapturas (Tabla 3), una previamente reportada por *et al.* (2017), tres entre la base de datos de Colombia 1991-1999 y la base de datos de la Península Antártica 2010-2016 y una entre Ecuador y la Península Antártica 2010-2016 (Tabla 3).

breeding grounds and the two feeding grounds revealed five recaptures (Table 3), one previously described in Steel *et al.* (2017), three between the Colombia 1991-1999 catalogue and the Antarctic Peninsula 2010-2016 collection and one between the Ecuador and the Antarctic Peninsula 2010-2016 collection (Table 3).

Tabla 2. Bases de datos utilizadas en las comparaciones realizadas.

	Años de colecta / Collection years	# Individuos / # Individuals	# Machos / # Males	# Hembras / # Females
Colombia	1991-1999	111	64	25
Península Antártica / Antarctic Peninsula	1989-1999	70	23	40
Península Antártica / Antarctic Peninsula	2010-2016	507	239	268
Total		697	326	333

Table 2. Datasets used for comparison

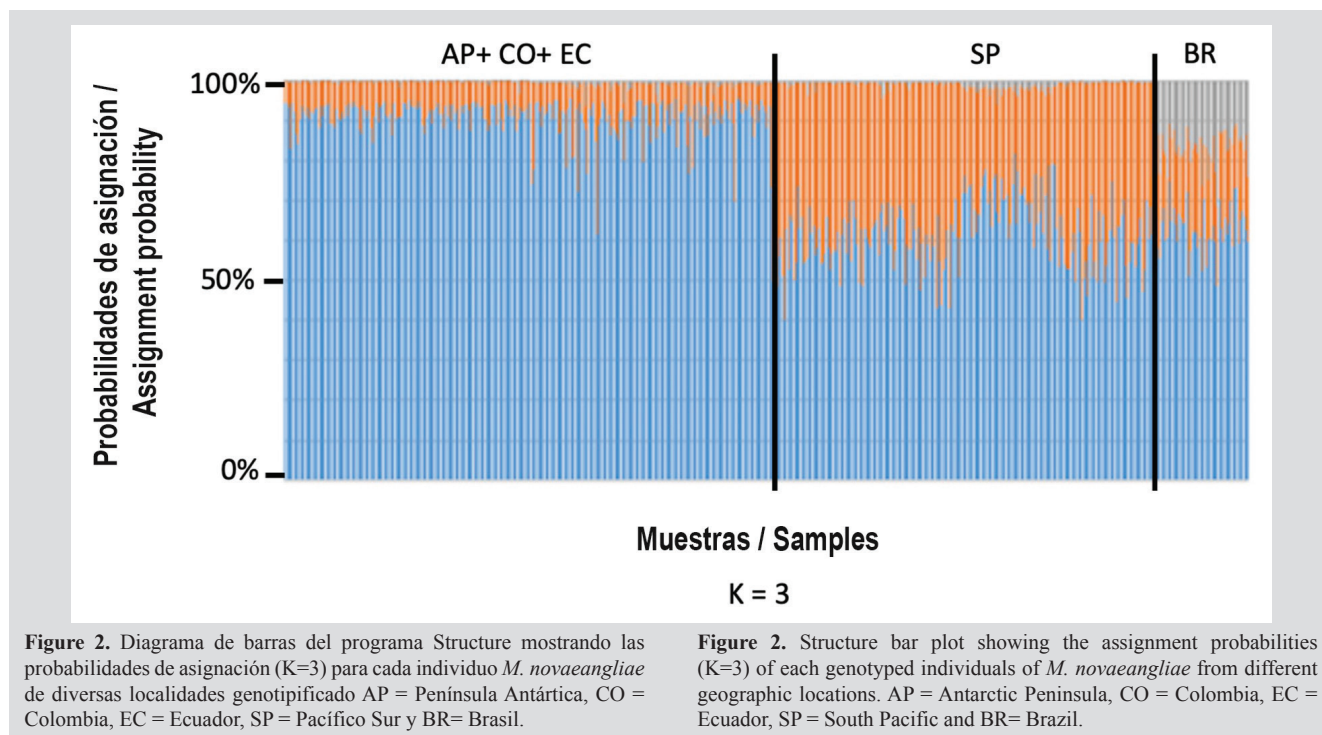
Tabla 3. Recapturas individuales a partir de genotipos dentro y entre muestreos en la región. El número sobre la diagonal representa las recapturas entre años, dentro de la misma localidad. El número debajo de la diagonal representa recapturas entre las zonas de alimentación y reproducción. * representa una recaptura previamente descrita.

Región (años) / Region (years)	N	Colombia (1991-99)	Colombia (2015-16)	Ecuador (2006-10)	Península Antártica / Antarctic Peninsula (1989-99)	Península Antártica / Antarctic Peninsula (2010-16)
Colombia (1991-99)	111	6				
Colombia (2015-16)	43	0	0			
Ecuador (2006-10)	48	0	0	1		
Península Antártica / Antarctic Peninsula (1989-99)	70	1*	0	0	1	
Península Antártica / Antarctic Peninsula (2010-16)	518	3	0	1	2	13

Table 3. Genotype recaptures within and between regional collections. Number on diagonal is between-year, within-region recaptures. Numbers below diagonal are between-region matches. * previously described recapture.

El análisis de estructura genética confirmó que todas las muestras analizadas pertenecían a una misma población (K=3) (Figura 2), confirmando la conectividad genética existente entre las zonas de alimentación alrededor de la Península Antártica y las zonas de reproducción, y mostrando diferenciación genética al realizar comparaciones con grupos de otras áreas del Hemisferio Sur (Pacífico Sur y Brasil), soportando lo previamente establecido por otros autores (Cypriano-Sousa *et al.* 2016; Steel *et al.* 2017).

The analysis of genetic structure confirmed that all the samples belonged to one population (K=3) (Figure 2), confirming connectivity between Antarctic Peninsula feeding and breeding grounds, showing differentiation with groups from other areas of the Southern Hemisphere (South Pacific and Brazil) as previously established by other authors (Cypriano-Sousa *et al.*, 2016; Steel *et al.*, 2017).



DISCUSION

En este trabajo presentamos resultados de genotipificación individual y recapturas en muestras de ballenas jorobadas de diversas localidades de las zonas de reproducción del Pacífico Este y sus zonas de alimentación alrededor de la Península Antártica. Este es el primer trabajo presentando resultados sobre el uso de marcadores moleculares nucleares (microsatélites) para esta subpoblación o stock, ya que los trabajos anteriores sobre genética poblacional de estos grupos se habían enfocado en análisis de secuencias de la región control del ADN mitocondrial (Caballero *et al.* 2002, Olavarría *et al.* 2007). Estos resultados confirman conocimiento previo sobre la conectividad genética existente entre los grupos que se alimentan en la zona del estrecho de Gerlache en la Península Antártica y sus zonas de reproducción en la costa de Ecuador y el Pacífico Colombiano.

En este estudio se presenta información sobre recapturas genéticas individuales encontradas entre estas dos regiones. La mayoría de las recapturas encontradas en nuestros análisis fueron recapturas dentro de cada una de las localidades de muestreo, pero hubo algunas interesantes para la misma localidad en años diferentes, tanto en zonas de alimentación como en zonas de reproducción, apoyando los datos presentados por Steel *et al.*, (2017).

DISCUSSION

Here we present results from genotype matching for samples from different locations among the Eastern Pacific breeding grounds and the feeding areas around Antarctic Peninsula for stock G. This is the first study presenting results for this stock from nuclear molecular markers, such as microsatellite loci, since all previous studies on this population had focused on mitochondrial DNA control region (Caballero *et al.*, 2001; Olavarría *et al.*, 2007). These results confirm previous knowledge regarding known genetic connectivity between feeding areas around the Gerlach Strait in Antarctic Peninsula and breeding areas of Colombia and Ecuador.

In this study we present individual genetic recaptures found between these two areas. Most of the recaptures found in our analyses were internal matches, but there were a few interesting recaptures in the same region for different years, both in breeding and feeding grounds, further supporting the findings by Steel *et al.* (2017).

Also, finding recaptures between breeding grounds and feeding grounds with samples collected 20 years apart provides indirect initial information about longevity of these individuals and confirms philopatry and a strong migratory connection between these areas for



Adicionalmente, el encontrar recapturas entre zonas de reproducción y alimentación para muestras tomadas con una diferencia temporal de 20 años proporciona información inicial sobre la longevidad de estos animales y confirma la filopatría y la fuerte conexión migratoria existente entre estas áreas para el stock G. Así mismo, el no haber encontrado recapturas para muestras colectadas en diferentes localidades dentro de la zona de reproducción (Ecuador y el norte del Pacífico Colombiano vs sur del Pacífico Colombiano), parece soportar la hipótesis sobre estratificación poblacional dentro de las áreas de esta zona de reproducción (Félix *et al.*, 2012, Guzmán and Félix, 2016). Estudios futuros deberán incluir muestras adicionales de estas áreas, así como muestras de animales que se alimentan en el Estrecho de Magallanes y que se reproducen potencialmente en Panamá y Costa Rica (Acevedo *et al.* 2017).

Análisis adicionales permitirán realizar la identificación de recapturas potenciales cuando estos datos sean comparados con registros de ADN para el Pacífico Sur y subpoblaciones adyacentes (e.g., Brasil, Cypriano-Souza *et al.* 2016) y ayudarán a informar sobre potencial migración entre Hemisferios cuando se puedan hacer comparaciones con muestras obtenidas de grupos del Pacífico Norte.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al South Pacific Whale Research Consortium por permitirnos tener acceso a las bases de datos genéticas utilizadas para realizar estas comparaciones. Por el apoyo logístico para realizar la toma de muestras en el Estrecho de Gerlache, agradecemos al programa Antártico Colombiano y a D. Mojica. El apoyo financiero para realizar esta investigación fue otorgado por la Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes (Proyecto Semilla Profesor, a S. Caballero) y de Oregon State University (a C. S. Baker).

stock G. Also, the fact that no recaptures were found among samples collected in different areas within this breeding ground (Ecuador and the northern Colombian Pacific vs southern Colombian Pacific), temporally separated by 20 years, could support the hypothesis of population stratification within areas of this breeding ground (Félix *et al.*, 2012; Guzmán and Félix, 2016). Future studies should include additional samples from these areas, plus samples from animals known to feed in the Magellan Strait and potentially breed in Panamá and Costa Rica (Acevedo *et al.*, 2017).

Additional analyses will allow identification of other potential recaptures when this data are compared with the DNA register for the South Pacific and adjacent stocks (e.g., Brazil, Cypriano-Souza *et al.*, 2016) and inform of potential cross hemisphere migration or genetic exchange when comparisons are done with samples from the North Pacific.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the South Pacific Whale Research Consortium for access to the genetic database used in these comparisons. For logistic support for sample collection in the Gerlach Strait we thank the Colombian Antarctic Project and D. Mojica. Financial support for this research came from Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes (Proyecto Semilla Profesor, to SC) and Oregon State University (to CSB).

BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED

- Acevedo, J., A. Aguayo-Lobo, J. Allen, N. Botero-Acosta, J. Capella, C. Castro, L. Dalla Rosa, J. Denkinger, F. Félix, L. Flórez-González, F. Garita, H.M. Guzmán, B. Haase, G. Kaufman, M. Llano, C. Olavarría, A.S. Pacheco, J. Plana, K. Rasmussen, M. Scheidat and E.R. Secchi. 2017. Migratory preferences of humpback whales between feeding and breeding grounds in the eastern South Pacific. *Mar. Mam. Sci.*, 33: 1035-1052.
- Baker, C. S. and L. Medrano-González. 2002. Worldwide distribution and diversity of humpback whale mitochondrial DNA lineages. In: Pfeiffer, C.J. (Ed.). *Molecular and Cell Biology of Marine Mammals*. Krieger Publishing, Malabar, Florida.
- Baker, C. S., L. Flórez-González, R. B. Abernethy, H. C. Rosenbaum, R. W. Slade, J. Capella and J. L. Bannister. 1998. Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among humpback whales of the Southern Hemisphere. *Mar. Mam. Sci.*, 14:721-737.
- Bérubé, M., H. Jorgensen, R. McEwing and P. J. Palsboll. 2000. Polymorphic di-nucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*. *Mol. Ecol.*, 9:2181-2183.

- Caballero, S., H. Hamilton, L. F6rez-Gonz6lez, J. Capella, C. Olavarria, H. Rosenbaum and C. S. Baker. 2000. Stock identity and diversity of humpback whale mitochondrial DNA lineages on the Colombian winter breeding grounds. Internat. Whaling Com., report SC/52/IA14. 1-7 pp.
- Caballero, S., Hamilton, H. Jaramillo, C., Capella, J., Fl6rez-Gonz6lez, L., Olavarria, C. Rosenbaum, H., Guhl, F. and C. S. Baker. 2001. Genetic characterization of the Colombian Pacific Coast humpback whale population using RAPD and mitochondrial DNA sequences. Mem. Queensland Mus., 47: 459-464.
- Constantine, R., Jackson, J. A., Steel, D., Baker, C. S., Brooks, L., Burns, D., Clapham, P., Hauser, N., Madon, B., Matilla, D., Oremus, M., Poole, M., Robbins, J., Thompson, K. and C. Garrigue. 2012. Abundance of humpback whales in Oceania using photo-identification and microsatellite genotyping. Mar. Ecol. Progr. Ser., 453: 249-261.
- Cypriano-Souza, A. L., Engel, M. H., Caballero, S., Olavarria, C., Fl6rez-Gonz6lez, L., Capella, J., Steel, D., Sremba, A., Aguayo, A., Thiele, D., Baker, C. S. and S. L. Bonato. 2016. Genetic differentiation between humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from Atlantic and Pacific breeding grounds of South America. Mar. Mam. Sci., 33:457-479.
- Earl, D. A. and B. M Vonholdt. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. Cons. Gen. Res., 4: 359-361.
- F6lix, F., D. M. Palacios, S. K. Salazar, S. Caballero, B. Haase and J. Falconi. 2011. The 2005 Gal6pagos humpback whale expedition: a first attempt to assess and characterise the population in the Archipelago. J. Cet. Manag., 3:291-299.
- F6lix, F., S. Caballero and C. Olavarria. 2012. Genetic diversity and population structure of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from Ecuador based on mitochondrial DNA analyses. J. Cet. Manag., 12:71-77.
- Fl6rez-Gonz6lez, L., J. Capella, B. Hasse, G. Bravo, F. F6lix and T. Gerrodette. 1998. Changes in winter destinations and the northernmost record of southeastern Pacific humpback whales. Mar. Mam. Sci., 14:189-196.
- Garrigue, C., A. Aguayo, V. L. U. Amante-Helweg, et al. 2002. Movements of humpback whales in Oceania, South Pacific. J. Cet. Manag., 4:255-260.
- Guzm6n, H. M. and F F6lix. 2017. Movements and habitat use by Southeast Pacific humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) stellite tracked at two breeding sites. Aq. Mam., 43: 139-155.
- International Whaling Commission. 1998. Annex G – Report of the sub-committee on the comprehensive assessment of Southern Hemisphere humpback whales. Report to the International Whaling Commission 48:170–182
- Kr6tzen, M., L. M. Barr6, L. M. M6ller, M. R. Heithaus, C. Simms and W. B. Sherwin. 2002. A biopsy system for small cetaceans: darting success and wound healing in *Tursiops* spp. Mar. Mam. Sci., 18: 863-878.
- Marshall, T. C., J. Slate, L. E. B. Kruuk and J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Mol. Ecol., 7: 639-655.
- Olavarria, C., C. S. Baker, C. Garrigue, et al. 2007. Population structure of South Pacific humpback whales and the origin of the eastern Polynesian breeding grounds. Mar. Ecol. Progr. Ser., 330: 257-268.
- Pallin, L. J., C. S Baker, D. Steel, et al. 2018. High pregnancy rates in humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) around the Western Antarctic Peninsula, evidence of a rapidly growing population. Roy. Soc. Open Sci., 5: 180017.
- Palsboll, P. J., M. B6rub6, A. H. Larsen and H. Jorgensen. 1997. Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales. Mol. Ecol., 6: 893-895.
- Pritchard, J. K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inferences of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155: 945-959.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A. 1546 pp
- Steel, D., M. Anderson, C. Garrigue, C. Olavarria, S. Caballero, S. Childerhouse, P. Clapham, R. Constantine, S. Dawson, M. Donoghue, L. Fl6rez-Gonz6lez, N. Gibbs, N. Hauser, M. Oremus, D. Paton, M. M. Poole, J. Robbins, L. Slooten, D. Thiele, J. Ward and C. S. Baker. 2017. Migratory interchange of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) among breeding grounds of Oceania and connections to Antarctic feeding areas based on genotype matching. Polar Biol. <https://doi.org/10.1007/s00300-017-2226-9>
- Stevick, P. T., A. Aguayo, J. Allen, et al. 2004. Migrations of individually identified humpback whales between the Antarctic Peninsula and South America. J. Cet. Res. Manag., 6: 109-113.
- Valsecchi, E. and W. Amos. 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. Mol. Ecol., 5: 151-156.
- Waldick, R. C., M. W. Brown and B. N. White. 1999. Characterization and isolation of microsatellite loci from the endangered North Atlantic right whale. Mol. Ecol., 8: 1763-1765.