

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Filogeografía y genética de poblaciones del lobo
fino de Galápagos (*Arctocephalus galapagoensis*)
Proyecto de investigación y desarrollo**

Daniela B. Martínez León

Biología con concentración en Ecología Marina

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Licenciatura en Biología con concentración en Ecología Marina

Quito, junio de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Filogeografía y genética de poblaciones del lobo fino de Galápagos
(*Arctocephalus galapagoensis*)**

Daniela B. Martínez León

Nombre del profesor, Título académico

Diego Páez-Rosas, PhD

Firma del profesor

Nombre del profesor, Título académico

Jaime Chaves, PhD

Firma del profesor

Quito, junio de 2017

Derechos de Autor

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

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

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Daniela Berenice Martínez León

Código: 00109434

Cédula de Identidad: 1718540998

Lugar y fecha: Quito, junio de 2017

RESUMEN

El lobo fino de Galápagos (*Arctocephalus galapagoensis*), especie endémica de las Islas Galápagos, pertenece a la familia Otariidae y su patrón filogeográfico ayuda a entender de mejor manera la dinámica poblacional y su colonización en el Archipiélago. El presente estudio pretende dar a conocer la diversidad genética asociada a patrones biogeográficos de *A. galapagoensis* en toda su área de distribución (4 islas), con el fin de entender su historia evolutiva. Se recolectó un total de 80 muestras de piel de cachorros de diferentes colonias del archipiélago durante el Crucero de Investigación de la Universidad San Francisco de Quito entre los años 2014 y 2016. Las secuencias analizadas de la región control de ADN mitocondrial pertenecientes a las poblaciones de *A. galapagoensis* muestran que hay un total de diez haplotipos que los individuos de distintas localidades comparten entre sí. La red de haplotipos o *Minimum Spanning Network* sustenta la poca diversidad genética que se encontró entre los individuos que componen las poblaciones de las Islas Galápagos. Estos resultados van de la mano con los valores de D de Tajima los cuales sugieren que estas poblaciones están en un proceso de expansión después de un posible evento de cuello de botella el cual redujo esta diversidad. Posibles factores que pueden influir son la fuerte filopatría que tienen los otáridos reduciendo el flujo génico entre las poblaciones, o posibles efectos de cambios bióticos y abióticos causados por anomalías como El Niño. Estos posibles efectos en la dinámica poblacional pueden tener consecuencias a largo plazo ya que eventualmente pueden incrementar el riesgo de extinción de las especies, por lo que estudios de este tipo son de vital importancia para su conservación.

Palabras clave: lobo fino de Galápagos, haplotipo, filopatría, distribución geográfica, ADN mitocondrial.

ABSTRACT

The Galápagos fur seal (*Arctocephalus galapagoensis*), endemic to the Galápagos Islands, belongs to the Otariidae family. Phylogeographic patterns of this species reflects its population dynamics and colonization events in the Archipelago. The present study aims to understand the genetic diversity associated with biogeographic data of *A. galapagoensis* across all its distribution (4 islands). A total of 80 skin samples from newborn puppies of different colonies of the archipelago were collected during the Universidad San Francisco de Quito Research Cruise between 2014 and 2016. The analyzed sequences of the mitochondrial DNA control region show a total of ten haplotypes shared by individuals from different islands. The haplotype network (or *Minimum Spanning Network*) supports the results of reduced genetic diversity that was found among the individuals of the Galapagos Islands. This results are further confirmed by Tajima's D values suggesting a population expansion following a genetic bottleneck. Several factors could have influenced these results such as the strong philopatry that otarids present, which generally reduces gene flow between populations, or the biotic and abiotic effects of oceanic anomalies such as El Niño. These factors could eventually increase the risk of extinction, therefore studies of this type are of vital importance for their conservation.

Key words: *Galápagos fur seals, haplotype, philopatry, geographic distribution, mitochondrial DNA.*

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	9
DESARROLLO DEL TEMA.....	12
Objetivos.....	12
Área de estudio.....	12
Metodología.....	13
Toma de muestras	13
Extracción de ADN	13
Amplificación de ADN mitocondrial	13
Alineamiento y análisis filogenético	14
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
ANEXO A: Tablas	32
ANEXO B: Figuras.....	35

ANEXO A: TABLAS

Tabla 1. Número total de individuos muestreados por localidad por Isla.....**32**

Tabla 2. Concentración de reactivos para PCR con primers ITS.....**32**

Tabla 3. Programación de termociclador para la amplificación de las muestras con los primers R3 (L15926) THR, TDKD (H16498).....**32**

Tabla 4. Secuencias de GenBank de la región control de ADNmt para cada haplotipo proveniente de Isabela y Fernandina, estudio de Lopes et al, (2015).....**33**

Tabla 5. Lista de individuos de *Arctocephalus galapagoensis* que comparten cada haplotipo de la región control del ADN mitocondrial. Frecuencia total de la muestra y distribución geográfica de los haplotipos; en donde los datos subrayados pertenecen a las muestras del estudio de Lopes et al, (2015).....**34**

ANEXO B: FIGURAS

Figura 1. Mapa del área de estudio del lobo fino de Galápagos.....**35**

Figura 2. Representación gráfica de la red de haplotipos de *Arctocephalus galapagoensis*.....**36**

INTRODUCCIÓN

Las Islas Galápagos se caracterizan por tener una gran diversidad y abundancia de especies marinas y terrestres. El archipiélago es un grupo de islas remotas en donde las especies que allí habitan se encuentran aisladas de sus especies hermanas continentales y por lo general, tienden a evolucionar a formas endémicas (Caccone et al., 2002).

A pesar de haberse realizado varios estudios filogeográficos en las Islas Galápagos, no parece existir un patrón al que todas las especies se rijan. Por un lado tenemos el caso de las iguanas marinas (*Amblyrhynchus cristatus*) que su alta diversidad genética estaría asociada a una baja filopatría, permitiendo que exista un mayor rango de dispersión y un mayor intercambio genético entre las poblaciones dentro y entre islas (Lanterbecq et al., 2010). De igual manera, Duffie *et al.*, (2009) han reportado evidencia de una importante diversidad genética entre las distintas poblaciones de cormorán no volador (*Phalacrocorax harrisi*) dentro del archipiélago. Por otro lado, en el caso del lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaeki*), Wolf *et al.*, (2007) sugieren que la baja diversidad genética encontrada no estaría relacionada con los severos eventos de El Niño, ni tampoco se evidencian efectos de cuello de botella recientes. Todos estos estudios demuestran que no existe un patrón claro que influya en la diversidad de estas especies dentro del Archipiélago. Aún más importantes son los estudios de especies de las cuales se hayan reportado disminuciones dramáticas en sus números en los últimos años, este es el caso del lobo fino de Galápagos.

El lobo fino de Galápagos (*Arctocephalus galapagoensis*); es una especie perteneciente a la familia Otariidae y uno de los pocos mamíferos endémicos de las Islas Galápagos (Trillmich, 1987). En un principio, el lobo fino de Galápagos era considerado una subespecie de *A. australis* (*A. australis galapagoensis*). Sin embargo, Repenning *et al.*, (1971), demuestran en un estudio basado en morfometría craneal que ambas especies son distintas; debido a que *A. galapagoensis* se caracteriza por tener un cráneo mucho más pequeño y una falta de desarrollo de las crestas sagitales y occipitales. De forma general, se cree que los otáridos se originaron en el Pacífico Norte, y que, por las características oceanográficas que causaron incursiones periódicas de agua más fría hacia la costa occidental de América del Sur creando el corredor del Pacífico Oriental, los antepasados de *Arctocephalus* lograron llegar al hemisferio sur (Riedman, 1990). Por lo tanto, la diversificación de este grupo tuvo lugar probablemente en el hemisferio Sur, donde habita el lobo fino sudamericano (*Arctocephalus australis*), que es la especie más cercana a una forma ancestral (Nigel, 1984).

Las colonias reproductivas del lobo fino de Galápagos se distribuyen en la región norte y oeste de las Islas Galápagos (Clark, 1979; Trillmich, 1987). Asentándose sus colonias más grandes en la parte oeste de las islas Isabela y Fernandina (Trillmich, 1979; Páez-Rosas *et al.* 2012). Sin embargo, existen avistamientos ocasionales de individuos en las islas de la región central y sur del archipiélago (Alava & Salazar, 2006).

La población del lobo fino de Galápagos ha fluctuado a lo largo del tiempo, llegando incluso a encontrarse al borde de la extinción como producto de la caza humana (Trillmich 1987). Se estima que la población comenzó a recuperarse después del año 1959, una vez que las Islas Galápagos fueron declaradas como Parque

Nacional. Sin embargo, esta especie ha sido categorizada como en peligro de extinción por la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) y entra dentro de la categoría A2ab, evaluación que usa como justificación a una reducción dramática en el tamaño de la población ($\geq 50\%$) durante los últimos 50 años o cinco generaciones (Trillmich, 2015). Asociando este decremento al impacto que han provocado los eventos climáticos como El Niño y la permanente exposición a interacciones antropogénicas (Trillmich, 2015).

Estudios filogeográficos recientes de esta especie, han reportado 14 haplotipos repartidos en 87 individuos, lo que sugiere una diversidad genética bastante reducida (Lopes et al., 2015) aumentando el riesgo de estas poblaciones a los efectos de consanguineidad y deriva génica. Sin embargo, no existe un estudio que abarque todas las zonas de reproducción, por lo que lo observado hasta el momento se convertiría en un reporte incompleto del estado poblacional genético de esta especie.

Dadas estas condiciones y las necesidades de conservación, es importante dar a conocer el estado poblacional y la diversidad genética de esta especie. El presente trabajo propone estudiar detalladamente la filogeografía de la especie, basándose en lo ya reportado por Lopes *et al.*, (2015) y extendiéndose por todo su rango geográfico (Islas Pinta y Santiago antes no muestreadas).

DESARROLLO DEL TEMA

Objetivos

Objetivo principal:

Evaluar la diversidad genética asociada a datos biogeográficos del lobo fino de Galápagos *Arctocephalus galapagoensis* a lo largo de todo su rango de distribución.

Objetivos específicos:

1. Determinar la distribución geográfica de la diversidad genética de la especie.
2. Identificar su estructura poblacional mediante la genética de poblaciones.

Área de estudio

El Archipiélago de Galápagos (01°40' N 01°36' S; 089°16' y 092°01' O), está conformado por islas de origen volcánico, las cuales se ubican aproximadamente a 960km de la costa del Ecuador. Este archipiélago posee 13 islas grandes, 6 pequeñas y más de 50 islotes (Snell et al, 1996). Las Islas Galápagos se ven influenciadas por corrientes oceánicas que circulan en ciertas etapas del año, las mismas que exponen al archipiélago a grandes cambios en la productividad primaria; sin embargo las variaciones más notables son provocadas principalmente por eventos y climáticos como El Niño y la Niña (Cowles et al., 1977; Wolff et al., 2012).

Metodología

Toma de muestras

El estudio se realizó en 4 islas del Archipiélago de Galápagos: Isabela, Fernandina, Santiago y Pinta (Figura 1). Se recolectó un total de 80 muestras de piel de cachorros recién nacidos de *A. galapagoensis*, capturados en ocho colonias reproductivas durante los Cruceros de Investigación de la Universidad San Francisco de Quito entre el 2014 y 2016 (Tabla 1).

Extracción de ADN

Las muestras se preservaron en etanol al 70% dentro de viales los cuales fueron puestos en congelación en el laboratorio del Galápagos Science Center (GSC). La extracción de ADN se realizó usando el kit “Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA) y se siguió el protocolo establecido. Finalmente la calidad y cantidad del ADN mitocondrial fue evaluado usando un NANODROP 2000 y verificada por medio de un gel de agarosa al 2%.

Amplificación de ADN mitocondrial

Los primers que se usaron para amplificar a 500 pb de la región de control del ADNmt fueron: R3 (L15926) THR 5'-TCA AAG CTT ACA CCA GTC TTG TAA ACC-3', TDKD (H16498) 5'-CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG-3' (Lopes et al, 2015). Para la realización de PCR se siguió el protocolo de PCR para primers ITS, a una temperatura de annealing de 70° C establecido por el Laboratorio de Biotecnología agrícola y de alimentos de la Universidad San Francisco Quito. Cada PCR se llevó a

cabo en un volumen de reacción de 50 µl que contenía 2 µl ADN templado, 5 µl 10x Buffer, 2 µl 10mM dNTPS, 4 µl MgCl₂, , 2 µl 10pmol de cada primer “forward” y “reverse”, 1 µl TAQ polimerasa y 32 µl H₂O (Tabla 2). La amplificación se realizó con un termociclador T Personal Thermocycler (Biometra) programada para: 1 ciclo de 5 min a 94°C, 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 54°C y 45 seg a 72°C; y un ciclo final de 7 min a 72°C (Tabla 3).

Los productos de PCR se comprobaron por la presencia de bandas de amplificación, las mismas que fueron visualizadas mediante un gel agarosa al 2%. Los productos de PCR fueron purificados usando UltraClean™ PCR Clean-up Kit y la secuenciación tanto “forward” como “reverse” se llevó a cabo en los laboratorios de Macrogen, Inc (COREA).

Alineamiento y análisis filogenético

Todas las secuencias fueron compiladas como archivos FASTA y alineadas mediante el software Geneious v.8.0.5. A las secuencias de este estudio se agregaron las secuencias del estudio de Lopes *et al.*, (2015), usando 14 haplotipos obtenidos de GenBank (Tabla 4). Todas las secuencias fueron alineadas junto al grupo externo de *Arctocephalus australis*. Seis individuos tuvieron datos secuenciales de baja calidad y fueron excluidos de los análisis filogenéticos.

Mediante el software PopArt (Population Analysis with Reticulate Trees) se logró clasificar los haplotipos presentes en las poblaciones de cada sitio muestreado dentro de las Islas Galápagos, identificando el número total de individuos que comparten el mismo haplotipo y el sitio en donde fue encontrado (Tabla 5). De esta manera se formó la red de haplotipos de *A. galapagoensis*. En la red de haplotipos (Figura 2), cada círculo corresponde a un haplotipo único, el tamaño de los círculos

es proporcional al número de individuos muestreados que llevan o comparten ese mismo haplotipo. Las líneas conectan cada haplotipo y las barras interceptadas representan la diferencia de una o dos pares de bases entre los mismos (Chaves, 2017). Cada color constituye una isla: Isabela – verde, Fernandina – azul, Pinta – anaranjado y Santiago – amarillo. Las distintas tonalidades de cada color representan las localidades dentro de cada isla.

La diversidad genética fue medida mediante el software PopArt, en base de un dato estadístico, D de Tajima, en el cual se pueden comparar dos estimadores del parámetro de la población: uno se basa en el número medio de diferencias entre pares de haplotipos (π) y otro se basa en el número de sitios segregantes en las muestras (s) (Durvasula, 2015). El dato D se lo obtiene con la diferencia entre los estimadores antes mencionados y tiene una media cero y desviación uno (Florez, 2009). En caso que el resultado presente desviaciones significativas quiere decir que son indicadoras de no neutralidad. Por lo tanto, si se obtienen valores positivos de D se podría indicar una selección positiva o a su vez una reducción en cuanto al tamaño poblacional. En el caso que sea un modelo neutral entonces ambos estimadores deberían ser iguales, pero las diferencias en este caso se podrían dar bajo el efecto de la selección, que las poblaciones no sean estables, o debido a las tasas de mutación heterogéneas entre los diferentes sitios (Florez, 2009). El resultado que se espera es una D negativa de Tajima en una población que no tiene ningún cambio demográfico como una expansión o migración.

RESULTADOS

Las secuencias analizadas de la región control de ADN mitocondrial pertenecientes a las poblaciones de lobo fino de Galápagos muestran que hay un total de diez haplotipos que los individuos de distintas localidades comparten entre sí (Tabla 5). Todos los haplotipos reportados (este trabajo y Lopes et al., 2015), sustentan la poca diversidad genética que se encontró entre los individuos que componen sus poblaciones (Figura 2); donde los diez haplotipos tienen conexiones de una o dos pares de bases entre ellos.

De los 146 individuos analizados (80 presente estudio y 83 Lopes et al., 2015), existieron cuatro individuos de este estudio y cuatro en el de Lopes *et al* (2015) que no comparten haplotipos entre sí; dando un total de 151 individuos estudiados. De los diez haplotipos, se encontraron nueve haplotipos para Isabela y Fernandina, cinco para Pinta y tres para Santiago cada uno con diferentes frecuencias (Tabla 5). Además, es importante recalcar que existe un nuevo haplotipo para las Galápagos que fue encontrado en dos individuos de la Isla Pinta (haplotipo C05). La red obtenida revela la conectividad que existe entre las islas al tener algunos individuos que comparten diferentes haplotipos, además se podría sugerir una distribución organizada en forma de estrella ('Star shape') (Avice, 2006), donde el haplotipo central (A01) vendría a ser el más común y por lo tanto se lo toma como el más ancestral de donde divergen los demás.

El haplotipo A01 se lo encuentra en 47 individuos que están distribuidos en todos los sitios de muestreo. Este patrón de distribución en forma de estrella no es tan evidente cuando vemos otros haplotipos con frecuencias elevadas separados

entre el resto de haplotipos por pocas bases. Del total de los diez haplotipos, solamente el haplotipo nuevo C05 se comparte en dos individuos de Pinta localizados en distintos sitios y es el único que no comparte el haplotipo con algún individuo del estudio de Lopes *et al* (2015). Por otro lado, se encontraron haplotipos representados por un solo individuo para ambos estudios (Figura 2), un total de siete haplotipos: KM030338 , KM030347 y KM030374 del estudio de Lopes *et al.*, (2015); y H13, H14, A11 y C06 del presente estudio.

El resultado de la prueba D de Tajima fue de -0,22, esto indica que la diversidad nucleotídica (π) fue de 0,0148 (menor a 1); valor que sugieren un exceso de polimorfismos de baja frecuencia en relación a un proceso de expansión (Roden *et al.*, 2013; Valdés, 2015).

DISCUSIÓN

Estructura genética poblacional

Es importante mencionar que este es el primer estudio que reúne datos y muestras de toda el área de reproducción del lobo fino de Galápagos (*Arctocephalus galapagoensis*) para dar a conocer los análisis de la estructura poblacional y la diversidad genética de esta especie.

De manera general, este estudio sugiere que existe una diversidad genética reducida a diez haplotipos mitocondriales sin una evidente estructura poblacional. Cabe recalcar que estos haplotipos son menores a los 14 reportados por Lopes *et al.*, (2015) pese a que todas las secuencias de dicho estudio fueron usadas en este trabajo. Es posible que exista un efecto de la alineación de las secuencias al combinarlas, las cuales pudieron tener diferentes longitudes como efectos de los “primers” o la secuenciación en sí.

Dejando de lado estas diferencias metodológicas, los resultados obtenidos sobre la baja diversidad genética sigue el mismo patrón encontrado en este estudio anterior.

Una baja o reducida estructura genética ha sido observada en otros estudios a escalas geográficas comparables tanto para el género *Arctocephalus* (*A. gazella* y *A. tropicalis*: Wynen *et al.*, 2000; *A. australis*: Crespo *et al.*, 2015), como para *Zalophus* (*Z. wollebaeki*: Wolf *et al.*, 2008), asociada a su gran movilidad entre áreas de reproducción dentro de los archipiélagos o islas donde habitan. Por otro lado, el bajo número de haplotipos del lobo fino de Galápagos observada en este trabajo sugiere que estas poblaciones pudieron haber sufrido eventos demográficos que redujeron

su diversidad genética. Un resultado similar se reportó en las poblaciones de lobo marino sudamericano (*Otaria flavescens*) localizadas en el cono sur de América (Islas Malvinas), donde reportaron 22 haplotipos en 259 individuos, asociando este hallazgo a los de competencia con pesquerías, enfermedades, cambios climáticos, caza, etc., en las últimas décadas (Hoffman et al., 2016).

El valor negativo de D de Tajima calculado para las poblaciones del lobo fino de Galápagos, sugiere que esta especie ha pasado por un posible evento de cuello de botella, pero que se encuentra en un proceso de expansión. Es decir, el número de individuos se redujo de manera significativa en el pasado, existiendo una señal genética recuperada que corresponde a alelos raros (sobrevivientes) comparados con las expectativas de neutralidad (Sand et al, 2013). Los valores negativos de D de Tajima que pueden ser bajos para varias generaciones estarían sugiriendo una expansión post-cuello de botella (Sand et al, 2013). Es posible que otros eventos como barridos selectivos (selective sweeps) o selección purificadora (purifying selection) tengan el mismo efecto en los valores de D de Tajima, pero estos son difíciles de diferenciar (Durvasula, 2015). Por esta razón, es importante conocer la historia poblacional de esta especie para poder atribuir cuál de estos factores podría incidir en estos valores.

Se puede hablar de una posible reducción de individuos debido a un cuello de botella causado por actividad antropogénica como consecuencia de la caza. Sin embargo, Hoffman et al., (2016) sugieren que la explotación humana (caza), puede no haber sido lo suficientemente severa para reducir la diversidad genética entre individuos de una población de este tipo. Lopes et al., (2015) demuestran que la prueba de cuello de botella en las poblaciones del lobo fino de Galápagos no son una evidencia suficiente que sugiera que hubo una reducción en tamaño efectivo de la

población en años recientes. Por otro lado, se sostiene la hipótesis de que la reducción de la población del lobo fino de Galápagos puede estar asociada principalmente a eventos climáticos como El Niño. Se conoce que las poblaciones de pinnípedos responden rápidamente a los cambios en la disponibilidad de alimento, lo cual justifica que un cuello de botella en estas especies sea explicado por factores oceanográficos y meteorológicos (Hoffman et al., 2016).

Como referencia, Alava & Salazar (2006) mencionan que en general las especies de otáridos son vulnerables a estos eventos oceanográficos, provocando graves oscilaciones en el tamaño de sus poblaciones. Efecto que en las Islas Galápagos no es exclusivo para los pinnípedos, sino que es visible en varios vertebrados marinos; por ejemplo Nims *et al.*, (2008) destacan la baja diversidad genética que existe en las poblaciones de Pingüinos de Galápagos (*Spheniscus mendiculus*) producto del impacto del evento de El Niño en los años 80s y 90s. Además, Bollmer *et al.*, (2007) recalca que los pingüinos de Galápagos experimentan fuertes fluctuaciones poblacionales como respuesta a estos eventos, lo que ha provocado un decrecimiento en su población y debido al pequeño tamaño poblacional de esta especie y a los repetidos cuellos de botella, presentan menor variabilidad que otras especies tanto de pingüinos como demás especies continentales. Otro claro ejemplo, es el caso de las iguanas marinas de Galápagos (*Amblyrhynchus cristatus*), que durante los distintos eventos de El Niño se ven afectados en sus condiciones corporales, aumentando las hormonas de estrés que provocan cambios significativos en el comportamiento de crías y altas tasas de mortalidad (Steinfartz et al., 2007). El hecho de que exista un decrecimiento brusco poblacional o cuellos de botella, como los que han sido observados durante los últimos episodios de El Niño, provocan pérdidas de variación genética que van a aumentar las tasa de endogamia y en cierto

modo obstaculizar la capacidad que tienen estas poblaciones de adaptarse a cambios en el ambiente (Lande, 1994; Allendorf & Luikart, 2007).

Otro factor que puede provocar la falta de variación genética en el lobo fino de Galápagos puede ser la fuerte filopatría que presentan este tipo de especies. Según Lopes *et al.*, (2015) esta característica provoca que se reduzca el flujo génico el cual se ve mayormente pronunciado en el genoma mitocondrial heredado por la madre. Frankham *et al.*, (2002) mencionan que en caso de que exista una disminución en el número de hembras, afectará gravemente la diversidad genética local, lo que provocará que las poblaciones sean vulnerables tanto a factores genéticos (deriva o cuellos de botella); y ambientales como por ejemplo el evento de El Niño, aumentando de esta forma el riesgo de extinción de la especie.

Distribución geográfica y diversidad genética de la especie.

Los bajos niveles de π indican que hay haplotipos raros en bajas frecuencias por lo que se sugiere varios orígenes (colonizaciones) de las poblaciones desde varios puntos de origen (o de poblaciones diferentes), algo que no es tan factible en Galápagos; ya que la mayoría de especies endémicas han sido el resultado de una colonización con las tortugas de Galápagos (*Chelonoidis spp.*; Caccone *et al.*, 2002) y la iguana marina (*Amblyrhynchus cristatus*; Steinfartz *et al.*, 2011), de dos colonizaciones en las lagartijas de lava (*Microlophus spp.*; Benavides *et al.*, 2008) y la única reportada hasta la fecha, de tres colonizaciones independientes en geckos de Galápagos (*Phyllodactylus gilberti*; Torres-Carvajal *et al.*, 2016). Sin embargo, estos valores también sugieren que existe una alta conectividad al presentar pocas bases de diferencia entre los haplotipos de las diferentes poblaciones de distintas

localidades. El haplotipo A01 fue el único encontrado en los individuos de las nueve localidades y con la más alta frecuencia ($n=47$). Se podría sugerir entonces, que este haplotipo así como el resto que sobrevivieron a un potencial cuello de botella, sea el haplotipo ancestral que se dispersó rápidamente en las 4 islas donde esta especie se la encuentra actualmente. Por otra parte, los resultados muestran 4 haplotipos únicos en Fernandina, lo cual puede deberse a la ausencia de flujo genético de los individuos de Fernandina en comparación a las demás localidades. Estos resultados sugieren que dicha variación en el número de haplotipos observados en cada isla (únicos vs compartidos) pueden deberse a su situación geográfica dentro del archipiélago, o características oceanográficas como corrientes que influyan el movimiento de los individuos de una localidad a otra. Se conoce que la costa oeste de Fernandina tiene niveles de productividad primaria que se ven fuertemente influenciadas por la intensidad de la corriente fría de Cromwell (Palacios et al., 2006); por lo que se sugiere que los individuos pertenecientes a las localidades de Fernandina se vean regidos a permanecer en esta zona para aprovechar estos recursos. Además, se piensa que al ser especies territoriales no permiten que machos de otras colonias entren a sus zonas de forrajeo y reproducción, limitando el flujo de individuos a estas localidades y provocando un declive en la variación genética de la colonia. Otra hipótesis a este resultado es que de las 4 colonias muestreadas, las localidades que se encuentran en Fernandina se ubican geográficamente en la parte oeste del archipiélago, lo que en cierto punto podría ser un obstáculo de acceso para el resto de los individuos de las demás colonias. Se sugiere entonces, que los individuos de otras poblaciones para no tener un gasto energético mayor al momento de buscar su alimento, se muevan distancias relativamente cortas, lo que va a provocar que no exista flujo de individuos y un bajo intercambio genético.

En este contexto, la baja diversidad genética observada en este trabajo es un indicador del posible estado de conservación de la población del lobo fino de Galápagos, lo que demuestra que esta especie ha sido afectada y se encuentra vulnerable a los eventos ambientales característicos de la región. Situación que trae múltiples consecuencias a la eficacia biológica y ecológica de la especie, la cual con el tiempo podría aumentar su probabilidad de extinción (Lacy, 1997). Como referencia el estudio de Riofrio-Lazo *et al.*, (2017) describe el estado poblacional del lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaeki*) y cómo estas poblaciones han sufrido un decrecimiento poblacional relacionado a los efectos oceanográficos como los episodios de El Niño, disturbios antropogénicos como la pesca, la contaminación marina, enfermedades, y la degradación y pérdida del hábitat. Además, el estudio muestra la vulnerabilidad que presenta esta especie a las variaciones climáticas del ecosistema y como el incremento en la frecuencia del evento de El Niño puede llegar a limitar la recuperación de esta población (Riofrio-Lazo *et al.*, 2017). Siendo entonces el lobo marino de Galápagos una especie con características similares, estos factores podrían también estar influyendo la dinámica poblacional y la conservación de la misma.

CONCLUSIONES

1. Basado en la red de haplotipos no hay una estructura genética marcada en las 4 islas de estudio.
2. El valor de D de Tajima nos indica que la población de lobos finos de Galápagos se encuentra en un proceso de expansión después de un posible cuello de botella.
3. Se sugiere una posible reducción de individuos debido a un cuello de botella asociado principalmente a eventos climáticos como el evento de El Niño o a la fuerte filopatría que presenta esta especie.
4. Se recomienda realizar estudios a las poblaciones de lobo fino de Galápagos antes, durante y después de un evento oceanográfico o ambiental que pueda afectar a la especie; con el fin de conocer el estado poblacional de la especie y tomar medidas de conservación.
5. Se necesitan más estudios a fondo sobre filogeografía y genética de especies de Galápagos para entender de mejor manera los patrones de la diversidad genética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alava, J. Salazar, S. (2006). Status and Conservation of Otariids in Ecuador and the Galápagos Islands. *Sea Lions of the World*, 6(1): 495-519.
- Allendorf, F. Luikart, G. (2007). Conservation and the genetics of populations. *Malden*: 642
- Avise, J. (2006). Evolutionary Pathways in Nature: A phylogenetic approach. *Cambridge University Press*, New York (286 pp.)
- Benavides, E. Baum, R. Snell, H. Snell, H.L. Sites, J. (2008). Island Biogeography of Galápagos Lava Lizards (Tropiduridae: *Microlophus*): Species diversity and colonization of the Archipelago. *Evolution*: 63(6): 1606-1626.
- Bollmer, J. Vargas, F. Parker, P. (2007). Low MHC variation in the endangered Galápagos penguin (*Spheniscus mendiculus*). *Springer*, 59: 593-602.
- Caccone, A., Gentile, G., Gibbs, J.P., Fritts, T.H., Snell, H.L., Powell, J.R. (2002). Phylogeography and history of giant Galápagos tortoises. *Evolution* 56, 2052–2066.
- Chaves, J. A. (2017). Connectivity, population structure, and conservation of Ecuadorian green sea turtles. *Endang Species*, 32, 251-264.
- Clark, T. (1979). Mammals in the seas: Pinniped species summaries and report on sirenians. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Costa, D.P., Weise, M.J., Arnould, J.P. (2006). Potential Influences of Whaling on the Status and Trends of Pinniped Populations. *University of California Press*, Berkeley, USA.

- Cowles, T. J., R. T. Baber y O. Guillen, 1977. Biological Consequences of the 1975 El Niño. *Science*, 195: 285–287.
- Duffie, C. Glenn, T. Vargas, H. Parker, P. (2009). Blackwell Publishing Ltd Genetic structure within and between island populations of the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology*, 18: 2103-2111.
- Durvasula, A. (2015, Febrero 18). *Interpreting Tajima's D*. Retrieved from WordPress: <https://arundurvasula.wordpress.com/2015/02/18/interpreting-tajimas-d/>
- Florez, A. (2009). Estructura Poblacional y Filogeografía de *Cucurbita moschata*. *Universidad Nacional de Colombia, Palmira*.
- Forcada J, Hoffman JI (2014) Climate change selects for heterozygosity in a declining fur seal population. *Nature* 511:462–465
- Frankham R, Balou JD, Briscoe DA. (2002.) Introduction to conservation genetics. *Cambridge University Press, Cambridge*
- Gentry, R.L., Kooyman, G.L., 1987. Fur Seals: Maternal Strategies on Land and at Sea. *Princeton University Press, Princeton, USA*.
- Harley, C. Randall, A. Hultgren, K. Miner, B. Sorte, C. Thornber, C. Rodriguez, L. Tomanek, L. Williams, S. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9: 228-241.
- Higdon, J. Bininda, O. Beck, R. & Ferguson, S. (2007). Phylogeny and divergence of the pinnipeds (Carnivora: Mammalia) assessed using a multigene dataset. *BMC Evolutionary Biology*, 7(216). doi:10.1186/1471-2148-7-216
- Hoffman, J. Kowalski, G. Klimova, A. Eberhart-Phillips, L. Staniland, I. Baylis, A. (2016). Population structure and historical demography of South American sea lions provide insights into the catastrophic decline of a marine mammal population. *Royal Society Open Science*, 3: 1-17

- Jeff W Higdon, O. R.-E. (2007). Phylogeny and divergence of the pinnipeds (Carnivora: Mammalia) assessed using a multigene dataset. *BMC Evolutionary Biology*, 7(216). doi:10.1186/1471-2148-7-216
- Jeglinski, J. Wolf, J. Werner, C. Costa, D. Trillmich, F. (2015). Differences in ecology align with genetically divergent ecotypes of a highly mobile marine top predator. *Springer*, 179: 1041-1052.
- Jensen, M. P. (2010). *Assessing the composition of green turtle (Chelonia mydas) foraging grounds in Australasia using mixed stock analyses*. Doctoral dissertation. University of Canberra, Australia.
- Lacy, R. (1997). Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammology*, 78(2): 320-335]
- Lande. R. (1994). Risk of Population Extinction from Fixation of New Deleterious Mutations. *Evolution*, 48: 1460-1469.
- Lanterbecq, D. Glaberman, S. Vitousek, M. Steinfartz, S. Benavides, E. Wikelski, M. Caccone, A. (2010). Genetic Differentiation between Marine Iguanas from Different Breeding Sites on the Island of Santa Fé (Galápagos Archipelago). *Journal of Heredity*, 101(6):663-675
- Lopes, F. J. (2015). Fine-scale matrilineal population structure in the Galapagos fur seal and its implications for conservation management. *Springer*, 15. doi:10.1007/s10592-015-0725-1
- Morrison, D. List, M. Iersel, L. Kelk, S. (2013, Septiembre 25). *How do we interpret a rooted haplotype network?* Retrieved from Phylonetworks: <http://phylonetworks.blogspot.com/2013/09/how-do-we-interpret-rooted-haplotype.html>

- Nigel, W. (1984). Seals of the Galapagos Islands. *Biological Journal of the Linnean Society*, 21: 177-184.
- Nowak, R. (1999). Walker's Mammals of the World. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press.
- Oliveira, L. Hoffman, J. Hingst-Zaher, E. Majluf, P. Muelbert, M. Stenghel, J. Amos, W. (2007). Morphological and genetic evidence for two evolutionarily significant units (ESUs) in the South American fur seal, *Arctocephalus australis*, *Springer*, 9: 1451-1466.
- Páez-Rosas, D. Aurióles, D. Alava, J. Palacios, D. (2012). Stable isotopes indicate differing foraging strategies in two sympatric otariids of the Galapagos Islands. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 424-425: 44-52.
- Palacios, D. Bograd, S. Foley, D. Schwing, F. (2006). Oceanographic characteristics of biological hot spots in the North Pacific: A remote sensing perspective. *Deep-Sea Research*, 53: 250-269.
- Repenning, C. Peterson, R. Hubbs, C. (1971). Contributions to the systematics of the southern fur seals with particular reference to the Juan Fernandez and Guadalupe Species. *Antarctic Pinnipedia* 18: 1-34
- Riedman, M. (1990). *The pinnipeds: seals, sea lions, and walruses* (No. 12). Univ of California Press.
- Riofrío-Lazo, M. Arreguín-Sánchez, F. Páez-Rosas, D. (2017). Population Abundance of the Endangered Galapagos Sea Lion *Zalophus wollebaeki* in the Southeastern Galapagos Archipelago. *Plos One*, 12(1):1-18.
- Roden, S. E., Morin, P. A., Frey, A., Balazs, H., Zarate, P., Cheng, I and P. H, Dutton. (2013). Green turtle population structure in the Pacific: new insights from single

- nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Endangered Species Research*, 20: 227-234.
- Sand, T. Moltke, I. Albrechtsen, A. & Nielsen, R. (2013). Calculation of Tajima's D and other neutrality test statistics from low depth next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 14(289). doi:10.1186/1471-2105-14-289
- Shields, WM. (1982). *Philopatry, inbreeding and the evolution of sex*. State University of New York Press, New York.
- Snell, M. H., P. A. Stone y H. L. Snell. (1996). A Summary of Geographical Characteristics of the Galapagos Island. *Journal of Biogeography*, 23: 619–624.
- Steinfartz, S. Glaberman, S. Lanterbecq, D. Marquez, C. Rassmann, K. Caccone, A. Genetic Impact of a Severe El Nino Event on Galápagos Marine Iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*). *Plos One*, 2(12).
- Teacher, A. &. (2011). HapStar: automated haplotype network layout and visualization. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 151-153. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02890.x
- Torres-Carvajal, O. Rodríguez-Guerra, A. Chaves, J. (2016). Present diversity of Galápagos leaf-toed geckos (*Phyllodactylidae:Phyllodactylus*) stems from three independent colonization events. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 103:1-5
- Trillmich, F., (1979). Galapagos sea lions and fur seals. *Noticias de Galapagos*, 29: 8-14.

- Trillmich, F., D. Limberger. (1985) Drastic effects of El Niño on Galapagos pinnipeds.. *Oecologia*, 67: 19-22.
- Trillmich, F. (1987). *Galápagos fur seal: Arctocephalus galapagoensis*. In: Croxal PL, Gentry RL (eds) *Status, biology and ecology of fur seals*. Proceedings of an international symposium and workshop, Cambridge, pp 23–27
- Trillmich, F. Dellinger, T. (1991). The effects of El Niño on Galápagos pinnipeds. In: Trillmich F, Ono KA (eds) *Pinnipeds and El Niño: responses to environmental stress*. Springer, Berlin, pp 66–74
- Trillmich, F. Ono, K. DeLong, R. Feldkamp, S. Francis, J. Gentry, R. Heath, C. LeBouef, B. Majluf, P. York, A. (1991). The Effects of El Niño on Pinniped Populations in the Eastern Pacific. *Springer*, pp 247-270.
- Trillmich, F. (1996). Parental Investment in Pinnipeds. In: *Advances in the Study of Behavior*, 25: 533-577
- Trillmich, F., G. Kooyman. (2001). Field metabolic rate of lactating female Galápagos fur seals (*Arctocephalus galapagoensis*): the influence of offspring age and environment. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129: 741-749
- Trillmich, F. (2015). *IUCN*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T2057A45223722.en>
- Valdés, J. (2015). Filogeografía de las Poblaciones de Tortuga Verde (*Chelonia*. 1-58.
- Wolf, J. Tautz, D. Trillmich, F. (2007). Galápagos and Californian sea lions are separate species: Genetic analysis of the genus *Zalophus* and its implications for conservation management. *Frontiers in Zoology*: 4:20

Wolff, M. Ruiz, D. Taylor, M. (2012). El Niño induced changes to the Bolivar Channel ecosystem (Galapagos): comparing model simulations with historical biomass time series. *Marine Ecology Progress Series*, 448: 7-22.

Wynen LP, Goldsworthy SD, Guinet C, Bester MN, Boyd IL, Gjertz I, et al. (2000). Postsealing genetic variation and population structure of two species of fur seal (*Arctocephalus gazella* and *A. tropicalis*. *Mol. Ecol.* 2000; 9:299–314. doi:10.1046/j.1365-294x.2000.00856.x.

ANEXO A: TABLAS

Tabla 1. Número total de individuos muestreados por localidad por Isla.

ISLA	LOCALIDADES	# INDIVIDUOS	TOTAL
Isabela	Punta Albemarle	12	25
	Punta Flores	7	
	Cabo Marshall	6	
Fernandina	Cabo Douglas	15	30
	Cabo Hammond	15	
Pinta	Cabo Chalmers	8	15
	Cabo Ibbetson	7	
Santiago	Puerto Egas	10	10
TOTAL			80

Tabla 2. Concentración de reactivos para PCR con primers ITS

Reactivo	Concentración
ADN	2 μ l
10x Buffer	5 μ l
10mM dNTPS	2 μ l
MgCl ₂	4 μ l
Primer F	2 μ l
Primer R	2 μ l
TAQ	1 μ l
H ₂ O	32 μ l
TOTAL	50 μl

Tabla 3. Programación de termociclador para la amplificación de las muestras con los primers R3 (L15926) THR, TDKD (H16498)

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
94°C	5 min	
94°C	45 seg	35 ciclos
54°C	30 seg	
72°C	45 seg	
72°C	7 min	

Tabla 4. Secuencias de GenBank de la región control de ADNmt para cada haplotipo proveniente de Isabela y Fernandina, estudio de Lopes et al, (2015).

Haplotypes	Individuals	GenBank accession numbers	Frequencies	Localities	Islands
Ag1	FH01, FH06, FH07, FH08, FH15, FH17, FH24, FH25, FH27, FH28, FH30	KM030335	11	Cape Hammond	Fernandina
Ag2	FH02, FH09, FH18, FH23, FH29	KM030336	5	Cape Hammond	Fernandina
Ag3	FH03, FH05, FH11, FH14, FH16, FH20, FH21, FH22, FH26, IB07, IB12, IB13, IB16, IB17, IB22, IB23, IB26, IB27, IB29, IM01, IM19, IM23, IM24, IM25, IM28	KM030337	25	Cape Hammond Banks Bay Cape Marshall	Fernandina Isabela
Ag4	FH04	KM030338	1	Cape Hammond	Fernandina
Ag5	FH10, IB05, IB19, IM03, IM08, IM16, IM17, IM18, IM20	KM030344	9	Cape Hammond Banks Bay Cape Marshall	Fernandina Isabela
Ag6	FH12, FH19, IB01, IB03, IB04, IB06, IB11, IB15, IB18, IB20, IB24, IB25	KM030346	12	Cape Hammond Banks Bay	Fernandina Isabela
Ag7	FH13	KM030347	1	Cape Hammond	Fernandina
Ag8	IB02, IB08, IB09, IB28	KM030366	4	Banks Bay	Isabela
Ag9	IB10, IB21	KM030374	2	Banks Bay	Isabela
Ag10	IB14 IB30	KM030394	2	Banks Bay	Isabela
Ag11	IM02, IM04, IM09, IM12, IM13, IM14, IM21, IM22	KM030396	8	Cape Marshall	Isabela
Ag12	IM05, IM06	KM030400	2	Cape Marshall	Isabela
Ag13	IM07, IM10, IM11, IM15	KM030401	4	Cape Marshall	Isabela
Ag14	IM27	KM030421	1	Cape Marshall	Isabela

Tabla 5. Lista de individuos de *Arctocephalus galapagoensis* que comparten cada haplotipo de la región control del ADN mitocondrial. Frecuencia total de la muestra y distribución geográfica de los haplotipos; en donde los datos subrayados pertenecen a las muestras del estudio de Lopes et al, (2015).

Haplotipos	Individuales	Frecuencias	Localidades	Islas
A04	A04, A08, C25, C26, D05, S09, <u>KM030344</u>	<u>15</u>	Punta Albemarle Punta Flores <u>Banks Bay</u> Cape Douglas Cape Hammond Puerto Egas	Isabela Fernandina Santiago
C01	C01, C30, CH01, S03, S04, S08, S10, <u>KM030396</u>	<u>15</u>	Cape Chalmers Cape Ibbetson Cape Marshall Puerto Egas	Pinta Isabela Santiago
C05	C05, CH06	2	Cape Chalmers Cape Ibbetson	Pinta
C23	C23, C33, <u>KM030401</u>	<u>6</u>	Punta Flores Cape Marshall	Isabela
A09	A09, C02, C08, C21, C22, CH03, CH04, CH05, CH07, <u>KM030400</u>	<u>11</u>	Punta Albemarle Punta Flores <u>Cape Marshall</u> Cape Chalmers Cape Ibbetson	Isabela Pinta
A01	A01, A03, A05, A10, A12, C03, C04, C24, C29, C31, CH02, D01, D03, D04, D14, D15, H06, H08, H11, H12, S02, <u>KM030337</u> , <u>KM030421</u>	<u>47</u>	Punta Albemarle Punta Flores Cape Marshall <u>Banks Bay</u> Cape Chalmers Cape Ibbetson Cape Douglas Cape Hammond Puerto Egas	Isabela Pinta Fernandina Santiago
D02	D02, D09, <u>KM030346</u> , <u>KM030394</u>	<u>16</u>	Cape Douglas Cape Hammond <u>Banks Bay</u>	Fernandina <u>Isabela</u>
A06,	A06, <u>KM030366</u>	<u>5</u>	Punta Albemarle <u>Banks Bay</u>	Isabela
H09	H09, H10, <u>KM030336</u>	<u>7</u>	Cape Hammond	Fernandina
D07	D07, D08, D11, D12, H01, H02, H03, H07, <u>KM030335</u>	<u>19</u>	Cape Douglas Cape Hammond	Fernandina

ANEXO B: FIGURAS

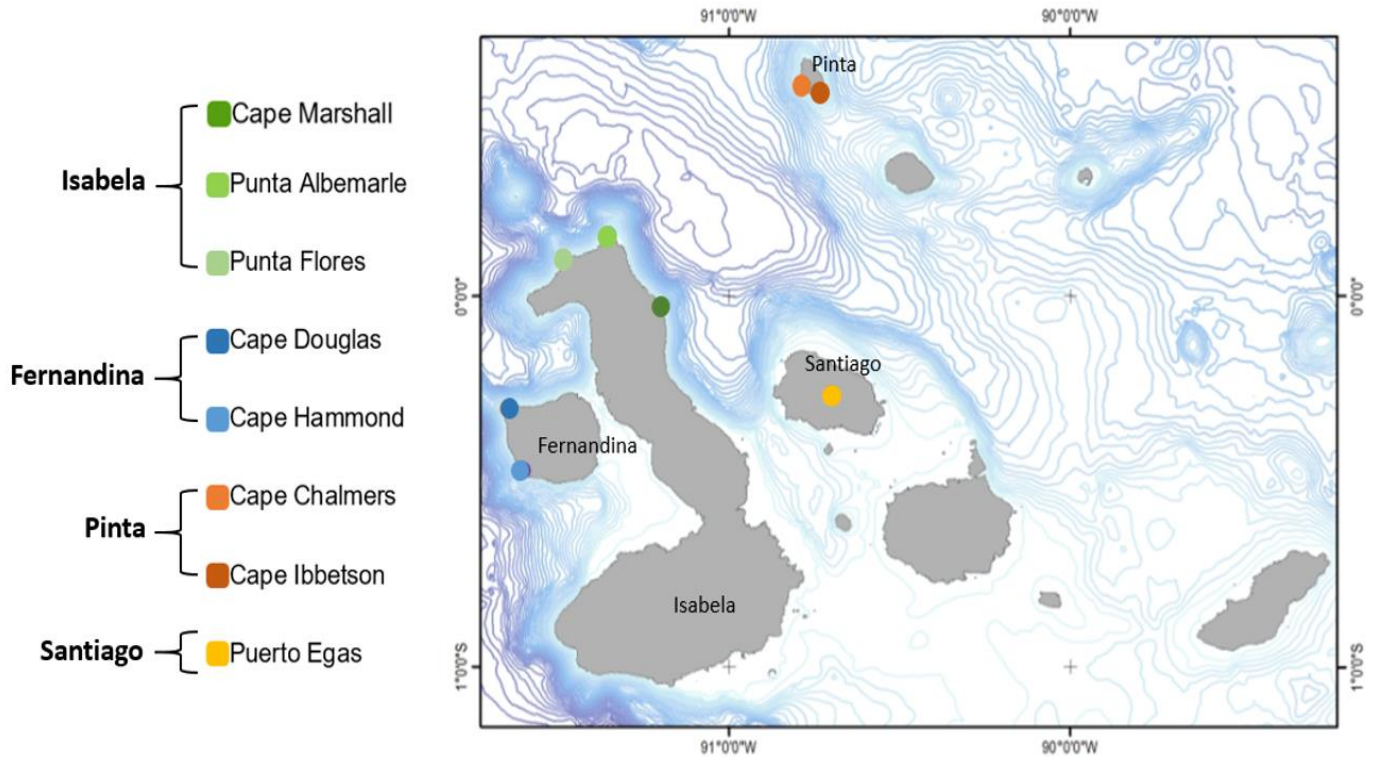


Figura 1. Mapa del área de estudio del lobo fino de galápagos

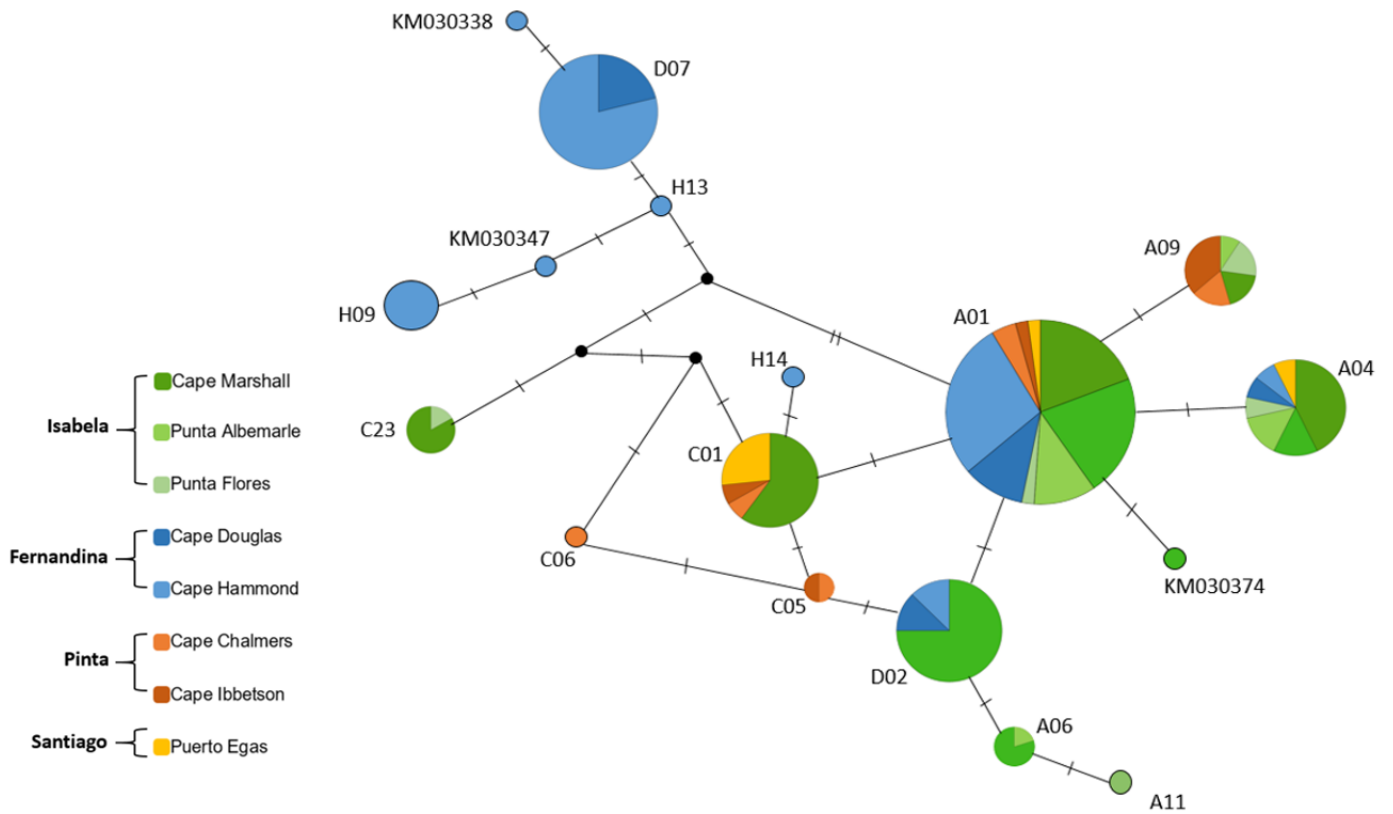


Figura 2. Representación gráfica de la red de haplotipos de *Arctocephalus galapagoensis*

