

UCH-FC  
DOC-EBE  
P438  
C1

**VARIACIÓN GEOGRÁFICA Y DETERMINANTES  
DE LA DISTRIBUCIÓN DEL DELFÍN CHILENO,  
*CEPHALORYNCHUS EUTROPIA* (GRAY 1846):  
APROXIMACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR**



Tesis  
Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Ecología Y Biología Evolutiva

Facultad De Ciencias

Por

**MARÍA JOSÉ PÉREZ ÁLVAREZ**

Septiembre, 2013

**Directores de Tesis:**

**Dr. Elie Poulin  
Dr. Mauricio Canals**

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la  
Tesis de Doctorado presentada por la candidata

MARÍA JOSÉ PÉREZ ÁLVAREZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para  
optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva  
en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 3 de Septiembre de 2013.

Directores de Tesis:

Dr. Elie Poulin

Dr. Mauricio Canals

Two handwritten signatures in blue ink. The first signature is above a dotted line, and the second is below it.

Comisión de Evaluación de la Tesis

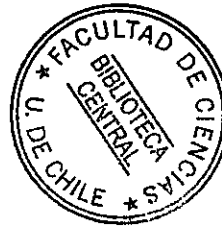
Dr. David Véliz

Dr. Felipe Hinojosa

Dr. Eduardo Palma

Dr. Carlos Olavarría

Three handwritten signatures in blue ink, each above a dotted line. The third signature is the most prominent and appears to be "Eduardo Palma".



*".....Títeres que al compás de tus dedos  
se elevan mostrándome con su elegante simpleza,  
tu presencia"*

## RESUMEN BIOGRÁFICO



Haber crecido en San Javier y visitar frecuentemente la costa de Constitución, en la región del Maule, claramente marcó mi interés por el mar, por lo que ingresé a la Carrera de Biología Marina de la Universidad de Valparaíso. Durante el desarrollo de la carrera, participé en diferentes áreas de investigación marina, sin embargo, el avistar directamente "toninas" en el Puerto Maguillines, Constitución, e interactuar permanentemente con pescadores artesanales, marcó mi inclinación y desafío profesional. Posteriormente, concreté mi Tesis de Pregrado relacionada con la identificación morfológica y análisis espacio-temporal del delfín chileno, participando en mis primeros congresos científicos internacionales. Luego, con la finalidad de perfeccionarme en la ejecución de proyectos relacionados con mamíferos marinos participé fuera de Chile, en proyectos dirigidos por investigadores reconocidos internacionalmente. Con lo aprendido comenzó el desafío de poner en marcha en Chile, proyectos de investigación en mamíferos marinos, para lo que en conjunto con colegas de la U. de Valparaíso, creamos una Corporación sin fines de lucro (Eutropia), la cual dirijo hasta la actualidad. Mediante esta institución y en convenio con la U. de Valparaíso y U. Católica del Maule participé en diversos proyectos científicos, de educación ambiental y turismo sustentable, así como docente en temas relacionados con ecología de mamíferos marinos y programas educacionales nacionales (Educación de Talentos, en P.U. Católica y U. Católica de Valparaíso).

El año 2008, ingresé al Doctorado de Ecología y Biología Evolutiva de esta Facultad con la finalidad de perfeccionarme con estudios de postgrado, donde bajo la dirección y apoyo del Dr. Elie Poulin y del Dr. Mauricio Canals, finalizo hoy con orgullo, lo que ha sido mi Tesis Doctoral. Proceso que no exento de dificultades, ha permitido una serie de convenios a nivel nacional e internacional, pasantías, asistencias a congresos, intercambio de ideas y pensamientos de proyectos presentes y futuros, pero que por sobre todo me ha permitido interactuar con un equipo de una gran calidad humana que se traduce en un importante crecimiento profesional y por sobre todo personal.



## AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se realizó gracias al apoyo económico otorgado por: Beca de Tesis Doctoral CONICYT AT-24100074, Beca de mantención CONICYT, MECESUP UCH0803, Proyectos IEB ICM P05-002 and PFB 023, Centro de Investigación Eutropia, Proyecto INNOVA-CORFO PN Bernardo O'Higgins (CEQUA) y "Expedición Fitz Roy" compañía de turismo. La obtención de material biológico se realizó bajo los Permisos de Investigación de Subsecretaría de Pesca, RES 334/2012 y RES 665/2009 extendida por RES 67/2010.

Para comenzar me gustaría agradecer a la Comisión Evaluadora de Tesis, por sus comentarios desde la presentación del Proyecto de Tesis hasta el escrito final. Muy especialmente agradezco a mis Directores de Tesis, Dr. Elie Poulin, por su constante apoyo durante el Doctorado, por haber creído en este proyecto un tanto inalcanzable en sus inicios, por todo su entusiasmo, tiempo y dedicación, por su aporte intelectual y personal y por guiarme en poder concretar esta Tesis. Al Dr. Mauricio Canals, por apoyarme desde el ingreso al Doctorado, por su ayuda a darle forma a un estudio morfométrico cuando aún no teníamos nada concreto, por su confianza y consejos tanto personales como académicos.

Agradezco a los amigos y colegas que conocí durante estos años. A Claudio por su crucial apoyo en el trabajo en laboratorio y comentarios posteriores, a Claudia (Matu) y Fabiola por aguantarme lo catete con todas las compras de partidores y preguntas múltiples, a Jimena, Angie, Constanza y Pablo por sus consejos y "tips" para que las extracciones resultaran, a Mathias, por sus sugerencias y aportes en la discusión de esta Tesis, a Diego, Andrea, Cecilia y Christian por completar el cálido grupo humano que forma el Laboratorio de Ecología Molecular. A Rodrigo Moreno por su aporte y apoyo en distintas fases de este Doctorado. Al Dr. Sabat y Seth Newsome por toda su sabiduría y ayuda "isotópica"; por los gratos momentos a Andrés, Daniela, Hugo, Mónica, Gonzalo, Mariana, Carmen y Cristóbal. A Claudio Veloso, por su constante apoyo y consejos. En especial quiero agradecer a Carolina Simon por sus conocimientos y momentos de discusión de los "huesos raros". A Grisel, Daniel, Natalia y Angie por todos los nervios y amistad compartida y por acompañarnos hasta este punto.

Quiero agradecer a las colaboraciones internacionales, especialmente al Dr. Scott Baker, Becca Hamner, Debbie Steel, Angie Sremba, Alana Alexander, Lida Pimper por su valioso aporte y

conocimiento. A las personas encargadas de las colecciones óseas visitadas, entre ellos a Charley Potter, Smithsonian Institution NMNH, Washington USA; Herman Nuñez, Museo Nacional de Historia Natural, Santiago y José Luis Brito, Museo de Ciencias Naturales de San Antonio. A todos quienes colaboraron con la difícil tarea de toma de muestras, a los pescadores artesanales de al menos 8 caletas a lo largo de Chile. A Jorge Gibbons, Valeria Sabaj, Juan Capella, Jorge Oporto, Olivia Blank, Juan José Salas por su apoyo y aporte en distintas fases de ejecución de este proyecto.

A mis amigos y equipo de trabajo: A Maritza, por su constante apoyo, amistad y ayudarme a tener "paz" durante la redacción de esta Tesis. A Macarena, por toda su ayuda, amistad, nervios en el bote y fuera de él; a Rodrigo, por su entusiasmo, esfuerzo y logros en la obtención de muestras; a Gabriela, Guido y Lily por su apoyo en terreno; a la Pali y al Lucho. A Carlos por su empuje, ayuda, motivación y colaboración en todas las fases de este proyecto y por sobre todo por los años de amistad. A Paula, su importante presencia, conversaciones y apoyo.

Me gustaría agradecer muy especialmente, el permanente apoyo, cariño y comprensión de mi familia; a quién me acompaña y contiene en mis alegrías y pataletas y me enseñó y enseña con toda su fuerza a "pelear y levantarse", mi mamá. Finalmente, agradezco a mi mini-familia, a mi esposo Rodolfo por toda su paciencia, ayuda y amor; y a mi hijita por acompañarme en silencio durante toda la redacción de esta Tesis y darme las energías y motivación necesarias para culminar este proceso.

## INDICE DE MATERIAS

<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I:</b> Strong genetic and phylogeographic structure in the endemic Chilean dolphin, <i>Cephalorhynchus eutropia</i> : Identification of population units.....	20
<b>CAPITULO II:</b> Variación geográfica en odontocetos: Análisis de morfometría craneal de <i>Cephalorhynchus eutropia</i> a lo largo de su distribución.....	54
<b>CAPITULO III:</b> Biogeografía histórica de <i>C. eutropia</i> : Impacto de los ciclos glaciales sobre la distribución y la diversidad genética del delfín chileno .....	107
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	143

## LISTA DE TABLAS

### CAPITULO I

**Table 1.** Genetic variability at 21 microsatellite markers and 663 bp (mtDNA control region) in the Chilean dolphin along its distribution range. N number of samples, Hap N number of haplotypes, Hap r number of haplotypes after rarefaction, h haplotype diversity, nucleotide diversity, Na average number of alleles, AR allelic richness (average number of alleles adjusted for sample size), He expected heterozygosity, Ho observed heterozygosity.

**Table 2.** Mitochondrial haplotype frequency of Chilean dolphins per population (North and South) and overall study area.

### CAPITULO II

**Tabla 1.** Clave para identificación de cráneos de *Cephalorhynchus eutropia* y de cráneos de cetáceos del Pacífico Sureste (extraída de Reyes *et al.* 1997)

**Tabla 2.** Lista de medidas craneales realizadas en *C. eutropia* (Modificadas de Perrin 1975, (Ramos *et al.* 2002, Bell *et al.* 2002, Molina 2006, Simon Gutstein 2009, Mead y Fordyce 2009).

**Tabla 3.** Contribución de las 31 variables craneométricas a los 4 Primeros Componentes Principales que explican el 65% de la varianza de los datos.

**Tabla 4.** Ejemplo de medidas obtenidas para la Cresta Supraoccipital (SOCH) de ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia* provenientes de San Antonio, Constitución y Punta Arenas.

**Tabla 5.** Ejemplo de medidas obtenidas para la Fosa anexa al canal óptico (VF) de ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia* provenientes de San Antonio, Constitución y Punta Arenas.

**Tabla 6.** Valores promedio de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  ( $\pm\text{DE}$ ) para las muestras hueso de *Cephalorhynchus eutropia* en Latitudes Norte, Latitudes Intermedias y Latitudes Sur.

### CAPITULO III

**Tabla 1.** Frecuencias haplotípicas de ADN Mitocondrial para *C. eutropia* en toda el área de estudio, Zona Austral y Boreal.

**Tabla 2.** Diversidad genética (663 bp ADNmt de la región control) para el delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución. N: Número de muestras, Hap N: Número de haplotipos, Hap r: Número de haplotipos después de rarefacción, h: Diversidad haplotípica y  $\pi$ : Diversidad nucleotídica.

**Tabla 3.** Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) considerando un total de 8 localidades de muestreo distribuidas en la Zona Boreal y Zona Austral a lo largo de la distribución del delfín chileno.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUCCION GENERAL

**Figura 1.** Límites de la Masa de Hielo durante el Último Máximo Glacial (UMG) en Océano Pacífico (Modificado de Hulton 2002).

**Figura 2.** Hipótesis de origen y dispersión del género *Cephalorhynchus* (extraído de Pichler *et al.* 2001).

**Figura 3.** Delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia*.

### CAPITULO I

**Figure 1.** Sampled areas of Chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* along the Chilean coast. Circles correspond from north to south to: San Antonio, Constitución, Concepción, Maullín, Aysén, Bernardo O'Higgins, Puerto Natales and Punta Arenas.

**Figure 2.** Bayesian clustering from STRUCTURE for the Chilean dolphin along its distribution (above) and Evanno method in STRUCTURE HARVESTER (below).

**Figure 3.** Median-joining network of mtDNA control region haplotypes of the Chilean dolphin along its distribution.

**Figure 4.** Posterior probabilities of population membership and genetic discontinuities from the spatial model in GENELAND for the Chilean dolphin along its distribution.

### CAPITULO II

**Figura 1.** Esquema- tipo de la vista dorsal de un cráneo de ejemplar de odontoceto, Familia Delphinidae (Modificado de Mead & Fordyce 2009).

**Figura 2.** Esquema- tipo de la vista ventral de un cráneo de ejemplar de odontoceto, Familia Delphinidae (Modificado de Mead & Fordyce 2009).

**Figura 3.** Esquema- tipo de la vista posterior (superior) y lateral (inferior) de un cráneo de ejemplar de odontoceto, Familia Delphinidae.

**Figura 4.** Localidades de procedencia de cráneos de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución. En orden latitudinal las localidades corresponden a San Antonio, Matanza, Constitución, Golfo de Arauco, Bahía de Corral, Chiloé y Punta Arenas.

**Figura 5.** Ejemplos de medidas craneales a realizadas en *Cephalorhynchus eutropia* (superior, modificado de Bell *et al.* 2002) y las medidas identificadas durante el desarrollo del presente estudio VF (inferior izquierda) y SOCH (inferior derecha).



**Figura 6.** Plano Factorial de los Componentes Principales 1 y 2 obtenidos al analizar 31 medidas craneométricas de individuos adultos de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución.

**Figura 7.** Plano Factorial de los Componentes Principales 3 y 4 obtenidos al analizar 31 medidas craneométricas de individuos adultos de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución.

**Figura 8.** Plano Factorial (MANOVA /CVA) de los Componentes Principales 1 y 2 obtenidas al analizar las medidas craneométricas EXNRT, GPMW, PW, OLI, SOCH, VF para ejemplares adultos (superior) y juveniles y adultos (inferior) de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución.

**Figura 9.** Análisis Discriminante sobre los Componentes Principales 1 y 2 para los grupos Norte y Sur de ejemplares adultos de *Cephalorhynchus eutropia*.

**Figura 10.** Análisis discriminante para las medidas craneométricas VF SOCH, EXNRT, PW y GPMW realizadas para individuos adultos de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución.

**Figura 11.** Análisis discriminante para las medidas craneométricas VF SOCH, EXNRT, PW y GPMW realizadas para individuos juveniles y adultos de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución.

**Figura 12.** Ejemplo de alturas de la Cresta Supraoccipital (SOCH) de ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia* provenientes de San Antonio (izquierda), Constitución (centro) y Punta Arenas (derecha).

**Figura 13.** Ejemplo de medida Ancho Máximo Premaxilar (GPMW), forámenes y fosas premaxilares presentes en ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia*.

**Figura 14.** Ejemplo de medida Ancho Máximo Parietal (PW) realizada en ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia*.

**Figura 15.** Fosa temporal (FT) y órbita ocular (O) de un ejemplar de *Cephalorhynchus eutropia*.

**Figura 16.** Ejemplo Fosas anexas al canal óptico (VF) de ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia* provenientes de San Antonio (superior), Constitución (medio) y Punta Arenas (inferior).

**Figura 17.** Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de para muestras de hueso de *Cephalorhynchus eutropia* provenientes de Latitudes Norte (San Antonio, color rojo) Latitudes Intermedias (Constitución, Concepción; color azul) y Latitudes Sur (Punta Arenas; color verde).

**Figura 18.** Esquema de estructuras blandas principales del complejo naso-frontal en Delphinidae. Bhl = orificio respiratorio, iv= vestibulo inferior, m=melón, ns= saco nasofrontal, ps= saco premaxilar, vs= saco vestibular (modificado de Mead 1975).

**Figura 19.** Esquema supraoccipital desarticulado de un cráneo de neonato (modificado de Mead & Fordyce 2009).

**Figura 20.** Esquema órbita ocular en Delphinidae (modificado de Mead & Fordyce 2009).

### CAPITULO III

**Figura 1.** Límites de la Masa de Hielo durante el Último Máximo Glacial (UMG) en Sudamérica (Modificado de Thorson 1999).

**Figura 2.** Localidades de muestreo para el delfín chileno, Chilean dolphin, *Cephalorhynchus eutropia*, a lo largo de la costa de Chile. Los círculos corresponden de Norte a Sur a: San Antonio, Constitución, Concepción, Maullín, Aysén, Bernardo O´Higgins, Puerto Natales y Punta Arenas.

**Figura 3.** Gel de visualización sexaje *C eutropia*. La obtención de dos bandas (445-224 bp) en el gel determina un individuo macho y de una banda (445bp) un individuo hembra.

**Figura 4.** Escenarios demográfico-históricos propuestos para el delfín chileno a lo largo de su distribución. El escenario 1 corresponde al "modelo refugio" y el 2 al "modelo recolonización. N: Tamaño poblacional; Nb: Tamaño poblacional reducido (cuello de botella o efecto fundador); t3: Inicio glaciación; t2: Inicio desglaciación; t1: Durante fase de desglaciación.

**Figure 5.** Probabilidad posterior de membresía o pertenencia y discontinuidad genética mediante el modelo especial GENELAND para el delfín chileno a lo largo de su distribución.

**Figura 6.** Red de haplotipos correspondiente a la región control de ADNmt de *C. eutropia* a lo largo de su distribución. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de individuos.

**Figura 7.** Distribución de diferencias entre pares de secuencias (Mismatch distribution) para secuencias de ADN Mitocondrial (Región control) de *Cephalorhynchus eutropia* para la Zona Austral.

**Figura 8.** Bayesian skyline plot para la Zona Boreal (superior) y Austral (inferior) del delfín chileno a lo largo de su distribución.

**Figura 9.** Análisis de componentes principales (PCA) sobre los dos escenarios demográfico-históricos propuestos para el delfín chileno a lo largo de su distribución. En color rojo se representa el Modelo Refugio y en verde el Modelo Recolonización. El color amarillo representa el set de datos observados.

**Figura 10.** Selección de escenarios histórico-demográficos propuestos para el delfín chileno a lo largo de su distribución mediante regresión logística, programa DYABC. El color verde representa el escenario 2 "Modelo Recolonización" y el color rojo el escenario 1 "Modelo Refugio".

## **Cantidades y simbología de las unidades de medida utilizadas**

Longitud: Kilómetro km, m, cm, mm

Volumen: Litro L, ml

Tiempo: Minuto min, seg, ms

Masa: Gramo kg, mg, ng, g

Concentración: Molaridad M, mM

Tamaño molecular: Pares de bases pb

Temperatura: Grados Celsius °C

## **Abreviaciones estándar**

DNA: Ácido desoxirribonucleico

D-loop: Región control de ADN mitocondrial

Fst: Índice de diferenciación poblacional

Hd: Diversidad haplotípica

$\pi$ : Diversidad nucleotídica

$\Pi$ : Número promedio de diferencias pareadas

K: Número de haplotipos

S: Número de sitios polimórficos

MCMC: Cadenas de Markov, Método Monte Carlo

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio

Taq: DNA Polimerasa

## RESUMEN

El estudio de la variación geográfica manifestada en distintos rasgos de los organismos ha sido de particular interés en los campos de ecología y evolución, principalmente por su importancia en ilustrar divergencias adaptativas dentro de una especie. Esta variación resulta paradójica en especies que presentan una alta capacidad móvil y habitan ambientes aparentemente homogéneos como es el caso de ambientes marinos, donde las barreras geográficas son menos evidentes que en ambientes terrestres. Adicionalmente, variaciones climáticas asociadas a los ciclos glaciales han influido en las variaciones geográficas, patrones biogeográficos y de distribución actual de muchas especies, en particular en las regiones polares y templadas frías. El delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia*, se distribuye a lo largo de la costa de Chile, abarcando dos ambientes biogeográficamente distintos: La zona norte (ZN; Valparaíso 33°02'S-Chiloé 42°00'S), conformada principalmente por costa expuesta, bahías y estuarios y la zona sur (ZS; Chiloé-Isla Navarino 55°00'S), compuesta principalmente por fiordos y canales que han sido afectados reiterativamente por períodos glaciales. Mediante análisis moleculares (ADN mt-Dloop y microsátélites) y de morfometría craneal, el presente estudio da cuenta de la variación geográfica latitudinal en los caracteres estudiados, así como de la estructuración y diversidad genética del delfín chileno. Así mismo, analiza la contribución de los ciclos glaciales, particularmente el Último Máximo Glacial (UMG) sobre los patrones de distribución, estructura poblacional y diversidad genética de la especie proponiendo un escenario demográfico-histórico. Se identifican dos unidades genéticas poblacionales para la especie (ZN y ZS), las cuales presentan índices de estructuración poblacional altos y significativos, indicando que ambas poblaciones tendrían en la actualidad un limitado o inexistente flujo génico. Similar patrón de agrupaciones ZN y ZS se obtuvo en base a medidas craneométricas, diferenciadas

significativamente mediante variables funcionales relacionadas con el ancho parietal, largo del rostro, altura de la cresta supraoccipital, ancho del premaxilar y presencia de fosas anexas al canal óptico, lo que sugiere que la variación geográfica podría ser resultado de especialización trófica y desarrollo de ecolocalización como consecuencia de adaptación a los diferentes ambientes. Adicionalmente, se encuentra un patrón craneométrico asociado a la Hipótesis de Productividad de Rosenweig, obteniendo una relación positiva entre medidas asociadas a tamaño corporal con zonas identificadas como de alta productividad en la costa chilena.

En un análisis a escala geográfica más reducida, la estructuración poblacional a nivel mitocondrial sugiere un significativo nivel de diferenciación intra-poblacional (entre localidades dentro de ZN y entre localidades dentro de ZS), lo que concuerda con el patrón de ordenación de individuos por localidad obtenidos mediante los análisis craneométricos y con los resultados preliminares de aproximación dietaria (isótopos estables), sugiriendo que no habría una superposición trófica entre localidades. Lo anterior concuerda con la conducta filopátrica y de desplazamientos reducidos descritos a nivel de género.

Finalmente, la señal genética obtenida de ADN mt-Dloop da cuenta de una menor diversidad haplotípica y nucleotídica para la Zona Austral lo que, sumado a la genealogía haplotípica y al ajuste de la distribución de diferencias entre pares de secuencias sugiere una expansión poblacional reciente para esta zona (11.000-16.000 años). Lo anterior es consecuente con la datación de ciclos glaciales reportada para estas latitudes, particularmente durante el UMG. Se propone que la distribución actual del delfín chileno se ajusta al modelo biogeográfico de Expansión-Contracción y que las poblaciones ubicadas al sur de su rango de distribución se habrían originado de manera posterior al retiro de los hielos, probablemente como resultado de un proceso de recolonización postglacial proveniente de las poblaciones ubicadas al norte, caracterizado por efectos fundadores y una rápida expansión poblacional. Esta investigación representa una importante contribución al estudio de la variación geográfica y la biogeografía histórica de los mamíferos marinos en el hemisferio sur y en particular de la única especie de



cetáceo endémica de Chile, destacando la importancia y utilidad de integración de herramientas de estudio como lo son análisis moleculares, morfométricos y de ecología trófica.

## ABSTRACT

The study of the geographic variation of organism traits has been of particular interest in the fields of ecology and evolution, partly because of its relevance in the adaptive divergence process within species. This variation is paradoxical in species with a high mobile capacity, within apparently homogeneous environments such as marine environments where geographic barriers are less evident than in terrestrial environments. Additionally, climatic variations associated with glacial cycles have influenced geographic variations, biogeographic patterns and current distribution of many species, particularly in polar and cold temperate regions. The Chilean dolphin, *Cephalorhynchus eutropia*, inhabit two different coastal areas: a northern area with exposed coastlines, bays and estuaries from Valparaíso (33°02'S) to Chiloé (42°00'S; NZ) and a southern area with highly fragmented inshore coastline, channels and fjords between Chiloé and Navarino Island (55°00'S; SZ), which has been affected repetitively by glacial periods. Using molecular analysis (mtDNA Dloop sequencing and microsatellite genotyping) and cranial morphometry, this study reports latitudinal geographic variation, population structure and genetic diversity of Chilean dolphin. It also analyzes the contribution of glacial cycles, particularly the Last Glacial Maximum (LGM) on the distribution patterns, population structure and genetic diversity of the species proposing a demographic-historical scenario.

Two genetic population units for the species (NZ and SZ) were identified. Genetic differentiation between these two populations was high and significant for both microsatellite and mtDNA, indicating little or no current gene flow. The same differentiation pattern (NZ and SZ) was obtained based on craniometric measures, significantly differentiated by functional variables related to the parietal width, rostrum length, supraoccipital crest height, premaxillary width and ventral fosses. That geographic variation may result from trophic specialization and echolocation

process development due to adaptation to different environments. Additionally, a positive relationship between proxies of body size measures and areas of high productivity along the Chilean coast (Rosenweig Productivity Hypothesis) was found.

Considering a more restricted geographic scale, intra-population genetic differentiation was found (between NZ localities and SZ localities), this is consistent with the craneometric geographic variation by localities and also with the preliminary results of the dietary approach (stable isotopes), suggesting that a trophic overlap between localities does not exist. These results are consistent with the philopatric behavior and the reduced geographical movements described for this genus.

Finally, the genetic signal from mtDNA Dloop shows lower values of both haplotype and nucleotide diversity for the SZ. This together with the haplotype genealogy and mismatch distribution suggests a recent population expansion for this area (11000-16000 years). This information is consistent with the dating of glacial cycles reported for these latitudes, particularly during the LGM. It is proposed that the current distribution of Chilean dolphin fits the Expansion-Contraction biogeographic model, and the southern population were originated from the northern populations after the retreat of ice cover, probably as a postglacial recolonization process, characterized by founder effects and populations growth. This research is an important contribution to the study of geographical variation and historical biogeography of marine mammals in the southern hemisphere, and in particular for the only endemic cetacean species of Chile. The importance and usefulness of an integrative study (molecular, morphometric and trophic ecology) is also highlighted.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La mayoría de los organismos varían geográficamente en morfología, fisiología, y comportamiento (Schnell *et al.* 1986), caracterización genética, emisión de sonidos, cargas parasitarias, contaminantes y dieta (Perrin 2002, Santos *et al.* 2004) entre otras características, siendo el análisis e identificación de estos patrones de variación, en conjunto con los patrones de distribución geográfica, fundamental desde un punto de vista ecológico y evolutivo dada su importancia en ilustrar divergencias adaptativas dentro de una especie (Schnell *et al.* 1986, Futuyma 1998). Esta variación resulta paradójica en especies que presentan una alta capacidad móvil y habitan ambientes aparentemente homogéneos como es el caso de ambientes marinos, donde las barreras geográficas son menos evidentes que en ambientes terrestres (Engelhaupt *et al.* 2009). Incluso en zonas donde los quiebres biogeográficos se encuentran históricamente definidos limitando el rango de distribución de diferentes taxa (Lomolino *et al.* 2010), algunas especies cruzan estos límites geográficos no presentando señal de diferenciación poblacional (como el gastrópodo *Concholepas concholepas*, Cárdenas *et al.* 2009; el crustáceo *Pleurocondes monodon*, Haye *et al.* 2010; y el cefalópodo *Dosidicus gigas*, Ibañez *et al.* 2011). En contraste otras (como *Acanthina monodon*, Sánchez *et al.* 2011; *Lessonia nigrescens*, Tellier *et al.* 2009) dependiendo de su capacidad de dispersión y persistencia a diferentes condiciones ambientales, muestran fuerte estructuración genética o a veces filogeográfica asociada a la presencia de quiebres biogeográficos (Dawson 2001). En este sentido, mientras que para algunas especies la discontinuidad genética es considerada una consecuencia de flujo génico limitado relacionado con patrones hidrográficos, topográficos y variables ambientales (Avice 1992, Ayre *et al.* 2009), para otras, los patrones biogeográficos no son predictores de diferenciación poblacional, encontrándose discordancia entre discontinuidad genética y límites biogeográficos (Burton *et al.* 1998).

Los cetáceos, mamíferos marinos altamente móviles, presentan distintos tipos de patrones de distribución geográfica y de desplazamiento lo que se traduce en una compleja gama de variaciones geográficas. Algunas especies se distribuyen alrededor de prácticamente todos los océanos (distribución cosmopolita), como es el caso por ejemplo de de ballenas jorobadas, *Megaptera novaeangliae* y ballenas azules, *Balaenoptera musculus*, entre otros (Berta *et al.* 2006, Leduc 2009). Otras presentan distribuciones restringidas a ciertos ambientes, destacándose la distribución circumpolar, como el caso del narval *Monodon monoceros* y la beluga *Delphinapterus leucas*; la distribución antitropical, como el género *Lissodephis*; o endémica como las especies del género *Cephalorhynchus* (Berta *et al.* 2006, Leduc 2009). En cuanto al rango de desplazamientos geográficos, algunas especies realizan largas migraciones, generalmente entre áreas de reproducción invernales en bajas latitudes y de alimentación estivales en altas latitudes, como es el caso de la ballena jorobada, *Megaptera novaeangliae* (Kellogg 1929, Matthews 1937) mientras que otras, presentan rangos de movimientos restringidos, como por ejemplo poblaciones locales de *Tursiops truncatus* en Sudáfrica (Ross 1977) o delfines de la familia Platanistidae, restringidos a sistemas rivereños (Hoelzel 1998).

En odontocetos se cuenta con un amplio registro de variación geográfica en distancias relativamente cortas (Amano and Miyazaki 1992, Perrin and Brownell 1994, Perrin 2003, Jefferson & Van Waerebeek 2004, Lazaro *et al.* 2004). En cuanto a caracteres morfológicos, el tamaño corporal, forma y tamaño de la aleta dorsal y patrón de coloración tiende a variar geográficamente a nivel intra-específico (Perrin 1984). Variación geográfica a nivel de caracteres craneales generalmente se asocia a variación en tamaño y número de dientes, longitud y ancho de la región rostral y orbital y tamaño de la fosa temporal (Amano & Miyazaki 1992, Perrin 2002, Perrin 2003, Molina-Schiller 2006). Dichas variaciones estarían asociadas probablemente a



especializaciones tróficas y desarrollo de ecolocalización, respuestas evolutivas resultantes de las características del hábitat y de la estructura social de la especie (Amaral 2009).

En cuanto a la variación geográfica y estructuración poblacional, Pichler *et al.* (1998) mencionan que como patrón general, poblaciones de cetáceos no presentarían diferenciación genética a escalas geográficas reducidas en ausencia de barreras geográficas. Sin embargo, el patrón y el grado de diferenciación genética entre poblaciones no es predecible en base a los patrones geográficos de distribución de las especies, dependiendo de una compleja interacción entre historia de vida y hábitats (Hoezel 2009). Algunas especies no presentan diferenciación genética poblacional como es el caso de *Stenella coeruleoalba* en la costa Mediterránea (García Martínez *et al.* 1995), *Stenella longirostris* en el Pacífico tropical o el cachalote, *Physeter macrocephalus*, entre diferentes océanos (Lyrholm *et al.* 1999). En cambio otras, si presentan esta diferenciación como es el caso de poblaciones de ballenas jorobadas entre el Pacífico y el Atlántico (Baker *et al.* 1994) o, por ejemplo, poblaciones de *Cephalorhynchus commersonii* de la costa Argentina y del archipiélago de Kerguelen en el sur del Océano Indico, las cuales han sido determinadas taxonómicamente como subespecies (Robineau *et al.* 2007). En este mismo género, y a una escala geográfica menor, diferenciación morfológica y molecular ha sido reportada para la especie endémica de Nueva Zelanda *Cephalorhynchus hectori* (Pichler *et al.* 1998, Pichler y Baker 2000, Baker *et al.* 2002), proponiéndose al igual que su congener *C commersonii*, dos subespecies (*C hectori hectori* para la Isla del Norte y *C hectori maui*, para la isla del Sur, Baker *et al.* 2002). De la misma manera, diferenciación en odontocetos ha sido encontrada en poblaciones parapátricas y en mayor medida en poblaciones simpátricas. Lo anterior es posible, entre otras causas, cuando poblaciones separadas alopátricamente, se conectan nuevamente, o producto de elección de apareamiento diferencial en simpatría (Hoezel *et al.* 2009). Ejemplos de poblaciones parapátricas en odontocetos son escasas, siendo citadas para delfines costeros y oceánicos del género *Tursiops* (Hoelzel *et al.* 1998b) y del género *Kogia*

(Chivers *et al.* 2005). En poblaciones simpátricas, la estructura social y especialización por recursos (hábitat o selección de presa) ha sido un mecanismo de diferenciación poblacional (Hoelzel 1998, Whitehead 1998), lo que se ve claramente ilustrado en el caso de la orca, *Orcinus orca*, estructurada socialmente en grupos o "pods" definidos y estables. Estos grupos se caracterizan por presentar especialización trófica, alimentándose diferencialmente de peces o de mamíferos marinos; por ser transeúntes o residentes a un lugar o y por estar genéticamente diferenciados (Hoelzel and Dover 1991, Hoelzel *et al.* 1988a, Parson *et al.* 2013).

Por otra parte, eventos climáticos históricos como fluctuaciones en el nivel del mar o la ocurrencia de ciclos glaciales influirían en el patrón de distribución y variación geográfica actual de los organismos (O'Corry-Crowe *et al.* 1997, Avise & Walker 1998, Conroy & Cook 2000, Masini & Sala 2007) y reconstrucciones demográficas basadas en información molecular han demostrado que estas fluctuaciones se relacionan con episodios de expansión-contracción poblacional (Marko *et al.* 2010, Provan y Benett 2008, Lessa *et al.* 2003, Maggs *et al.* 2008). Modelos de genética tradicional de refugios glaciales y rutas de recolonización consideran como predicción, una baja diversidad genética en áreas cubiertas por el hielo, con un bajo número de haplotipos dominantes, y mayor diversidad en refugios glaciales (Hewitt 2000, Provan & Benett 2008, Maggs *et al.* 2008). Los ciclos glaciales del Pleistoceno, datados dentro de los últimos dos millones de años, son reconocidos como los eventos históricos más significativos ocurridos durante el último tiempo evolutivo de muchas especies, principalmente en las zonas templadas y polares (Hewitt 1996, 1999). Precisamente, la distribución de muchas de estas especies está relacionada con el último evento glacial y con la transición hacia el período interglacial actual (Avise *et al.* 1998). Desde una aproximación temporal, las fluctuaciones climáticas recientes, correspondientes al Pleistoceno tardío, se relacionan con variaciones poblacionales a nivel intra-específico (Avise & Walker 1998), y sus efectos en patrones filogeográficos y variabilidad poblacional han sido evaluados en diferentes taxa (Avise *et al.* 1998). Para el Orden Cetacea,

variaciones climáticas y oceanográficas han contribuido sustancialmente al patrón de distribución actual, variación geográfica y estructuración poblacional de algunas especies (LeDuc 2002). Expansiones poblacionales, variación en los rangos de distribución y diversidad genética posterior a eventos glaciales pleistocénicos han sido reportado para *Delphinapterus leucas*, en el Neártico occidental, (O'Corry-Crowe et al 1997), *Lagenorhynchus albirostris*, en el Atlántico Norte, (Banguera-Hinestroza et al. 2010) y *Eschrichtius robustus* en el Pacífico del Norte (Pyneson et al. 2011).

Dentro de los eventos glaciales ocurridos en Sudamérica, durante el Pleistoceno temprano (1,2 Ma) ocurre la Gran Glaciación patagónica, con el posterior desarrollo de 14 a 16 épocas geoclimáticas frías intercaladas de sus correspondientes equivalentes cálidos. Posteriormente, durante el Pleistoceno medio-tardío, destaca la Última Gran Glaciación (UGG) que alcanzó su máximo hace 25.000 años con el Último Máximo Glacial (UMG), el cual finaliza hace 16.000 años (Pleistoceno tardío). Finalmente tuvieron lugar dos nuevos re-avances glaciares hace 15.000-10.000 años (Tardiglacial; Rabassa et al. 2005). Estos eventos produjeron cambios climáticos que influyeron en los ecosistemas tanto marinos como terrestres durante los últimos 5 millones de años. Variaciones en el nivel del mar de hasta 100-140 metros, y de al menos 5-6°C de temperatura superficial del mar se estiman durante los ciclos glaciales-interglaciales (Rabassa et al. 2005). Geográficamente, la capa de hielo durante las glaciaciones del Pleistoceno se extendería hasta profundidades del Océano Pacífico por el rango de expansión Oeste, sumergiéndose por el costado occidental de la isla de Chiloé al sur de los 43°S, la zona de fiordos y canales al sur de Chiloé se encontraba cubierta por una extensa capa de hielo durante el UMG que se extendía hasta el borde de la plataforma continental (Hulton et al. 2002), mientras que por el costado oriental de Sudamérica, actual plataforma submarina Atlántica, alcanzarían solo hasta el río Gallegos (51°S) (Figura 1; Rabassa & Claperton 1990; Rabassa & Cornato 2009). Dentro de este contexto, organismos que presentaran una distribución continua

a lo largo del extremo sur de Sudamérica potencialmente presentarían modificaciones de patrones biogeográficos producto de las glaciaciones (Collin & Mantenon 2002). Por tanto, el conocer la influencia de las glaciaciones de Sudamérica en el proceso de divergencia de especies, así como también en la variación geográfica de éstas, ayuda a reconstruir su historia filogeográfica junto con explicar su patrón de distribución actual.

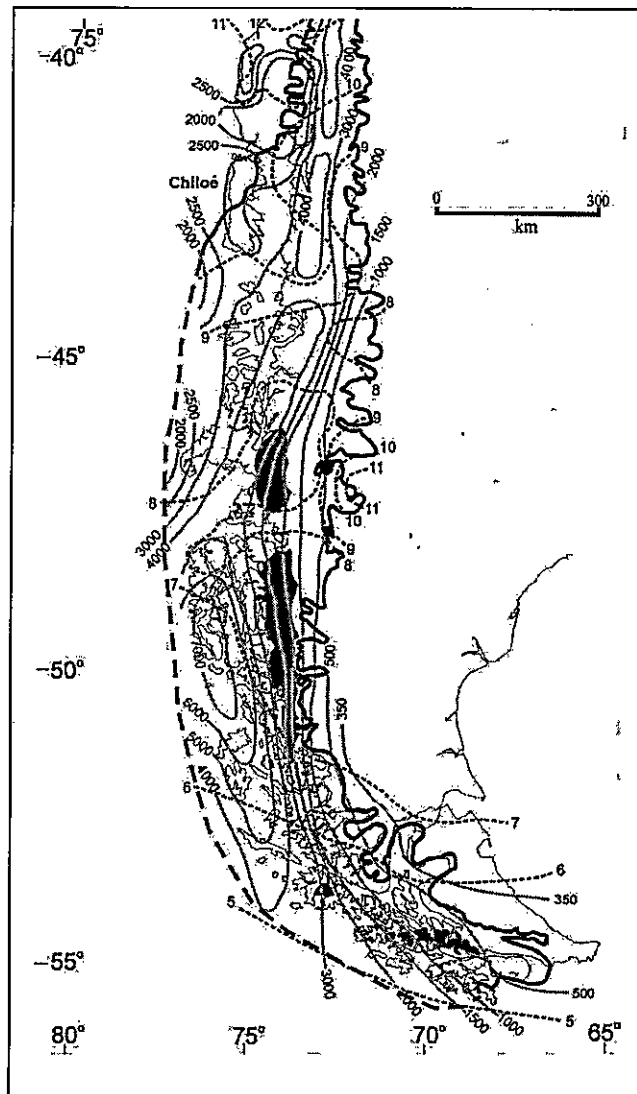


Figura 1. Límites de la Masa de Hielo durante el Último Máximo Glacial (UMG) en Océano Pacífico (Modificado de Hulton 2002).



### Modelo de Estudio

El género *Cephalorhynchus* corresponde a un género de delfines del Hemisferio Sur, de pequeño tamaño, costeros, y de distribución restringida. Está compuesto por cuatro especies: (1) delfín de Héctor, *Cephalorhynchus hectori*, en Nueva Zelanda; (2) delfín de Heaviside, *C.heavisidii*, en la costa oeste de Sudáfrica y Namibia; (3) delfín de Commerson, *C. commersonii*, en el Estrecho de Magallanes, Argentina e Islas Kerguelen y (4) delfín chileno, *C. eutropia*, en las costas de Chile (Dawson 2002). La amplia pero discontinua distribución del género podría reflejar una restricción a hábitats de zonas templada-frías del Hemisferio Sur. Análisis filogenéticos basados en ADN mitocondrial indican que las cuatro especies del género formarían un grupo monofilético, proponiendo que el género se habría originado al sur de Africa (*C. heavisidii*), posteriormente y producto de la Corriente de Deriva del Oeste habrían llegado a Nueva Zelanda (*C. hectori*). Un efecto fundador posterior originaría la población que colonizó Sudamérica, la cual producto de las glaciaciones de Tierra del Fuego habría dado origen a *C.eutropia* y *C. commersonni*. Más recientemente (10.000 años) una población de *C. commersonii* habría fundado la población de las Islas Kerguelen (Figura 2, Pichler *et al.* 2001).

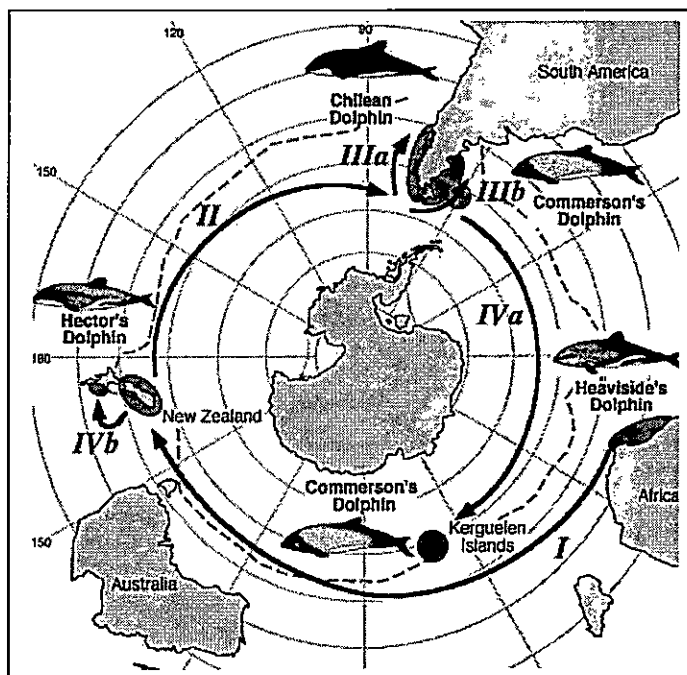


Figura 2. Hipótesis de origen y dispersión del género *Cephalorhynchus* (extraído de Pichler *et al.* 2001).

El delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia*, es la única especie de cetáceo endémica de nuestro país (Yáñez 1948, Figura 3) y uno de los odontocetos menos conocido a nivel mundial (Goodall *et al.* 1988). Se distribuye a lo largo de la costa central y sur de Chile, desde Concón (32°56'S) a Isla Navarino (55°14' S) (Goodall 1994a, Aguayo-Lobo *et al.* 1998), siendo caracterizada como una especie costera, de aguas poco profundas, al igual que sus congéneres (Dawson 2002). Habita en dos áreas geográficamente distintas: la costa abierta, bahías y estuarios desde Valparaíso (33°02'S) a Chiloé (42°00'S) y canales y fiordos entre Chiloé y la Isla Navarino (Goodall *et al.* 1994), quiebre geográfico concordante con el límite glacial norte registrado durante el Último Máximo Glacial (Rabassa & Cornato 2009, Figura 1) y con dos de las regiones biogeográficas descritas para el ecosistema marino de sistemas pelágicos (1) región centro-sur de surgencia (30°- 42°) y (2) la región austral de fiordos (44°-55°S) (Escribano *et al.* 2003). Estas regiones muestran diferencias oceanográficas, topográficas y de composición biológica, siendo los 42°S, el límite de distribución de diferentes taxa (Camus 2001). En el área de distribución norte (Valparaíso-Chiloé), la especie muestra una marcada preferencia por zonas estuarinas (Goodall *et al.* 1988b, Capella *et al.* 1999, Pérez-Alvarez *et al.* 2007), factor que potencialmente condicionaría su distribución. El tamaño grupal de la especie y la respuesta conductual a la presencia de embarcaciones podría variar geográficamente (Goodall *et al.* 1988b) relacionándose probablemente con la utilización de esta especie como carnada en la pesquería de centolla en el área sur de su distribución (Goodall *et al.* 1988a; Lescrauwaet & Gibbons 1994; Aguayo-Lobo 1999; Dawson 2002). En este sentido, Pérez-Alvarez *et al.* (2007) reportan una mayor frecuencia de avistamientos de la especie en el área con influencia de la desembocadura del río Maule, además de sugerir de manera preliminar, diferencias en tamaños grupales y respuestas conductuales frente a la presencia de embarcaciones en relación a las observadas en el área de distribución sur (Chiloé - Isla Navarino; Goodall 1988b, 1994a; Dawson 2002; Ribeiro *et al.* 2005). La escasa información existente para la especie junto a la intervención antrópica histórica y actual a las que ha sido sometida principalmente con

actividades pesqueras, explican su categoría de conservación "Near Threatened" (NT, IUCN 2009). En relación al rango de hogar y distancias geográficas de desplazamiento, individuos de las distintas especies del género *Cephalorhynchus* serían residentes a un área geográfica local, no existiendo evidencia de migraciones a grandes escalas (Dawson 2002). Para *C. hectori* conductas altamente filopátricas (Dawson & Slooten 1993) y rangos de desplazamiento máximo de 30 km han sido descritos (Dawson 2002), similar al rango de desplazamiento de aproximadamente 45 km, descrito por Heinrich (2006) para *C. eutropia*. Estructuración poblacional y variaciones geográficas poblacionales a nivel molecular y morfológico han sido descritas para *C. hectori* (Pichler *et al.* 1998, Pichler y Baker 2000, Baker *et al.* 2002) y *C. commersonii* (Robineau *et al.* 2007), proponiéndose para ambas especies, la categoría taxonómica de subespecie (Baker *et al.* 2002, Robineau 2007). Para *C. eutropia*, un estudio molecular en base a ADN mitocondrial extraído de dientes enfocado a resolver la determinación taxonómica de ciertos individuos (Pichler *et al.* 2001) y otro para evaluar la relación filogenética a nivel de género (Pichler *et al.* 2001) han sido realizados; y medidas craneales de algunos ejemplares han sido reportadas con una finalidad descriptiva (Goodall *et al.* 1998, Oporto *et al.* 1998), sin embargo, hasta la actualidad no se ha desarrollado un estudio enfocado en la estructuración y diferenciación poblacional de la especie considerando un gradiente latitudinal.

El presente estudio da cuenta de la variación geográfica latitudinal en caracteres morfológicos y moleculares de *Cephalorhynchus eutropia*, así como de la estructuración genética de la especie a lo largo de su distribución. Además analiza la contribución de los ciclos glaciales, particularmente el Último Máximo Glacial sobre los patrones de distribución, estructura poblacional y diversidad genética de la especie.



Figura 3. Delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia*. Fotografías: R Moraga Z, MJ Pérez-Alvarez, Centro de Investigación EUTROPIA.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

### **Hipótesis 1**

*Cephalorhynchus eutropia*, especie caracterizada por desplazamientos geográficos reducidos y ámbito de hogar restringido, presentaría variación geográfica poblacional a lo largo de su distribución.

Predicciones:

- Se encontrará diferenciación genética poblacional para *C.eutropia* a lo largo de su rango de distribución
- Se encontrará variación geográfica latitudinal en morfometría craneal de *C eutropia*

### **Hipótesis 2**

Las poblaciones de *Cephalorhynchus eutropia* presentes en el área sur (Chiloé-Isla Navarino) de su distribución, se habrían originado por efectos fundadores a partir de poblaciones del área norte, expandiendo la especie su rango geográfico de distribución mediante una recolonización post-glacial

Predicciones:

- Se encontrará mayor diversidad genética en las poblaciones de *C eutropia* presentes en el área de distribución norte (Valparaíso-Chiloé), área no afectada por la expansión glacial
- Se encontrará señal genética de expansión poblacional en el área de distribución sur (Chiloé-Isla Navarino), área afectada por la expansión glacial

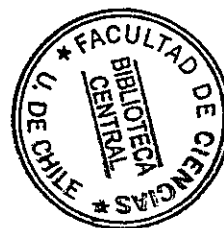
## OBJETIVOS

### Objetivos Generales

La presente propuesta tiene por objeto (1) evaluar la variación geográfica a nivel morfológico y molecular y la estructuración genética de la especie a lo largo de su rango de distribución y (2) entender la contribución de los ciclos glaciales ocurridos durante el Pleistoceno en el patrón de distribución actual de *Cephalorhynchus eutropia*

### Objetivos Específicos

- Analizar la estructuración genética poblacional que presenta *C.eutropia* a lo largo de su distribución
- Comparar los índices de diversidad y diferenciación genética entre las poblaciones de *C eutropia* a lo largo de su distribución
- Evaluar la variación geográfica latitudinal en morfometría craneal de *C. eutropia*
- Evaluar la correspondencia entre variables morfométricas craneales de *C eutropia* y variables ambientales y geográficas a lo largo de su distribución
- Evaluar si la presencia de un quiebre biogeográfico (Regiones Intermedia/Surgencias y de Fiordos Australes) influye en la estructuración poblacional y conectividad de la especie
- Proponer un escenario histórico-demográfico que explique el patrón de distribución actual, estructura poblacional y diversidad genética de *C. eutropia*



## BIBLIOGRAFIA

- Aguayo-Lobo, A. Torres, D. Y Acevedo, J. 1998. Los Mamíferos Marinos de Chile: I. Cetacea. Ser. Cient. Inst. Antart. Chil. 48: 19–159.
- Aguayo-Lobo, A. 1999. Los cetáceos y sus perspectivas de conservación. *Estud. Oceanol.* 18: 35–43.
- Amano, M. Y Miyazaki, N. 1992. Geographic variation and sexual dimorphism in the skull of Dall's porpoises, *Phocoenoides dalli*. *Mar. Mamm. Sci.* 8 (3): 240-261.
- Amaral, A. Coelho, M. Marugan-Lobón, L. Y Rohlf, F. 2009. Cranial shape differentiation in three closely delphinid cetacean species: Insights into evolutionary history. *Zool.* 112: 38-47
- Avise, J. Y Walker, D. 1998. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proc. R. Soc. Lond., B*, 265, 457–463.
- Avise, J. Y Walker, D Y Jhons, G. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrates phylogeography. *Proc. R. Soc. Lond.*, 265, 1707-1712.
- Ayre, D. Minchinton, T. Perrin, C. 2009. Does life history predict past and current connectivity for rocky intertidal invertebrates across a marine biogeographic barrier? *Mol Ecol* 18: 1887-1903.
- Baker, C. Palumbi, R. Lambertsen, Weinrich, M. Calambokidis, J. Y O'Brien, S. 1990. Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nat.* 344:238-240.
- Baker, C. Slade, R. Y Bannister, J. 1994. Hierarchical structure of mitochondrial DNA gene flow among humpback whales *Megaptera novaeangliae*, world-wide. *Mol Ecol*, 3, 313–327.
- Baker A, Smith, A. Y Pichler, F. 2002. Geographical variation in Hector's dolphin: recognition of new subspecies of *Cephalorhynchus hectori*. *J. R. Soc. N. Z.* 32 (4):713-727.
- Banguera-Hinestroza, A. Bjorge, J. Reid, P. Jepson Y Hoelzel, R. 2010. The influence of glacial epochs and habitat dependence on the diversity and phylogeography of a coastal dolphin species: *Lagenorhynchus albirostris*. *Cons.Genet* 11(5): 1823-1836.
- Berta, A. Sumic, J. Y Kovacs, K. 2006. *Marine Mammals Evolutionary Biology*. Elsevier Inc.
- Burton, R. 1998. Intraspecific phylogeography across the Point Conception biogeographic boundary. *Evolution*, 52, 734-745.
- Camus, P. 2001. Biogeografía marina de Chile continental. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 74: 587-617.
- Capella, J. Gibbons, J. Y Vilina, Y. 1999. Nuevos registros del delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia* (Gray, 1846) en Chile central, extremo norte de su distribución. *Est. Oceanol.* 18: 65–67.
- Capella, J. Gibbons, J. Florez-Gonzalez, L. Llano, M. Valladares, C. Sabaj, V. Y Vilina, Y. 2008. Migratory round-trip of individually identified humpback whales at the Strait of Magellan: clues on transit times and phylopatry to destinations. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 81: 547-560.

- Cárdenas, L, Castilla, J. Viard, F. 2009, A phylogeographical analysis across three biogeographical provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. *J Biogeo* 36: 969-981.
- Chivers, S. LeDuc, R. Robertson, R. Barros, K. Y Dizon, A. 2005. Genetic variation of *Kogia* spp. with preliminary evidence for two species of *Kogia sima*. *Mar. Mamm. Sci.* 21, 619 – 634.
- Collin, R. Y. Mantenon, M. 2002. Integrative Approaches to Biogeography: Patterns and Processes on Land in the Sea: *Integr. Comp. Biol.* 42: 911-912.
- Conroy, J. Y. Cook, J. 2000. Phylogeography of a post-glacial colonizer: *Microtus longicaudus* (Rodentia: Muridae) *Mol Ecol* 9, 165–175.
- Dawson, S. Y. Slooten, E. 1993. Conservation of Hector's dolphin: the case and process which lead to establishment of the Banks Peninsula Marine Mammal Sanctuary: *Aquat. Conserv.* 3:207-221.
- Dawson, S. 2002. *Cephalorhynchus dolphins*. En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), *Encyclopedia of Marine Mammals*. pp 200-203. Academic Press, San Diego.
- Engelhaupt, Hoelzel, R. Nocholson, C. Frantzis, R. Mesnick, S. Gero, S. Whitehead, H. Rendell, L. Miller, P. Stefanis, R. Cañadas, A. Airolidi, S. Y. Mignucci-Giannoni, A. 2009. Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine Species, the sperm whale, *Physeter macrocephalus*. *Mol Ecol* 18: 4193-4205.
- Escribano, R. Fernández, M. Aranis, A. 2003. Physical-chemical processes and patterns of diversity of the Chilean eastern boundary pelagic and benthic marine ecosystem: An overview. *Gayana* 67, 190–205.
- Futuyma, D. 1998. *Evol Biol*. 3d ed. Sinauer, Sunderland, Mass
- García-Martínez, E. Barrio, A. Raga, A. Y. Latorre, A. 1995. Mitochondrial DNA variability of striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*, in the Spanish Mediterranean waters. *Mar. Mamm. Sci.* 11: 183-199.
- Goodall, R. Norris, K. Galeazzi, A. Leatherwood, S. Miller, S. Cameron, I. Kastelein, R. Y. Sobral, A. 1988a. Studies of Commerson's dolphins, *Cephalorhynchus commersonii*, off Tierra del Fuego, 1976–1984, with a review of information on the species in the South Atlantic. *Rep. Int. Whal. Commn, Special Issue* 9: 3–70.
- Goodall, R. Norris, K. Galeazzi, A. Oporto, J. Y. Cameron, I. 1988b. On the Chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* Gray, 1846. *Rep. Int. Whal. Commn, Special Issue* 9: 197–257.
- Goodall, R. 1994a. Chilean dolphin, *Cephalorhynchus eutropia* (Gray 1846). En: Ridgway SH, . Harrison, R (eds) *Handbook of Marine Mammals*. San Diego, Academic Press. Pp. 269–287.
- Goodall RNP 1994b. Commerson's dolphin *Cephalorhynchus commersonii* (Lacepede 1804). En: Ridgway; S. Harrison, R (eds) *Handbook of Marine Mammals*. San Diego, Academic Press. Pp. 241–267.



- Haye, P. Salinas, P. Acuña, E. Poulin, E. 2010. Heterochronic phenotypic plasticity with lack of genetic differentiation in the southeastern Pacific squat lobster *Pleuroncodes monodon*. *Evol Dev* 12: 627-633.
- Hewitt, G. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.*, 58, 247-276.
- Hewitt, G. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc.*, 68, 87-112.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hoelzel, A. 1998. Genetic structure of cetacean population in sympatry, parapatry and mixed assemblages: Implication for conservation policy. *J. Hered.* 89 (5):451-458.
- Hoelzel, A. C, Potter. Y P, Best. 1998b. Genetic differentiation between parapatric nearshore " and " offshore "populations of the bottlenose dolphin. *Proc. Royal Soc. B.* 265, 1-7.
- Hoelzel, A. Y Dover, G. 1991. Genetic differentiation between sympatric killer whale populations. *Heredity* 66, 191-195.
- Hoelzel, A. 2009. Molecular Ecology ecology. En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), *Encyclopedia of Marine Mammals*. pp 736-741. Academic Press, San Diego.
- Hulton, N. Purves, R. McCulloch, R. Sugden, D. Bentley, M. 2002. The Last Glacial maximum and deglaciation in southern South America. *Quat Sci Rev* 21:233-241.
- Ibáñez, C. Cubillos, L. Tafur, R. Argüelles, J. Yamashiro, C. Y Poulin, E. 2011. Genetic diversity and demographic history of *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Humboldt Current System. *Mar Ecol Prog Ser* 431: 163-171.
- Kellogg, R. 1929. What is known of the migration of some of the whalebone whales. *Smithsonian Institution Annual Report 1928*, 467-494.
- Lazaro, M. Lessa, E. Y Hamilton, H. 2004. Geographic genetic structure in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Mar.Mamm. Sci.* 20, 201 - 214.
- LeDuc, R. 2002. Biogeography. En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), *Encyclopedia of Marine Mammals*. pp 99-102. Academic Press, San Diego.
- LeDuc R 2009. Biogeography. En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), *Encyclopedia of Marine Mammals*. pp 112-115. Academic Press, San Diego.
- Lescrauwaet, A. Y Gibbons, J. 1994. Mortality of small cetaceans and the crab bait fishery in the Magallanes area of Chile since 1980. *Rep. Int. Whal. Commn, Special Issue* 15: 485-494.
- Lessa, E. Cook, E. Patton, J. 2003. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late Quaternary *Proc Nat Acad Sci USA*, 100:10331-10334.
- Lomolino, B. Riddle, R. Whitakker, R. Brown, J. 2010. *Biogeography*. Sinauer Associates, Inc, 560pp.

Lyrholm, T. Leimar, O. Johannesson, B. Y Gyllensten, U. 1999. Sex-biased dispersal in sperm whales: contrasting mitochondrial and nuclear genetic structure of global populations Proc. Roy. Soc. B 266, 347- 354.

Maggs, C. Castihlo, R. Foltz, D. Henzler, C. Jolly, M. Kelly, J. Olsen, J. Perez, K. Stam, W. Vainöla, R. Viard, F. Wares, J. 2008. Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. Ecology 2008, 89:S 108–S122.

Marko, P. Hoffman, J. Emme, S. McGovern, T. Keever, C. Cox, N. 2010. The "Expansion-Contraction" model of Pleistocene biogeography: rocky shores suffer a sea change? Mol Ecol, 19:146–169.

Masini, F. Y Sala, B. 2007. Large and small mammal distribution and chronostratigraphic boundaries from the late Pliocene to the Middle Pleistocene of the Italian peninsula. Quat. Int. 160: 43-56.

Matthews, L. 1937. The humpback whale, *Megaptera nodosa*. Disc. Rep.17, 7-92.

Molina-Schiller, D.2006. Variacao Geografica do boto de Burmeister, *Phocoena spinipinni*, (Burmeister 1865) (Cetacea: Phocoenoide) nas costa Atlantica e Pacifica da America do Sul. Universidade Federale do Rio Grande do Sul. 223pp.

O'Corry-Crowe, G. Suydam, R. Rosenberg, A. Forst, J. Y Dizon, E. 1997. Phylogeography, population structure and dispersal pattern of the beluga whale, *Delphinapterus leucas*, in the western nearctic revealed by mitochondrial DNA. Mol Ecol 6, 955-970.

Olavarria-Barrera, C. Baker, C, Medrano, L. Aguayo, A. Caballero, S. Flores Gonzalez, L. Capella, J. Rosenbraum, H. Garrigue, C. Greaves, J. Bannister, S. Jenner, M. Y Jenner, C. 2000. Stock identity of Antarctic Peninsula humpback whales inferred from MtDNA variation. Paper SC/ 52/IA 15 submitted to the Scientific Committee of the International Whaling Commission.

Oporto, J. 1988. Biología descriptiva y status taxonómico del delfín chileno *Cephalorhynchus eutropia* Gray 1846 (Cetacea: Delphinidae). Magister en ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia Chile.

Parson, K. Durban, J. Burdín, A. Burkanov, A. Pitman, R. Barlow, J. Barret-Lennard, R. LeDuc, R. Robertson, K. Matkin, C. Y Wade, P. 2013. Geographic Patterns of Genetic Differentiation among Killer Whales in the Northern North Pacific. J. Hered. Epub ahead of print.

Pérez-Alvarez, MJ, Alvarez, E. Aguayo-Lobo, A Y Olavarría, C. 2007. Occurrence and distribution of Chilean dolphin, *Cephalorhynchus eutropia*, in coastal waters of central Chile. New N. Z. J. Mar. Freshw. Res. 41: 405-409.

Perrin, W.1984. Patterns of geographical variation in small cetaceans. Acta Zool. Fenn 172: 137-140.

Perrin, W. 2002. Geographic Variation En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), Encyclopedia of Marine Mammals. pp 510-516. Academic Press, San Diego.

- Perrin, W. 2003. Cranial sexual dimorphism and geographic variation in Fraser's dolphin, *Lagenodelphis hosei*. Mar. Mamm. Sci.: 19(3): 484-501.
- Perrin, W. Y Brownell, R. 1994. A brief review of stock identity in small marine cetaceans in relation to assessment of driftnet mortality in the North Pacific. Rep. Int. Whal. Commn. Spec. Iss. 15, 393-401.
- Pichler, F. Dawson, S. Slooten, E. Y Baker, C. 1998. Geographic isolation of Hector's dolphin populations described by mitochondrial DNA sequences. Conserv. Biol. 12, 676- 682.
- Pichler, F. Robineau, D. Goodall, N. Meyer, N. Olavarría, C. Y Baker, S. 2001. Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). Mol Ecol 10, 2215-2223.
- Pichler, F. Y Baker, C. 2000: Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. Proc. R. Soc. Lond., B, 267: 97-102.
- Provan, J. Bennett, K. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. Trends Ecol Evol, 23:564-571.
- Pyenson, N. Lindberg, D. 2011. What Happened to Gray Whales during the Pleistocene? The Ecological Impact of Sea-Level Change on Benthic Feeding Areas in the North Pacific Ocean. PLoS ONE 6(7): e21295. doi:10.1371/journal.pone.0021295.
- Rabassa, J, Y Clapperton, C. 1990. Quaternary glaciations of the Southern Andes. Quat. Sci.Rev. 9: 153-174.
- Rabassa, J. Y Coronato, A. 2009. Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego during the Ensenadan Stage/Age (Early Pleistocene-earliest Middle Pleistocene). Quat. Int. 210 (1-2): 18-36.
- Rabassa, J. Coronato, A, Y Salemme, M. 2005. Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). J. S. Am. Earth Sci. 20: 81-103.
- Ribeiro, S. Viddi, F. Y Freitas, T. 2005. Behavioural responses of Chilean dolphins (*Cephalorhynchus eutropia*) to boats in Yaldad Bay, southern Chile. Aquat. Mamm. 31: 234-242.
- Robineau, D. Goodall, R. N. P. Pichler, F. Y Baker, C. 2007. Description of a new subspecies of Commerson's dolphin *Cephalorhynchus commersonii*, inhabiting the coastal waters of the Kerguelen Islands. Mammalia: 172-180.
- Ross, G. 1977. The taxonomy of bottlenose dolphins, *Tursiops species* in South African waters, with notes on their biology. Ann. Cape Provinc. Mus. 11: 135-194.
- Sánchez, R. Sepúlveda, R.D. Brante, A. Y Cárdenas, L. 2011. Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: Mollusca). Mar. Ecol. Prog. Ser. 434: 121-131.

Santos, M. G, Pierce, J. Learmonth, R. Red, H. Ross, I. Patterson, D. Reid, A. Y Beare, D. 2004. Variability in the diet of harbor porpoises *Phocoena phocoena* in Scottish waters 1992-2003. Mar. Mamm. Sci. 20(1):1-27.

Schnell, G. Douglas, M Y Hough, D. 1986. Geographic variation in offshore spotted dolphins (*Stenella attenuata*) of the eastern tropical Pacific Ocean. Mar. Mamm. Sci. 2 (3): 186-213.

Tellier, F. Meynard, A. Correa, J. Faugeron, S. Y Valero, M. 2009. Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: vicariance or parapatry? Mol Phylogenet Evol 53: 679-693.

Whitehead, H.1998. Cultural selection and genetic diversity in matrilineal whales. Science. 282:1708-1711.

Yañez, P 1948. Vertebrados marinos chilenos. I. Mamíferos. Rev. biol. mar. oceanogr. Valparaíso 1(2): 103-123.

**CAPÍTULO I: Strong genetic and phylogeographic structure in the endemic Chilean dolphin: Identification of population units**

M.J. PÉREZ-ALVAREZ <sup>1,2</sup>, C. OLAVARRÍA <sup>2</sup>, R. MORAGA <sup>2</sup>, C.S. BAKER <sup>3</sup>, R. HAMNER <sup>3</sup>, and E. POULIN <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB), Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Ñuñoa, Santiago, Chile

<sup>2</sup>Centro de Investigación Eutropia, Ahumada 131 Oficina 912, Santiago, Chile

<sup>3</sup>Marine Mammal Institute and Department of Fisheries and Wildlife, Oregon State University, 2030 SE Marine Science Drive, Newport, OR 97365, USA

Key words: population structure, genetic diversity, conservation, *Cephalorhynchus eutropia*

\*Corresponding author: María José Pérez-Alvarez, E-mail: [mjose.perez@eutropia.cl](mailto:mjose.perez@eutropia.cl), [mjose.perez@gmail.com](mailto:mjose.perez@gmail.com); Phone: 56-2-29787178

Formato: Molecular Ecology

## ABSTRACT

In the marine environment, pelagic species that have high dispersal capabilities represent a serious challenge to the understanding of genetic differentiation and speciation processes. The Chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* is the only endemic cetacean of Chile and is found in two different coastal habitats: a northern habitat with exposed coastlines, bays and estuaries from Valparaíso (33°02'S) to Chiloé (42°00'S), and a southern habitat with highly fragmented inshore coastline, channels and fjords between Chiloé and Navarino Island (55°00'S). With the aim of evaluating the genetic diversity and population structure of the Chilean dolphin along its entire range, we genotyped 21 dinucleotide microsatellites and sequenced 663 bp of the mtDNA control region for up to 64 skin samples and teeth. Bayesian clustering and spatial model analyses identified two genetically distinct populations (North and South) corresponding to the northern and southern habitats. Genetic differentiation between these two populations was high and significant for both microsatellite and mtDNA ( $F_{ST}= 0.15$  and  $R_{ST}= 0.19$ ; and  $F_{ST}= 0.19$  and  $\Phi_{ST}= 0.39$  respectively), indicating little or no current gene flow. Because of the absence of evident geographical barriers between the northern and southern populations, we propose that genetic differentiation may reflect ecological adaptation to the different habitat conditions and resource uses. Finally, our results identified two genetic populations that need to be considered as different conservation units with independent management strategies.

## Introduction

The marine environment provides an opportunity to examine population structure and speciation processes in species with high dispersal capabilities and often no obvious barriers to gene flow (Palumbi 1992, Fontaine *et al.* 2007). In cetacean populations, the lack of geographical barriers do not necessarily result in large panmictic populations (Hoelzel *et al.* 2002, Rosel *et al.* 2009) and may generate a genetic diversity structure difficult to interpret from an intuitive assessment of geography (Hoelzel 1998b). Instead, a combination of complex behavioral specializations for local resources, social structure and in some cases historical environmental changes have been associated with the population structure pattern of these species (Hoelzel 1998a, Hoelzel *et al.* 2002, Natoli *et al.* 2004, Moller *et al.* 2011, Rosel *et al.* 2009). Dolphin populations found in coastal habitats often show a population structure pattern (Hoelzel 2009). For bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, distributed across the contiguous range from the Black Sea to eastern North Atlantic Scotland, a population structure that coincided with transitions between habitat regions has been reported (Natoli *et al.* 2005); a similar pattern of population structure was described for this species in coastal habitats of the eastern Gulf of Mexico (Sellas *et al.* 2005). Although for most of its range in the eastern North Atlantic the harbor porpoise, *Phocoena phocoena*, presents a continuous population with significant isolation by distance, strong barriers to gene flow were detected in the south-eastern part of the north Atlantic range that coincided with profound changes in environmental characteristics (Fontaine *et al.* 2007).

The genus *Cephalorhynchus* is distributed in inshore waters of the Southern Hemisphere (Pichler *et al.* 2001); these dolphins are small and appear to be depth limited in habitat preference (Collet & Robineau 1988; Slooten & Lad 1991). A common ancestor from South African waters has been suggested for *Cephalorhynchus* dolphins, and following the West Wind Drift, these dolphins would have colonized New Zealand and then southern South America (Pichler *et al.* 2001).

Two of the *Cephalorhynchus* species have shown genetically isolated and structured populations (Dawson 2002). For the Hector dolphin, an endemic species of New Zealand, four populations were defined by genetic analysis (North Island, western, eastern and southern coasts of the South Island; Pichler *et al.* 2001); and two subspecies were recognized; *C. hectori maui* for the North Island population and *C. hectori hectori* for the South Island populations (Baker *et al.* 2002). Recently, the division into two subspecies was further supported by a larger sample of mtDNA and an extensive survey of microsatellites; and differentiation for two South Coast populations of *C. hectori hectori* (Hamner *et al.* 2012) was added to the previously described differentiation between the western, eastern and southern coast populations (Pichler *et al.* 1998, Pichler and Baker 2000, Pichler 2001). In Commerson's dolphin two subspecies have also been described, *C. c. commersonii*, found in shallow waters of the southeastern coast of South America, including the central and eastern Strait of Magellan and waters around the Falkland Islands (Goodall *et al.* 1988a, Goodall 1994b) and *C. c. kerguelensis*, located in the Kerguelen Islands in the southern Indian Ocean (Robineau *et al.* 2007). Genetic differentiation of mtDNA in *C. c. commersonii* showed differences among areas within Tierra del Fuego (Pimper *et al.* 2010) and along the southern Argentina coastline (Cipriano *et al.* 2011). In contrast, for *Cephalorhynchus heavisidii*, endemic to coastal waters of the western coast of South Africa and Namibia, no genetic evidence could be found to suggest maternal substructure based on mtDNA analysis along almost 1000 nmi of the South African/Namibian coast (van Vuuren *et al.* 2002). Finally, for *Cephalorhynchus eutropia*, no genetic diversity or population structure study has been undertaken for this species."

The Chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* is the only endemic cetacean species of Chile (Yañez 1948); it inhabits two different but contiguous coastal habitats: a northern habitat with exposed coastlines, bays and estuaries from Valparaíso (33°02'S) to Chiloé (42°00'S), and a



southern habitat with highly fragmented inshore coastline, channels and fjords between Chiloé and Navarino Island (55°14'S; Goodall 1994a, Ribeiro *et al* 2005). Most of the sightings of the Chilean dolphin have been recorded near the shore in shallow waters, and occasionally in estuaries and rivers (Goodall *et al.* 1988b). An estuarine-influenced habitat preference has been suggested for the species in the central coast of Chile (Pérez-Alvarez *et al.* 2007). In the southern distribution area, sightings of the species in the channels and fjords seem to be rare; thus local populations are likely to be very small (Dawson 2009). However, no abundance estimation has been obtained for this species. In order to assess the genetic structure of Chilean dolphin along its continuous distribution range, this study provides information about the genetic diversity and population structure of *Cephalorhynchus eutropia* and identifies genetic units of the species along its distribution range based on mtDNA and microsatellite analysis.

## Material and methods

A total of 66 tissue samples were collected at 8 localities along the Chilean coast between  $35^{\circ}20'S$ ;  $72^{\circ}25'W$  and  $52^{\circ}40'S$ ;  $72^{\circ}30'W$  (Figure 1). Samples were obtained from adult free-ranging dolphins using techniques such as skin swabbing (N=10, Harlin *et al.* 1999), biopsy darting (N=41; Krutzen *et al.* 2002) and also from dead animals (N=15). Samples were stored in 90% ethanol and DNA extraction followed the salt extraction method (Aljanabi and Martínez 1997).

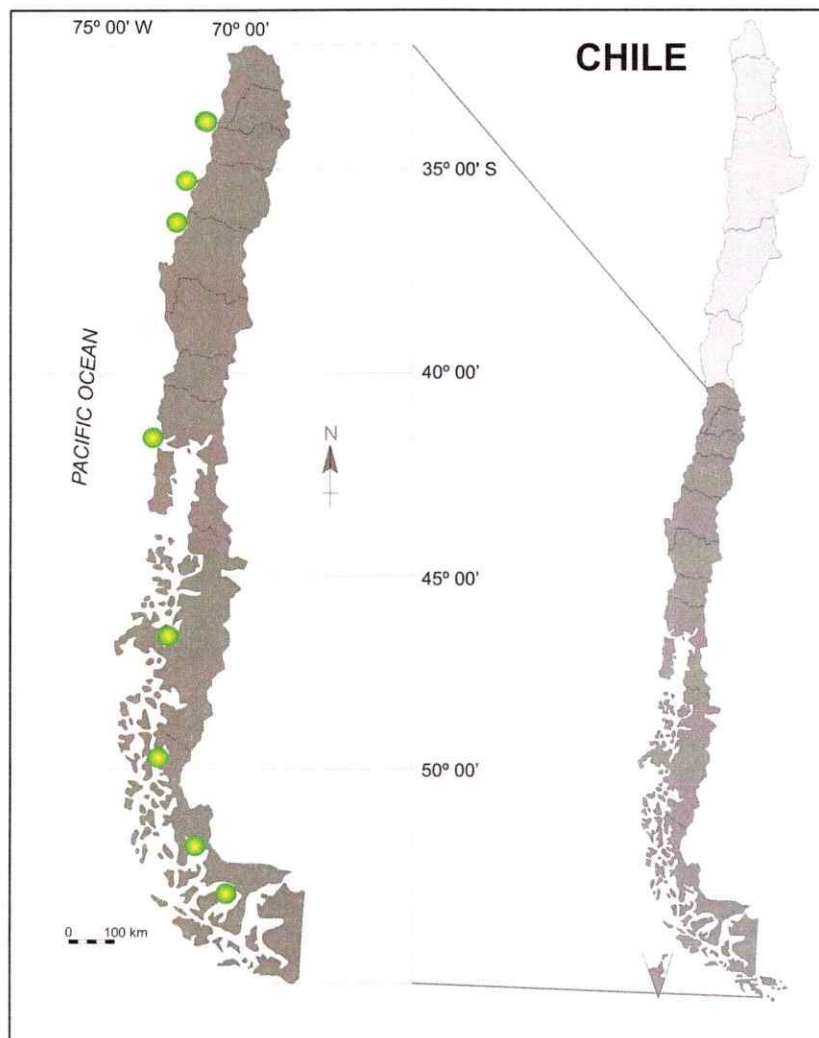


Figure 1. Sampled areas of Chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* along the Chilean coast. Circles correspond from north to south to: San Antonio, Constitución, Concepción, Maullín, Aysén, Bernardo O´Higgins, Puerto Natales and Punta Arenas.

## Genotyping

Fifty-five samples were genotyped at 22 dinucleotide microsatellite loci: Ev1, EV14, EV37, EV94, EV104 (Valsecchi and Amos 1996); KWM12 (Hoelzel *et al.* 1998b); MK5, MK6 (Krutzen *et al.* 2001); PPH110, PPH130, PPH137, PPH142 (Rosel *et al.* 1999); GT023, GT211, Gt575 (Berubé *et al.* 2000); TtruGT51, TtruGT142 (Caldwell *et al.* 2002); Sgui03, Sgui06, Sgui17 (Buchanan *et al.* 1996) and TexVet5 (Rooney *et al.* 1999).

Amplification reactions contained 25-50 ng DNA, 10x PCR buffer, 2µl MgCl<sub>2</sub>, 1µl of each primer, 1.25µl deoxynucleoside triphosphate (dNTP) and 0.5µl Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies). The thermal cycler profile consisted of a preliminary denaturing period of 3 min at 94 °C followed by 30 cycles of denaturation for 30 s at 94 °C, primer annealing for 30 s at 50 °C and polymerase extension for 30 s at 72 °C. The final extension period was for 10min at 72 °C. Following amplification and genotyping, allele peaks were visually verified using GENEMAKER (Softgenetics 2010). To minimize genotyping error each amplification and size run included a negative control to detect contamination and at least 2 internal control samples to ensure comparable allele sizing across all runs.

## Microsatellite analyses

The dataset was initially checked for genotyping or scoring errors caused by null alleles, stuttering and short allele dominance using MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Re-sampled individuals were verified by comparing genotypes in CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.* 2007) and PEDIGREE 2.0 (Butler *et al.*, 2004). Sex and mtDNA haplotypes were also compared.

To infer population structure the Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.* 2007) was used. Setting included the admixture model with correlated allele frequencies, without specifying sampling locations. The model was run with the likely number of

clusters (K) set to values from 1 to 9 using a burn-in period of 100 000 iterations followed by 500 000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) iterations. Five independent runs were conducted for each value of K to check for convergence of results. The number of clusters or populations (K) was inferred from the posterior probability distribution  $\Pr (K/X)$  calculated from the posterior probability of the data  $\text{Log } \Pr (X/K)$ . Additionally, in order to corroborate and visualize the number of populations identified, the EVANNO method was implemented in the STRUCTURE HARVESTER program (Evanno *et al.* 2005, Earl *et al.* 2012). Assignment of individuals to their putative populations was verified by the Bayesian method of Rannala and Mountain (1997) with an  $\alpha = 0,01$  and 10,000 repetitions of the Paetkau *et al.* (2004) MCMC re-sampling algorithm implemented in GENECLASS 2.0 (Piry *et al.* 2004).

Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were analyzed for each population identified through Bayesian clustering method. We performed permutation test using 10 000 iterations using GENETIX (version 4.05, Belkhir *et al.* 2004). Genetic variability was estimated by calculating the number of alleles and expected ( $H_e$ ) and observed ( $H_o$ ) heterozygosities using GENETIX (Belkhir *et al.* 2004).

Genetic differentiation between populations was investigated by computing the F indices of Wright (1969) and Weir & Cockerham (1984) in GENETIX (Belkhir *et al.* 2004), while the  $R_{ST}$  value was calculated by FSTAT Software (Goudet *et al.* 2001). Migration rate was estimated as  $M = m/\mu$ , where m is the chance for a lineage to immigrate per generation and  $\mu$  is the mutation rate per site per generation ( $5 \times 10^{-4}$ , Galov 2011); these parameters were estimated using Bayesian analysis by LAMARC (Kuhner 2006). Effective population size ( $N_e$ ) was obtained by estimating  $\Theta = 4N\mu$  ( $\mu$ : mutation rate per site per generation) considering diploid individuals (Kuhner 2006) by LAMARC (Kuhner 2006) and LDNE (Waples *et al.* 2008).

### **MtDNA Sequencing**

A 663 bp fragment of mitochondrial DNA control region was amplified for 64 individuals using the primers M13 Dlp1.5 5'-TGTAACGACAGCCAGTTCACCCAAAGCTGRARTTCTA-3' and 8G 5'GGAGTACTATGTCCTGTAACCA; Dalebout *et al.* 2005) and sequenced in both directions. The number of samples used for MtDNA and microsatellites differs due to the quality and quantity of DNA. Amplification reactions were performed in a total volume of 25 µl with 5ul PCR buffer 10X, 2 µl MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1 µl of each primer, 2 µl dNTP 200mM and 0.3 µl Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) and 50ng DNA. The PCR temperature profile was as follows: a preliminary denaturing period of 2 min at 94 °C followed by 30 cycles of denaturation for 30 s at 94 °C, primer annealing for 40 s at 56 °C and polymerase extension for 40 s at 72 °C. A final extension period for 10 min at 72 °C was included.

The sex of each individual was identified using simultaneously two sets of oligonucleotide primers (Gilson *et al.* 1998) which amplify a 442-445 bp fragment from the ZFX/ZFY genes in males and females (Aasen and Medrano 1990) and a fragment of 224 bp from the SRY gene in males only (Gilson *et al.* 1998). Gender determination was based on the number of bands visualized in the gel; male DNA samples show two bands (445-224 bp) whereas female samples show only one band (442-445 bp, Gilson *et al.* 1998). Gender identification was tested 2-3 times per individual and DNA from an individual of known gender was amplified as positive control.

### **MtDNA Analyses**

Sequences were edited and aligned in PROSEQ 2.91 (Filatov, 2002) and a Blast test for the species corroboration was undertaken in GeneBank and by DNA Surveillance (Ross *et al.* 2003). All haplotype sequences were deposited in GenBank under Accession Numbers xxx xxxx.

Sequences were divided into two groups based on the genetic population structure results from microsatellite loci (Figure 2). The North Area (San Antonio - Maullín, Figure 1) composed of 24 sequences and the South Area (Aysén - Punta Arenas, Figure 1) composed of 40 sequences.

Genetic diversity at the haplotype ( $h$ ) and nucleotide ( $\pi$ ) levels was estimated for the complete study area and also for the North and South Areas using ARLEQUIN v 3.5 (Schneider *et al.* 2000). Considering the differences in sample size between areas, values of haplotype richness were also adjusted to sample size using a rarefaction analysis in PAST software (Hammer *et al.* 2001). Genealogical relationships of the haplotypes were investigated by constructing a median-joining network in NETWORK 4.5.1.0 (Rohlf 2002). Genetic differentiation was assessed by calculating  $\Phi_{ST}$  (using genetic distance) and  $F_{ST}$  (using haplotype frequencies) in ARLEQUIN v 3.5 (Excoffier 2005). Phylogeographic structure was evaluated by PERMUT Software (Petit 2010).

To determine spatial boundaries we used GENELAND, a Bayesian model that uses genotypes and spatial coordinates of individuals to cluster them into populations at approximately Hardy-Weinberg equilibrium, considering linkage equilibrium between loci (Guillot *et al.* 2009). For this analysis, both markers (MtDNA and 21 loci microsatellites) were used simultaneously. An allele frequency uncorrelated model was set, with 1 000 000 MCMC iterations and thinning of 100.

## Results

### Microsatellites

In total 55 samples were genotyped at 22 loci. Two samples were excluded based on genotype matches, identical mtDNA haplotypes and same sex. Of the remaining 53 individuals, 32 were sexed as males and 21 as females. No sex ratio deviation were found in the overall study area ( $\chi^2 = 2.28$   $df=1$ ,  $P=0.13$ ). No evidence for genotyping, scoring errors or null alleles was detected by Micro-checker analysis except for locus Sgui02, which was eliminated from the data set in the analyses.

The Bayesian clustering approach implemented in STRUCTURE suggested two ( $K=2$ ) as the most likely number of groups (Figure 2). This result was confirmed by the Evanno method in the STRUCTURE HARVESTER (Figure 2). These two populations correspond to the 4 sampled areas located from San Antonio to Maullín (North area) and the 4 sampled areas located from Aysén to Seno Otway, Punta Arenas (South area). GENECLASS analyses showed that 100% of the individuals were correctly assigned to their putative population (Quality Index 97.45%).

No significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium across populations were detected (North area:  $F_{IS} = -0.019$   $P = 0.65$ ; South area:  $F_{IS} = 0.041$   $P = 0.12$ ) and no linkage disequilibrium was found over 210 comparisons between loci per population after Bonferroni correction. Each locus showed 2 to 9 alleles. Heterozygosity values were greater in the North area compared to the South area but not statistically significant different (Table 1,  $\chi^2 = 0.18$   $df=1$   $P = 0.66$ ) and 8 out of 21 loci had greater allelic richness in the North area compared to 11 loci with greater allelic richness in the South area.

Genetic differentiation  $F_{ST}$  was highly significant between the North and South populations ( $F_{ST} = 0.15$   $p < 0.0001$ ;  $R_{ST} = 0.19$   $P < 0.001$ ). The migration rate ( $m$ ) estimated per generation was limited in both directions ( $m = 1.49 \times 10^{-3}$  from North to South and  $m = 4.2 \times 10^{-3}$  from South to

North). No first generation migrant between regions was detected by GENECLASS or STRUCTURE analysis (Figure 2). The effective population size ( $N_e$ ) showed lower values in the North area than in the South (North: 109/39 and South: 458/101 individuals estimated by LAMARC/LDNE, respectively).

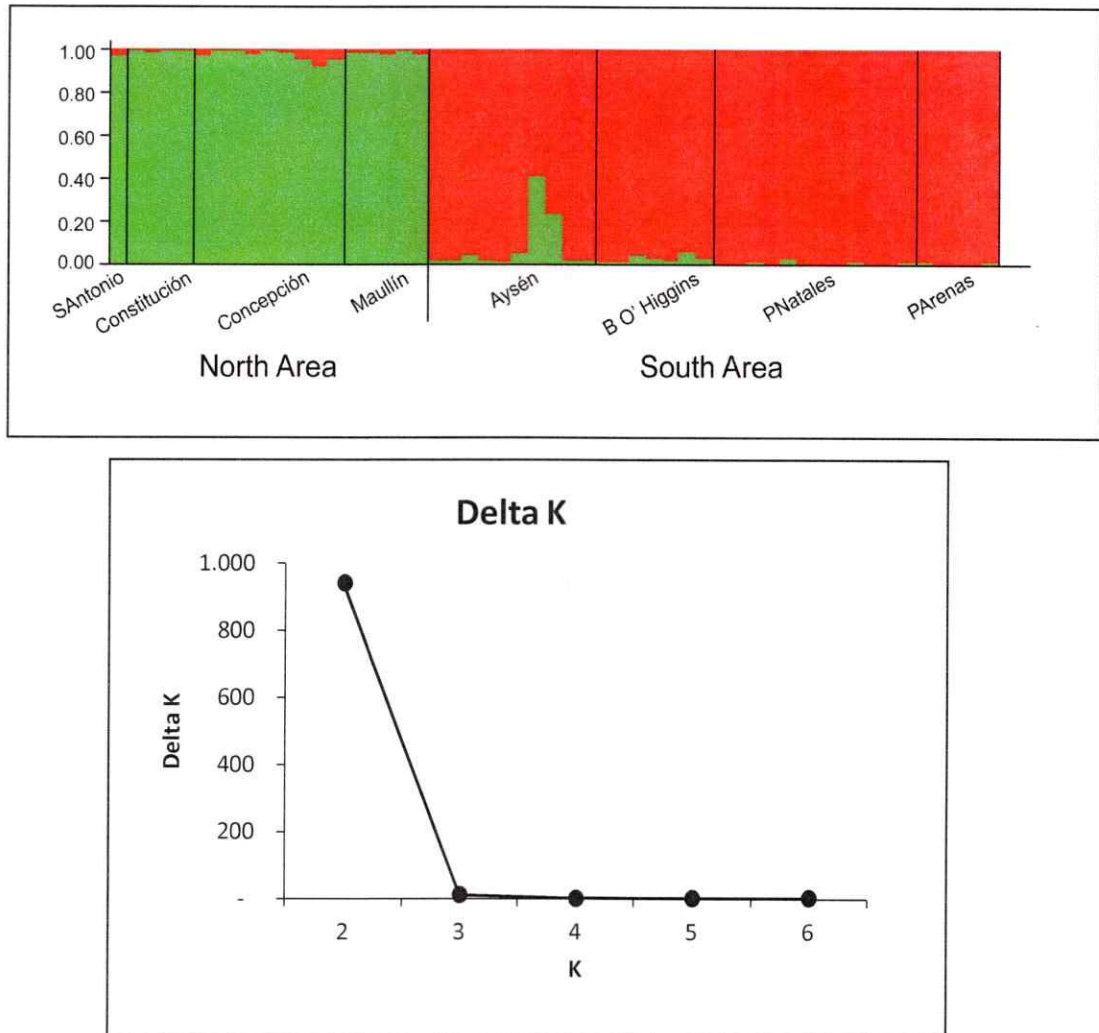


Figure 2. Bayesian clustering from STRUCTURE for the Chilean dolphin along its distribution (above) and Evanno method in STRUCTURE HARVESTER (below). The most likely number of genetic clusters in the data set was identified as 2. Each individual is represented by a vertical column partitioned into colored segments, with the length proportional to the individual's estimated membership coefficient for the 2 groups: North and South areas.



Table 1. Genetic variability at 21 microsatellite markers and 663 bp (mtDNA control region) in the Chilean dolphin along its distribution range. N number of samples, Hap N number of haplotypes, Hap r number of haplotypes after rarefaction, h haplotype diversity, n nucleotide diversity, Na average number of alleles, AR allelic richness (average number of alleles adjusted for sample size), He expected heterozygosity, Ho observed heterozygosity.

Locality	mtDNA					Microsatellites				
	N	Hap N	Hap r	$h \pm (SD)$	$n\% \pm (SD)$	N	Na	AR	He	Ho
Total Area	64	14		$0.75 \pm 0.053$	$0.38 \pm 0.002$	53			0.47	0.43
North	24	7	7	$0.86 \pm 0.034$	$0.37 \pm 0.002$	19	3.05	3.04	0.45	0.47
South	40	8	$6 \pm 1.05$	$0.56 \pm 0.086$	$0.24 \pm 0.001$	34	3.86	$3.55 \pm 0.34$	0.42	0.41

### Mitochondrial sequence diversity and population structure

A total of 14 haplotypes were defined by 15 polymorphic sites among the 64 individuals. The most common haplotype (H1, 31 samples) was shared between the North and South populations but at different frequencies (Figure 3). There were three haplotypes (H3-H4-H7) found in 5-6 samples each; four rare haplotypes (H2-H6-H10-H13) in 2-3 samples each and six unique haplotypes (H5-H8-H9-H11-H12-H14) found in only one sample. Relationships among the haplotypes and their relative frequencies are shown in Figure 3 and Table 2 respectively.

Table 2. Mitochondrial haplotype frequency of Chilean dolphins per population (North and South) and overall study area.

Haplotype	North	South	Total
H1	5	26	31
H2		3	3
H3	5		5
H4	6		6
H5	1		1
H6	3		3
H7		6	6
H8		1	1
H9		1	1
H10	2		2
H11		1	1
H12		1	1
H13	2		2
H14		1	1
Samples	24	40	64

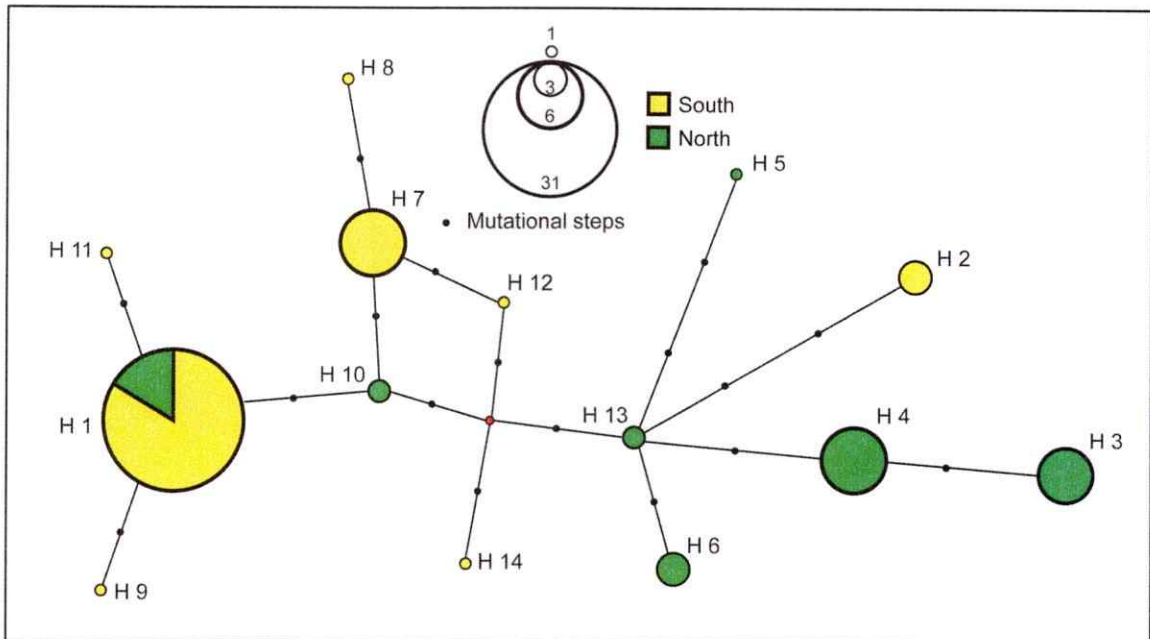


Figure 3. Median-joining network of mtDNA control region haplotypes of the Chilean dolphin along its distribution. Circle size is proportional to the number of individual sharing a haplotype. Length of the lines is proportional to the number of mutational steps separating haplotypes. Green: North area, Yellow: South area.

Overall, haplotype diversity ( $h$ ) was  $0.75 \pm 0.053$  and nucleotide diversity ( $\pi$ ) was  $0.038 \pm 0.002$  (Table 1). Haplotype diversity ( $h$ ) was greater in the North Area ( $0.86 \pm 0.034$ ) than in the South Area ( $0.56 \pm 0.086$ ;  $\chi^2=21.86$   $df=1$   $P<0.0001$ ). Nucleotide diversity estimates were  $0.37\% \pm 0.002$  in the North and  $24\% \pm 0.001$  in the South (Table 1).

Results from population differentiation analysis indicated a significant amount of genetic variation among areas with significant values of  $\Phi_{ST}$  and  $F_{ST}$  ( $\Phi_{ST}= 0.39$ ,  $P<0.0001$  and  $F_{ST}= 0.19$ ,  $P<0.0001$ ).  $\Phi_{ST}$  (pairwise genetic distance) showed greater values than  $F_{ST}$  (haplotype frequencies) and PERMUT results showed a consistent phylogeographic structure ( $N_{ST}= 0.537$ ,  $P= 0.0004$ ). Analyzing simultaneously the two markers, the spatial model in GENELAND identified 2 clusters which boundary stand between Maullín ( $41,6^\circ S$ ) and Aysén ( $46,6^\circ S$ ) (Figure 4).

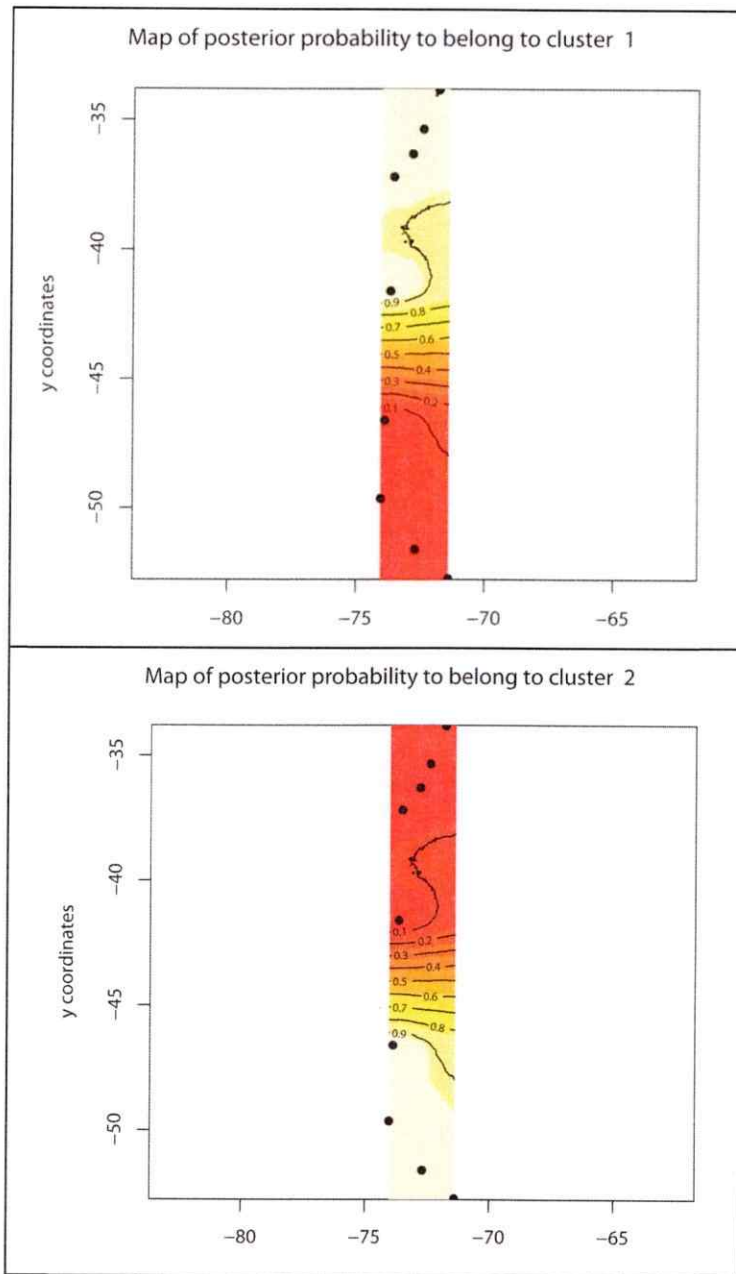


Figure 4. Posterior probabilities of population membership and genetic discontinuities from the spatial model in GENELAND for the Chilean dolphin along its distribution. Contour lines indicate the spatial position of genetic discontinuities and lighter colors indicate higher probabilities of population membership. Two genetic clusters were identified. Superior map: population in the North area and Inferior map: population in the South area.

## Discussion

Overall, Chilean dolphin populations show similar values of genetic diversity (mtDNA) than those reported for other congeners such as *C. commersonii* ( $h= 0.807$ , Pimper *et al.* 2010) and *C. hectori* ( $h= 0.846$ , Hamner *et al.* 2012) but less than the genetic diversity reported for *C. heavisidii* ( $h= 0.962$ , Van Vuuren *et al.* 2002). At the nucleotide diversity level, overall *C. eutropia* showed a similar value to that reported for *C. commersonii* ( $\pi= 0.004$ , Pimper *et al.* 2010) and lower than the value reported for *C. hectori* ( $\pi= 0.00787$ , Hamner *et al.* 2012). Considering heterozygosity values, the Chilean dolphin population had lower but not significantly different values than Hector's dolphin (*C. hector hectori*) ( $H_o: 0.47$ ,  $H_e: 0.43$  vs.  $H_o: 0.53$ ,  $H_e: 0.56$  Hamner *et al.* 2012).

Two populations of *Cephalorhynchus eutropia* were identified by 21 loci microsatellite and mtDNA (Dloop) within its distribution; the North population from San Antonio to Maullín and the South population from Aysén to Punta Arenas (see Figure 1). Microsatellite analysis revealed significant differentiation between areas for both  $F_{ST}$  and  $R_{ST}$  indices. The differentiation index values are high ( $F_{ST}=0.15$  and  $R_{ST}=0.19$ ), generally higher than those reported for other dolphin species:  $F_{ST}= 0.05$   $p=0.01$  for *Delphinus delphis* along the East Australian Coast, (Moller *et al.* 2011);  $F_{ST}=0.05$   $p= 0.001$  for inshore *Tursiops aduncus* in Moreton Bay, Australia, (Ansman *et al.* 2012);  $F_{ST}=0.009$   $p<0.001$  for *Tursiops truncatus* in coastal waters of the western North Atlantic (Rosel *et al.* 2009);  $F_{ST}=0.02-0.09$   $p<0.001$  for a worldwide phylogeography of *Delphinus* (Amaral 2009). Differentiation values similar to those found in this study were reported in harbor porpoises, *Phocoena phocoena* ( $F_{ST}= 0.14-0.314$ , Fontaine *et al.* 2007). However, these populations are geographically isolated (Black Sea and eastern Atlantic); samples from a continuous area in the eastern North Atlantic showed values much lower than our results ( $F_{ST}=0.001-0.09$   $P<0.001$ , Fontaine *et al.* 2007). A strong structuration pattern was also reported for the congeneric Hector dolphin, *Cephalorhynchus hectori*, an endemic species of



New Zealand which inhabits the North and South Islands. In this case two subspecies were recognized; *C. hectori maui* for the North Island population and *C. hectori hectori* for the South Island populations (Baker *et al.* 2002). Recently, the split of *C. hectori* into two subspecies was further supported by a study based on a larger sample of mtDNA and an extensive survey of microsatellites (Hamner *et al.* 2012).

The genetic differentiation in microsatellites reported for the subspecies of the North and South Islands of New Zealand ( $F_{ST}=0.167$   $p<0.001$ ; Hamner *et al.* 2012) is similar to that of the North and South populations of the Chilean dolphin ( $F_{ST}=0.15$ ,  $R_{ST}=0.19$ ). However, in contrast with Chile, the structure in New Zealand is related to the presence of the Cook Strait between the islands, which produces a geographic discontinuity as a barrier to gene flow in this species, which has a reduced home range (Brager *et al.* 2002; Rayment *et al.* 2009). Despite the absence of apparent geographic discontinuity, four populations of this species were characterized by mitochondrial DNA control regions and nuclear microsatellite markers along the South Island of New Zealand, (Pichler 2001). However, the genetic differentiation values obtained for the different populations of *C. hectori hectori* in the South Island ( $F_{ST} = 0.058$ ,  $p<0.001$  among the east, west and south coast regions and  $F_{ST} = 0.043$ ,  $p=0.005$  between the two local populations within the south coast, Hamner *et al.* 2012), are substantially lower than those obtained between the two contiguous populations of *C. eutropia*. In *C. hectori hectori*, factors such as avoidance of deep water have been proposed as a limiting factor of the distribution of the species (Brager *et al.* 2003) again associated with its limited home range, estimated around 31 to 33 km (Brager *et al.* 2002; Rayment *et al.* 2009). The absence of the species reported along a vast area between the west and south coasts characterized by depths exceeding 300 m (Dawson and Slooten 1988; Slooten *et al.* 2004) could have originated the observed genetic structure.

The structure showed by the microsatellites in this study suggests the current presence of a barrier which limits the gene flow between the two populations. The migration rates estimated with these markers are quite low in both directions, much below the value of  $Nm < 1$  suggested by Wright (1931) as the necessary condition for gene flow to be a determining factor in population structure (Wolf & Soltis 1992). No first-generation migrants were found between the two populations of *Cephalorhynchus eutropia*, which corroborates limited movement of individuals. However, two individuals were identified as second or third generation migrants from north to south; both were from Aysén, which was the northernmost sample of the South Area and is close to the limit between the two populations. The structuration indices obtained using mitochondrial DNA also indicated a marked differentiation between the areas ( $F_{ST} = 0.19$  and  $\Phi_{ST} = 0.39$   $P < 0.0001$ ), which was greater for  $\Phi_{ST}$  (which considers the genetic distance between haplotypes) than for  $F_{ST}$  (based on haplotype frequencies). These results indicate the existence of a phylogeographic structure for the species, and therefore a pattern of historical genetic structuring (Chih-Horng & Avise 2005, Amaral *et al.* 2007).

The pattern of genetic structure observed in the present study appears to coincide with two marine major spatial biogeographic units: (1) an area located from 30° S to 42° S (Intermediate Zone or Central /southern region) and (2) a southern area from 42° S to 56° S called the Magellan Province or the Austral Fjords Region by Camus (2001) and Escribano *et al.* (2003), respectively. Around 42°S latitude, the West Wind Drift reaches the coast and divides into the northward flowing Humboldt Current and the poleward Cape Horn Current, which passes around the continent through the Drake Passage, influencing both the east and west coasts of South America (Pickard 1973). This biogeographic pattern has been related to oceanographic changes associated with the origin and installation of the West Wind Drift current during the late Tertiary or from subsequent Quaternary fluctuations (Thiel *et al.* 2007).

Geographic positions of biogeographic breaks are mainly determined by the range limits of species (Lomolino *et al.* 2010). Some species can cross these boundaries while others, depending on their ability to disperse and survive in different environmental conditions, may exhibit strong phylogeographic structure associated with biogeographic breaks (Dawson 2001). In this case, the genetic structure pattern is generally considered as a consequence of limited gene flow associated with hydrography, coastal topography, temperature discontinuities and other factors (Avice *et al.* 1987, Avice 1992).

There is no evident physical barrier which contributes to the limited gene exchange between the North and South populations of the Chilean dolphin, so, for this actively-dispersing species, the population differentiation may be a result of an integral (synergic) scenario of environmental factors and behaviors developed in different habitat types. The differences in the types of food supply, combined with oceanographic and topographic differences may potentially contribute to the separation (differentiation) of the populations.

The Intermediate zone (30° S - 42°S) region is characterized by the Humboldt Current System (HCS), which extends along the west coast of southern Chile (~42°S) up to Ecuador and the Galapagos Islands (Montecino *et al.* 2005, Thiel *et al.* 2007). The HCS is considered one of the most productive marine ecosystems, characterized by cold nutrient-rich waters being transported northward and nutrient-enriched subsurface waters up welled along the shorelines of Ecuador, Peru and northern Chile (Thiel *et al.* 2007). This area is also characterized by an open and exposed coast with the presence of river runoff (Strub *et al.* 1998), where the Chilean dolphin shows an estuarine habitat preference (Goodall *et al.* 1988b, Capella *et al.* 1999, Pérez-Alvarez *et al.* 2007). The absence of large river north of Valparaíso seems to be the factor that limits its distribution in the north. Historical information revealed that the Chilean dolphin has entered rivers, for example, the species has been observed at least 5 km upstream from the mouth of the Río Valdivia (39°S) (Goodall *et al.* 1988b) and upstream of the mouth of Maule

River (35°S) (local fishermen, pers. comm.). In contrast, the austral fjords region (42° - 56° S) of Chile is a protected area of southern fjords and channels (Goodall et al 1994a) and is characterized by water in the inlets which originates from Subantarctic Water and the melting of resident glaciers (Escribano 2003). In this area, Chilean dolphins are mainly located in protected zones in fjords and channels. In general, group sizes are small, ranging from 2 - 10 individuals (Goodall et al 1988b, Heinrich 2006), but large aggregations with tens to hundreds of dolphins have been also reported in the North area, for example, in the open coast of Valdivia (Oporto 1988) and at the mouth of the Maule River (Pérez-Alvarez et al. 2007).

These biographic regions are also different in fish composition, which is a relevant factor in the distribution of *Cephalorhynchus eutropia*, which feeds on a wide variety of coastal prey, focusing on benthic and small pelagic schooling fish and squid (Dawson et al. 2009). The coastal fish fauna occurring from 30° to 42°S (central Chile) is a mixture of subantarctic, subtropical, pan-oceanic and a few endemic fish species (Ojeda et al. 2000). The dominant species among the small-sized fish consumers are anchovy, *Engraulis ringens*, and Pacific sardine, *Sardinops sagax*; large predators include the jack mackerel, *Trachurus murphyi*, hake, *Merluccius gayi*, and cephalopods (Neira & Arancibia 2004). The information on the diet of the Chilean dolphin in this area comes from stomach contents of dolphins caught in a coastal set-net fishery along the open coast (Oporto 1990). The analysis revealed the presence of sardines (*Strangomera bentincki*), anchovetas (*Engaulis rigens*) and róbalo/Chilean rock cod (*Eleginops maclovinus*) Oporto 1988; Goodall 1994a. Additionally local fishers from the Maule River identify the preferred area of Chilean dolphin in that locality as the main fishing area for *Eleginops maclovinus* (Pérez-Alvarez et al. 2007). In contrast, over the continental shelf of the austral fjords region, the fish community is dominated by the demersal species *Macruronus magellanicus* and *Merluccius australis* (Escribano et al. 2003). Unfortunately, there is no formal information about the diet of Chilean dolphin in the South area.



Habitat discontinuities associated with changes in oceanographic features, prey distribution and philopatric behavior have been previously identified as influencing the spatial genetic structure of several other delphinid species (e.g. Hoelzel *et al.* 1998a; Mendez *et al.* 2010; Möller *et al.* 2007; Natoli *et al.* 2005; Rosel *et al.* 2009). In this context, the historical correlation of remote sensing environmental data (chlorophyll concentration, water turbidity and surface temperature) seems to be relevant in the understanding of dolphin population structure (i.e. for genetically isolated populations of the Franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei*, Mendez *et al.* 2010). So further studies on Chilean dolphin should incorporate the analysis of such oceanographic variables, to bring light on the processes responsible of its population structure.

### **Conservation implications**

In spite of the marked differentiation found between the North and South populations of the Chilean dolphin with microsatellite markers and the phylogeographic structure shown by the mtDNA, the presence of a shared haplotype and incomplete lineage sorting does not allow us to identify these two areas as Evolutionarily Significant Units (ESU) (Ryder 1986, Conner *et al.* 2004). However, they may be described as different Management Units using the operational description of Moritz (1994). This author suggested that populations that do not show reciprocal monophyly for mtDNA alleles, yet have diverged in allele frequency, are significant for conservation in that they represent populations connected by such low levels of gene flow that they are functionally independent.

In the same genus, based on morphological and genetic evidence, Baker *et al.* (2002) defined the subspecies *C hectori maui* for North Island population of New Zealand and *C hectori hectori* for South Island population. This decision followed the recommendation of Avise (2000) who mentioned that subspecies should conform one or a set of conspecific populations with a distinct long-term history, mostly separate from other such units (ESU) and Dizon *et al.* (1994), who characterized populations with the highest probability of being an ESU as having a

discontinuous genetic divergence pattern where a locally adapted and closely related populations is geographically separated. The North Island population of Hector's dolphins, despite apparently not having a long-term evolutionary history, fits this ESU definition and therefore meets that particular criterion for subspecific status (Baker *et al.* 2002). In this context, the biogeographical, biological, genetic and habitat differences detected between the two identified units of *C. eutropia* (North and South population) could potentially be considered as valid criteria to define subspecies in the Chilean species. Independently of questions of taxonomic status, the marked genetic and phylogeographic structure found between the two populations of *C. eutropia* allows the definition of different management units with independent conservation strategies, as proposed for the subspecies *C. hectori hectori* and *C. hectori maui*.

Another important factor to consider in management unit characterization is population size. Abundance estimation for the congener *C. hectori* revealed that these animals are characterized by low overall abundance (Slooten *et al.* 2004, Slooten *et al.* 2006.) Hector's dolphin has an estimated abundance of 7,270 individuals (95% CI = 5303–9966; Slooten *et al.* 2004) distributed discontinuously around the South Island and Maui's dolphin population is about 80 individuals (95 %CI = 48–252) concentrated along the central west coast of the North Island (Baker *et al.* 2013). There are no estimations of population abundance for *C. eutropia*; however, the effective population size ( $N_e$ ) of this study using microsatellites showed lower values for the North population (North: 109/39, South: 458/101 individuals, estimated by LAMARC/LDNE, respectively). These values appear to indicate greater abundance in the southern part of the distribution of this species; however, this must be verified by properly conducted abundance estimations.

Finally, this study provides valuable biological and ecological information for *C. eutropia* along its distribution range. Chilean dolphins are among the least known members of the family Delphinidae (Jefferson *et al.* 1993); the species was catalogued as Data Deficient "DD" (IUCN

2006) due the insufficient information to judge its conservation status. Regardless of the lack of information on past and present population size, human impacts may have severely reduced their distribution and abundance (Heinrich 2006); so currently the species is catalogued as Near Threatened "NT" (IUCN 2013). Along with the need to perform population census studies of this species in its distribution range we feel that it is important to increase the genetic sampling of the species, especially in the area which limits the North and South populations (Chiloé sector). It is also necessary in the conservation strategies to identify the current threats to which the Chilean dolphin is exposed and ways to mitigate their impact.

### **Acknowledgments**

We would like to thank to the following people for help in field work and/or providing samples: José Luis Brito, Jorge Gibbons, Valeria Sabaj, Marcelo Flores, Ricardo Matus, Olivia Blank, Macarena Santos, Gabriela Silva and Juan José Salas. We thank Claudio Gonzales, Claudia Maturana, Jimena Guerrero, Angie Díaz, Fabiola Peña, Debbie Steel, Angie Sremba, Alana Alexander and Lida Pimper for laboratory and/or analysis assistance. This research is part of a PHD Thesis and was supported by funding from CONICYT Doctoral Thesis Scholarship AT-24100074, MECESUP UCH0803, IEB projects ICM P05-002 and PFB 023, Centro de Investigación Eutropia, INNOVA-CORFO project PN Bernardo O'Higgins (CEQUA), Aysen Biodiversity Project (Raleigh) and the "Expedición Fitz Roy" tourist company.

## Literature Cited

- Aasen E, Medrano JF (1990) Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *BioTechnology* **8**, 1279–1281.
- Aljanabi S, Martínez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* **25**, 4692–4693.
- Amaral AR, Sequeira M, Cedeira-Martínez J, Coelho MM (2007) New insights on population genetic structure of *Delphinus delphis* from the northeast Atlantic and phylogenetic relationships within the genus inferred from two mitochondrial markers. *Marine Biology* **151**, 1967–1976.
- Amaral AR, Beheregaray LB, Bilgmann K, Freitas L, Robertson KM, Sequeira M, Stockin KA, Coelho MM, Möller LM (2009). A multilocus perspective on the worldwide population structure of common dolphins (genus *Delphinus*). International Whaling Commission doc. SC/62/SM2.
- Ansmann IC, Parra GJ, Lanyon JM, Seddon JM (2012) Fine-scale genetic population structure in a mobile marine mammal: inshore bottlenose dolphins in Moreton Bay, Australia. *Molecular Ecology* **21**, 4472–4485.
- Avise JC (1992) Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* **63**, 62–76.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species* Harvard University Press, London.
- Baker AN, Smith ANH, Pichler FB (2002) Geographical variation in Hector's dolphin: recognition of new subspecies of *Cephalorhynchus hectori*. *Journal of The Royal Society of New Zealand* **32**, 713–727.
- Baker CS, Hamner RM, Cooke J, Heimeier D, Vant M, Steel DJ, Constantine R (2013) Low abundance and probable decline of the critically endangered Maui's dolphin estimated by genotype capture–recapture. *Animal Conservation* **16**, 224–233.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

- Bérubé M, Jorgensen H, McEwing R, Palsboll PJ (2000) Polymorphic di-nucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*. *Molecular Ecology* **9**, 2155–2234.
- Bräger S, Dawson SM, Slooten E, *et al.* (2002) Site fidelity and along-shore range in Hector's dolphin, an endangered marine dolphin from New Zealand. *Biological Conservation* **108**, 281-287.
- Buchanan FC, Friesen MK, Littlejohn RP, Clayton JW (1996) Microsatellites from the beluga whale *Dephinapterus leucas*. *Molecular Ecology* **5**, 571-575.
- Butler K, Field C, Herbinger CM, Smith BR (2004) Accuracy, efficiency and robustness of four algorithms allowing full sibship reconstruction from DNA marker data. *Molecular Ecology* **13**, 1589–1600.
- Caldwell M, Gaines MS, Hughes CR (2002) Eight polymorphic microsatellite loci for bottlenose dolphin and other cetacean species. *Molecular Ecology Notes* **2**, 393-395.
- Camus PA (2001) Biogeografía marina de Chile continental. *Revista Chilena de Historia Natural* **74**, 587-617.
- Capella J, Vilina Y, Gibbons J (1999) Observaciones de cetáceos en Isla Chañaral y nuevos registro para el área de la Reserva Nacional Pingüino de Humboldt, northe de Chile. *Estudios Oceanológicos* **18**, 57–64.
- Chih-Horng K, Avise J (2005) Phylogeographic breaks in low-dispersal species: the emergence of concordance across gene trees. *Genetica* **124**, 179–186.
- Cipriano F, Hevia M, Íñiguez M (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.
- Collet A, Robineau D (1988) Data on the genital tract and reproduction in Commerson's dolphin (*Cephalorhynchus commersonii* lacepede 1804) from the Kerguelen Islands. *Report of the International Whaling Commission (Special Issue)* **9**, 119–141.
- Conner JK, Hartl DL (2004) *A primer of ecological genetics* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Dalebout ML, Robertson KM, Frantzis A, *et al.* (2005) Worldwide structure of mtDNA diversity among Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*): implications for threatened populations. *Molecular Ecology* **14**, 3353-3371.
- Dawson MN (2001) Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? *Journal of Biogeography* **28**, 723-736.
- Dawson S (2002) *Cephalorhynchus* dolphins. In: *Encyclopedia of Marine Mammals* (eds. Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM), pp. 200-203. Academic Press, San Diego.
- Dawson S (2009) *Cephalorhynchus* dolphins. In: *Encyclopedia of Marine Mammals. Second Edition* (eds. Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM), pp. 191-196. Academic Press, San Diego.
- Dawson SM, Sooten E (1988) Hector's dolphin: *Cephalorhynchus hectori*: distribution and abundance. *Report of the International Whaling Commission Special Issue* **9**, 315-324.
- Dizon AE, Perrin WF, Akin PA (1994) Stocks of dolphins (*Stenella* spp. and *Delphinus delphis*) in the eastern tropical Pacific: a phylogeographic classification, p. 20. NOAA Technical Report National Marine Fisheries Service 119.
- Earl DA, von Holdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359-361.
- Escribano R, Fernández M, Aranís A (2003) Physical-chemical processes and patterns of diversity of the Chilean eastern boundary pelagic and benthic marine ecosystem: An overview. *Gayana* **67**, 190-205.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Filatov DA (2002) PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes* **2**, 621-624.

- Fontaine MC, Baird SJ, Piry S, *et al.* (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.
- Galov A, Kocijana I, Laub G, *et al.* (2011). High genetic diversity and possible evidence of a recent bottleneck in Adriatic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mamm Biol* **76**: 339-344.
- Gilson A, Syvanen M, Levine K, Banks J (1998) Deer gender determination by Polymerase Chain Reaction: validation study and application to tissues, bloodstains and hair forensic samples from California. *California Fish and Game* **84**, 159–169.
- Goodall RNP (1994a) Chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* (Gray 1846). In: *Handbook of Marine Mammals* (eds. Ridgway SH, Harrison R), pp. 269–287. Academic Press.
- Goodall RNP (1994b) Commerson's dolphin *Cephalorhynchus commersonii* (Lacepede 1804). In: *Handbook of Marine Mammals* (eds. Ridgway SH, Harrison R), pp. 241–267. Academic Press.
- Goodall RNP, Norris K, Galeazzi A, *et al.* (1988a) Studies of Commerson's dolphins, *Cephalorhynchus commersonii*, off Tierra del Fuego, 1976-1984, with a review of information on the species in the South Atlantic. *Report of the International Whaling Commission (Special Issue) 9*, 3-70.
- Goodall RNP, Norris K, Galeazzi A, Oporto J, Cameron I (1988b) On the Chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* Gray, 1846. *Report of the International Whaling Commission (Special Issue) 9*, 197- 257.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Guillot G, Leblois R, Coulon A, Frantz A (2009) Statistical methods in spatial genetics. *Molecular Ecology* **18**, 4734–4756.
- Hammer O, Harper D, Ryan P (2001) Past : Paleontological statistics Software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* **4**, 9.



- Hamner RM, Pichler FB, Heimeier D, Constantine R, Baker CS (2012) Genetic differentiation and limited gene flow among fragmented populations of New Zealand endemic Hector's and Maui's dolphins. *Conservation Genetics* **13**, 987–1002.
- Harlin AD, Würsig B, Baker CS, Markowitz TM (1999) Skin swabbing for genetic analysis: application to dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Marine Mammal Science* **15**, 409–425.
- Heinrich S (2006) *Ecology of Chilean dolphins and Peale's dolphins at Isla Chiloé, southern Chile*, University of St Andrews.
- Hoelzel AR (1998) Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: implications for conservation policy. *The Journal of Heredity* **89**, 451–458.
- Hoelzel AR (2009) Molecular ecology. In: *Encyclopedia of Marine Mammals. Second Edition* (eds. Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM), pp. 736–741. Academic Press, San Diego.
- Hoelzel AR, Dahlheim ME, Stern SJ (1998) Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the Eastern North Pacific and genetic differentiation between foraging specialists. *The Journal of Heredity* **89**, 121–128.
- Hoelzel AR, Goldsworthy SD, Fleischer RC (2002a) Population genetic structure. In: *Marine Mammal Biology. An evolutionary approach* (ed. Hoelzel AR), pp. 325–352. Blackwell Science Ltd.
- Hoelzel AR, Natoli A, Dahlheim ME, *et al.* (2002b) Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **269**, 1467–1473.
- Jefferson T, Leatherwood S, Webber M (1993) *FAO species identification guide. Marine mammals of the world* FAO, Rome.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**, 1099–1006.
- Krützen M, Barre LM, Moller LM, *et al.* (2002) A biopsy system for small cetaceans: darting success and wound healing in *Tursiops* sp. *Marine Mammal Science* **18**, 863–878.

- Krützen M, Valsecchi E, Connor RC, Sherwin WB (2001) Characterization of microsatellite loci in *Tursiops aduncus*. *Molecular Ecology Notes* **1**, 170–172.
- Kuhner MK (2006) LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* **22**, 768–770.
- Lomolino MV, Riddle BR, J. WR, Brown JH (2010) *Biogeography*, Fourth edn. Sinauer, Sunderland, USA.
- Méndez M, Rosenbaum HC, Subramaniam A, Yackulic C, Bordino P (2010) Isolation by environmental distance in mobile marine species: molecular ecology of franciscana dolphins at their southern range. *Molecular Ecology* **19**, 2212–2228.
- Möller L, Pedone Valdéz F, Allen S, *et al.* (2011) Fine-scale genetic structure in short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) along the East Australian Current. *Marine Biology* **158**, 113–126.
- Möller LM, Wiszniewski J, Allen SJ, Beheregaray LB (2007) Habitat type promotes rapid and extremely localised genetic differentiation in dolphins. *Marine and Freshwater Research* **58**, 640–648.
- Montecino V, Strub PT, Chávez FP, *et al.* (2005) Bio-physical interactions off western South America (6,E). In: *The Sea* (eds. Robinson AR, Brink KH), pp. 329–390. Harvard University Press, Cambridge.
- Moritz C (1994) Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **9**, 373–375.
- Natoli A, Birkun A, Aguilar A, Lopez A, Hoelzel AR (2005) Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **272**, 1217–1226.
- Natoli A, Peddemors VM, Hoelzel AR (2004) Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Journal of Evolutionary Biology* **17**, 363–375.
- Neira S, Arancibia H (2004) Trophic interactions and community structure in the upwelling system off Central Chile (33–39°S). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **312**, 349–366.

- Ojeda P, Labra F, Muñoz A (2000) Biogeographic patterns of Chilean littoral fishes. *Revista Chilena de Historia Natural* **73**, 625–641.
- Oporto J (1988) *Biología descriptiva y status taxonómico del delfín chileno Cephalorhynchus eutropia Gray 1846 (Cetacea: Delphinidae)*, Universidad Austral de Chile.
- Oporto JA, Brieva LM (1990) Interacción entre la pesquería artesanal y pequeños cetáceos en la localidad de Queule (IX región), Chile, 197–204.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* **13**, 55–65.
- Palumbi SR (1992) Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology & Evolution* **7**, 114–117.
- Pérez-Álvarez MJ, Álvarez E, Aguayo-Lobo A, Olavarría C (2007) Occurrence and distribution of Chilean dolphin (*Cephalorhynchus eutropia*) in coastal waters of central Chile. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **41**, 405–409.
- Petit RJ (2010) PERMUT version 2.0. [Documentation file]. Available with the program's installation files at <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/PermutCpSSR>
- Pichler F (2001) *Population structure and genetic variation in Hector's dolphin (Cephalorhynchus hectori)* Ph. D., The University of Auckland.
- Pichler F, Dawson S, Slooten E, Baker CS (1998) Geographic isolation of Hector's dolphin populations described by mitochondrial DNA sequences. *Conservation Biology* **12**, 676–682.
- Pichler FB, Baker CS (2000) Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **267**, 97–102.
- Pichler FB, Robineau D, Goodall RNP, *et al.* (2001) Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). *Molecular Ecology* **10**, 2215–2223.
- Pickard GL (1973) Water structure in Chilean fjords. In: *Oceanography of the South Pacific* (ed. Fraser R), pp. 95–104. 1972 New Zealand National Commission UNESCO, Wellington.

- Pimper LE, Baker CS, Goodall RNP, Olavarría C, Remis MI (2010) Mitochondrial DNA variation and population structure of Commerson's dolphins (*Cephalorhynchus commersonii*) in their southernmost distribution. *Conservation Genetics* **11**, 2157–2168.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, *et al.* (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* **95**, 536–539.
- Pritchard JK, Wen X, Falush D. (2007). Documentation for structure software: version 2.2. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 9197–9201.
- Rayment W, Dawson S, Slooten E, *et al.* (2009) Kernel density estimates of alongshore home range of Hector's dolphins at Banks Peninsula, New Zealand. *Marine Mammal Science* **25**, 537–556.
- Robineau D, Goodall RNP, Pichler F, Baker CS (2007) Description of a new subspecies of Commerson's dolphin, *Cephalorhynchus commersonii* (Lacépede, 1804), inhabiting the coastal waters of the Kerguelen Islands. *Mammalia* **2007**, 172–180.
- Röhl A (2002) Network, netw3111.exe downloaded in the web site: [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)
- Rooney AP, Honeycutt RL, Davis SK, Derr JN (1999) Evaluating a putative bottleneck in a population of bowhead whales from patterns of microsatellite diversity and genetic disequilibria. *Journal of Molecular Evolution* **49**, 682–690.
- Rosel PE, France SC, Wang JY, Kocher TD (1999) Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology* **8**, S41–S54.
- Rosel PE, Hansen L, Hohn AA (2009) Restricted dispersal in a continuously distributed marine species: common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in coastal waters of the western North Atlantic. *Molecular Ecology* **18**, 5030–5045.
- Ross HA, Lento GM, Dalebout ML, *et al.* (2003) DNA surveillance: web-based molecular identification of whales, dolphins and porpoises. *The Journal of Heredity* **94**, 111–114.

- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution* **1**, 9–10.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sellas AB, Wells RS, Rosel PE (2005) Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal fine scale geographic structure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Gulf of Mexico. *Conservation Genetics* **6**, 715–728.
- Slooten E, Dawson S, Rayment W, Childerhouse S (2006) A new abundance estimate for Maui's dolphin: What does it mean for managing this critically endangered species? *Biological Conservation* **128**, 576–581.
- Slooten E, Dawson SM, Rayment WJ (2004) Aerial surveys for coastal dolphins: Abundance of Hector's dolphins off the South Island west coast, New Zealand. *Marine Mammal Science* **20**, 477–490.
- Slooten E, Lad F (1991) Population biology and conservation of Hector's dolphin. *Canadian Journal of Zoology* **69**, 1701–1707.
- Softgenetics 2010. <http://www.softgenetics.com>
- Strub PT, Mecías J, Montecino V, Rutllant J, Salinas S (2005) Coastal ocean circulation off western South America coastal segment (6,E). In: *The Sea* (eds. Robinson AR, Brink KH), pp. 273–314. John Wiley, New York.
- Thiel M, Macaya EC, Acuña E, *et al.* (2007) The Humboldt Current System of northern and central Chile. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* **45**, 195–344.
- Valsecchi E, Amos W (1996) Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology* **5**, 151–156.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535–538.

- Van Vuuren BJ, Best PB, Roux J-P, Robinson TJ (2002) Phylogeographic population structure in the Heaviside's dolphin (*Cephalorhynchus heavisidii*): conservation implications. *Animal Conservation* **5**, 303–307.
- Waples RS, Do CHI (2008) LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* **8**, 753–756.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating  $F$ -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358–1370.
- Wolf PG, Soltis PS (1992) Estimates of gene flow among populations, geographic races, and species in the *Ipomopsis aggregata* complex. *Genetics* **130**, 639–647.
- Wright S (1931) Evolution in mendelian populations. *Genetics* **16**, 97–159.
- Yañez P (1948) Vertebrados marinos chilenos. I. Mamíferos. *Revista de Biología Marina, Valparaíso* **1**, 103–123.

## **CAPITULO II: Variación geográfica en odontocetos: Análisis de morfometría craneal de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución**

### **RESUMEN**

La variación geográfica en distintos rasgos de los organismos es de interés sobre todo en especies que presentan una alta capacidad móvil y habitan ambientes aparentemente homogéneos como es el caso de ambientes marinos, donde las barreras geográficas son menos evidentes que en ambientes terrestres. Con el objeto de analizar la variación morfométrica de *Cephalorhynchus eutropia* en un gradiente latitudinal, se realizaron 48 medidas craneométricas a 26 individuos a lo largo de su distribución. Mediante análisis multivariado se identificaron variables morfométricas que contribuyen significativamente a la diferenciación de dos grandes grupos (Norte y Sur;  $\Lambda$  Wilks: 0,28;  $F_{1,13} = 33,08$ ;  $p < 0,00001$ ; Hotelling: 33,892;  $F = 4,692$   $p < 0,00001$ ) los cuales corresponden a dos ambientes biogeográficamente distintos habitados por la especie: un área de frente expuesto, bahías y estuarios desde Valparaíso (33°02'S) hasta Chiloé (42°00'S) y un área de borde costero fragmentado, canales y fiordos entre Chiloé e Isla Navarino (55°00'S). Un análisis preliminar de ecología trófica sugiere que no hay superposición trófica entre individuos de distintas localidades, lo que concuerda con el patrón de diferenciación morfométrica a escala geográfica reducida y con la conducta filopátrica y desplazamientos reducidos descritos a nivel de género. Adicionalmente, se encuentra un patrón craneométrico asociado a la Hipótesis de Productividad de Rosenweig, encontrando una relación positiva entre medidas asociadas a tamaño corporal con zonas identificadas como de alta productividad en la costa chilena. En base a lo anterior y dado que las medidas craneométricas que contribuyen a la variación geográfica son variables funcionales, se propone que la variación geográfica

encontrada podría ser resultado de especialización trófica y desarrollo de ecolocalización, como consecuencia de adaptación a diferentes ambientes.



## INTRODUCCIÓN

El estudio de la variación geográfica manifestada en distintos rasgos de los organismos ha sido de particular interés en los campos de la ecología y la evolución, principalmente por su importancia en ilustrar divergencias adaptativas dentro de una especie (Futuyma 1998). La mayoría de los organismos varían geográficamente en morfología, fisiología, y comportamiento (Schnell *et al.* 1986), emisión de sonidos, cargas parasitarias, contaminantes y caracterización genética (Perrin 2002), dieta (Santos *et al.* 2004) entre otras características, siendo el análisis e identificación de estos patrones de variación, fundamental desde un punto de vista ecológico y evolutivo (Schnell *et al.* 1986). Gould & Jhonston (1972) discuten en torno a este tema preguntándose si esta variación se distribuye espacialmente en gradientes, en unidades con marcadas transiciones, en aumento o disminución desde el centro hacia la periferia y acerca de cuáles serían los determinantes de esta variación. Así, variaciones geográficas en tamaño corporal han sido asociadas a variaciones en temperatura, como lo planteado por la regla biogeográfica de Bergman (Blackburn *et al.* 1999); a variaciones en productividad primaria y tamaño de presa (Rosenzweig 1968, Ashton *et al.* 2000) y a factores oceanográficos como batimetría, temperatura superficial, salinidad superficial y profundidad de la termoclina (Perrin 2002, Hastie 2005).

En odontocetos, se cuenta con registros de variación morfológica en distancias geográficas relativamente cortas (Perrin 1984). La variación geográfica a nivel de caracteres craneales se relaciona principalmente con variación en tamaño y número de dientes, longitud y ancho de la región rostral y orbital y tamaño de la fosa temporal (Amano & Miyazaki 1992, Perrin 2002, Perrin 2003, Molina-Schiller 2006). Dichas variaciones estarían asociadas probablemente a especializaciones tróficas, competencia y desarrollo de ecolocalización, respuestas evolutivas resultantes de las características del hábitat y de la estructura social de la especie (Amaral 2009). Variaciones craneales en delfines oceánicos han sido relacionadas con parámetros

ambientales tales como profundidad, temperatura superficial, salinidad superficial y profundidad de la termoclina (Perrin *et al.* 1994). Dentro de este contexto, la distribución de dos formas de delfines rotadores en el Pacífico Oriental se ha relacionado con diferentes masas de aguas (Fiedler and Reilly, 1993) y así mismo, Ramos *et al.* (2002) reporta variaciones en medidas craneales de Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, a lo largo de la costa suroriental de Brasil. Esta variación geográfica en conjunto con la estructuración poblacional establecida en base a análisis moleculares permite la identificación de diferentes stocks poblacionales y la subdivisión de unidades de manejo para los planes de acción de la especie (Secchi 1998). Por su parte, Molina-Schiller (2006) analiza la variación en tamaño y forma de cráneos de marsopa espinosa, *Phocoena spinnipinii*, a lo largo de sus distribución relacionándolo con variables oceanográficas como temperatura, salinidad y oxígeno disuelto. La autora identifica 3 áreas geográficas (1) Perú (2) Chile y (3) Atlántico, reportando tamaños inferiores para la zona del Perú, superiores para el Atlántico e intermedios para la costa de Chile. Dentro de la familia Delphinidae se ha analizado variación geográfica craneal para el género *Tursiops* (Barreto 2002), *Cephalorhynchus* (Baker *et al.* 2002), *Lagenodelphis* (Perrin 2003), *Delphinus* (Murphy *et al.* 2006), entre otros.

El género *Cephalorhynchus* corresponde a un género de delfines del Hemisferio Sur, de pequeño tamaño, costero, y de distribución restringida. Individuos de las distintas especies del género serían residentes a un área geográfica local, no existiendo evidencia de migraciones a grandes escalas (Dawson 2002). La amplia pero discontinua distribución del género *Cephalorhynchus* podría reflejar una restricción a hábitats de zonas templada-frías del Hemisferio Sur. Se propone que el género se habría originado en Sudáfrica (*C. heavisidii*), posteriormente y producto de la Corriente de Deriva del Oeste, habrían llegado a Nueva Zelanda (*C. hectori*). Un efecto fundador posterior originaría la población que colonizó Sudamérica, la cual habría dado origen a *C. eutropia* y *C. commersonni* y recientemente (10.000 años) una población de *C. commersonii* habría fundado la población de las Islas Kerguelen (Pichler *et al.* 2001). Estructuración

poblacional y variaciones geográficas poblacionales a nivel molecular y morfológico han sido descritas para *C. hectori* (Pichler *et al.* 1998, Pichler y Baker 2000, Baker *et al.* 2002) y *C. commersonii* (Robineau *et al.* 2007), proponiéndose para ambas especies, la categoría taxonómica de subespecie (Baker *et al.* 2002, Robineau 2007). En el caso de *C. hectori*, especie endémica de Nueva Zelanda, un estudio morfológico de caracteres craneales y mandibulares demostró variación entre las poblaciones presentes en la Isla del Norte e Isla del Sur de N. Zelanda respectivamente, diferenciadas con anterioridad a nivel genético. Esta variación en caracteres morfológicos sumado a la evidencia genética que avalaba la ausencia de flujo génico entre ambas poblaciones, permitió la determinación de dos subespecies denominadas *C. hectori maui* para la Isla del Norte, y *C. hectori hectori* para la Isla del Sur de Nueva Zelanda. De similar manera, en base a diferencias morfológicas (tamaño y patrones de pigmentación), genéticas, biogeográficas y conductuales, se determinaron las subespecies *C. commersonii commersonii*, perteneciente a Sudamérica y *C. commersonii kerguelenensis* propia de las Islas Kerguelen (Robineau *et al.* 2007). En cuanto a las diferencias morfológicas, los cráneos de la subespecie de las Islas Kerguelen son significativamente mayores y presentan mayor número de dientes que los de la subespecie Sudamericana, presentando además 3 matices de pigmentación (blanco, gris y negro, Robineau 1984b) mientras que los delfines adultos de Sudamérica son estrictamente de color blanco y negro (Goodall 1994).

El delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia* es la única especie de cetáceo endémica de nuestro país (Yáñez 1948) y uno de los odontocetos más desconocidos a nivel mundial (Goodall *et al.* 1988). Se distribuye a lo largo de la costa central y sur de Chile, desde Concón (32°56'S) a Isla Navarino (55°14' S) (Goodall 1994a, Aguayo-Lobo *et al.* 1998), siendo caracterizada como una especie costera, de aguas poco profundas, al igual que sus congéneres (Dawson 2002). Habita en dos áreas geográficamente distintas: la costa abierta, bahías y estuarios desde Valparaíso (33°02'S) a Chiloé (42°00'S) y canales y fiordos entre Chiloé y la Isla Navarino (Goodall *et al.*

1994), quiebre geográfico concordante con dos de las regiones biogeográficas descritas para el ecosistema marino de sistemas pelágicos (1) región centro-sur de surgencia (30°- 42°) y (2) la región austral de fiordos (44°-55°S) (Escribano *et al.* 2003). En el área de distribución norte (Valparaíso-Chiloé), la especie muestra una marcada preferencia por zonas estuarinas (Goodall *et al.* 1988b, Capella *et al.* 1999, Pérez-Alvarez *et al.* 2007), factor que potencialmente condicionaría su distribución. En relación al rango de hogar y distancias geográficas de desplazamiento, individuos de las distintas especies del género *Cephalorhynchus* serían residentes a un área geográfica local, no existiendo evidencia de migraciones a grandes escalas (Dawson 2002). La escasa información existente para la especie junto a la intervención antrópica histórica y actual a las que ha sido sometida, explican su categoría de conservación "Near Threatened" (NT, IUCN 2009).

En relación a estudios de morfometría craneal de *C. eutropia*, medidas de 13 individuos de la especie son reportadas en Goodall *et al.* 1998 con una finalidad descriptiva; y medidas craneométricas de 8 ejemplares, reportadas y analizadas por Oporto *et al.* 1998 en un contexto comparativo con su congener *C. commersonii*. Adicionalmente, una clave para identificación de la especie en base a características craneales fue desarrollada por Reyes *et al.* 1997 (Tabla 1, Figura 1, 2 y 3). Sin embargo, hasta la actualidad, no ha sido realizado un estudio enfocado en la comparación de morfometría craneal de la especie considerando un gradiente latitudinal. Dentro de este contexto, el presente estudio da cuenta de la variación geográfica a nivel de morfometría craneal de *C. eutropia* a lo largo de su distribución.

Tabla 1. Clave para identificación de cráneos de *Cephalorhynchus eutropia* y de cráneos de cetáceos del Pacífico Sureste (extraída de Reyes *et al.* 1997).

---

DESCRIPCIÓN DEL CRÁNEO

---

1. Cráneo ligero o fuertemente asimétrico; sínfisis mandibular presente; occipital ligeramente inclinado hacia delante; maxilares sin placa orbital; nasales en el vértice del cráneo, detrás de las aberturas nasales y sin cubrirlas. El tamaño del cráneo es considerablemente más pequeño (150 cm o menos a excepción de *Physeter*); dientes presentes; barbas ausentes..... **SUBORDEN ODONTOCETI**
  
  2. Superficie dorsal del cráneo no en forma de cuenca; en caso de presentarse una cuenca, ésta resulta de elevaciones de los bordes externos de los premaxilares; cráneo ligeramente a muy asimétrico; aperturas nasales sin marcada diferencia en tamaño. La mandíbula se extiende aproximadamente hasta el extremo del rostro
  
  3. Las extensiones posteriores de los premaxilares no se elevan para formar crestas asimétricas; pterigoideos con desarrollo de pared externa que cubre el seno pterigoideo; lacrimal fusionado al yugal; dientes funcionales usualmente en maxilas y mandíbula
  
  4. Extremo proximal de los maxilares sin elevación ósea por delante de las aberturas nasales, sino más bien aplanados o ligeramente cóncavos; sin prominencia frontal desarrollada; nasales sin prominencias tuberculares; palatinos poco expuestos en el paladar; pterigoideos relativamente poco separados. Dientes cónicos..... **Familia Delphinidae**
  
  5. En vista ventral, el borde anterior del frontal que limita al seno sub-orbital, no es engrosado ni de forma tubular; dientes con coronas lisas; sínfisis mandibular menos de 1/5 de la longitud de la rama mandibular
  
  6. Más de 7 dientes en hileras dentarias superior e inferior, no sólo confinados a la región sinfisial de la mandíbula. Premaxilares convexos o cóncavos en frente de los orificios nasales. Escotaduras preorbitales poco o bien definidas; a nivel de éstas, el ancho del maxilar es menor que el del premaxilar adyacente
  
  7. Con 19 o más dientes por hilera dentaria; cráneo de tamaño moderado a pequeño, con rostro angosto y terminado en punta
  
  8. Sin surcos en la región palatina de los maxilares, o si se presentan, éstos son muy poco profundos y de poca extensión
  
  9. Con más de 27 dientes por hilera dentaria
  
  10. Cara anterior de los nasales no triangulares, sino más bien cuadrangular u ovalada; el meso-etmoides no alcanza la cara dorsal de los nasales. Caja craneana de forma cuadrangular, casi tan alta como ancha
  
  11. Ancho medio del rostro mayor que el 25% de su longitud: foramina premaxilares de forma circular; foramina maxilares ubicadas a nivel o muy por delante de la base del
-

---

rostro. Premaxilares separados a lo largo de la longitud del rostro. De 28 a 36 dientes por hilera dentaria

12. Huesos nasales con clara definición de la cara anterior, delimitada de la cara superior por un borde afilado; borde anterior de las coanas superiores en forma de V; pterigoideos no en contacto, sino más bien ampliamente separados; procesos cigomáticos más largos que altos. Vómer no visible sobre la superficie del paladar.....Género *Cephalorhynchus*
  13. Premaxilar izquierdo sobrepasa la foramina del meso-etmoides. Bordes posteriores de los maxilares dejan expuesta una amplia área de los frontales; foramen óptico de tamaño reducido; el surco del nervio óptico es alargado y con bordes afilados; largo del rostro mayor que la mitad de la longitud cóndilo-basal..... *Cephalorhynchus eutropia*
-

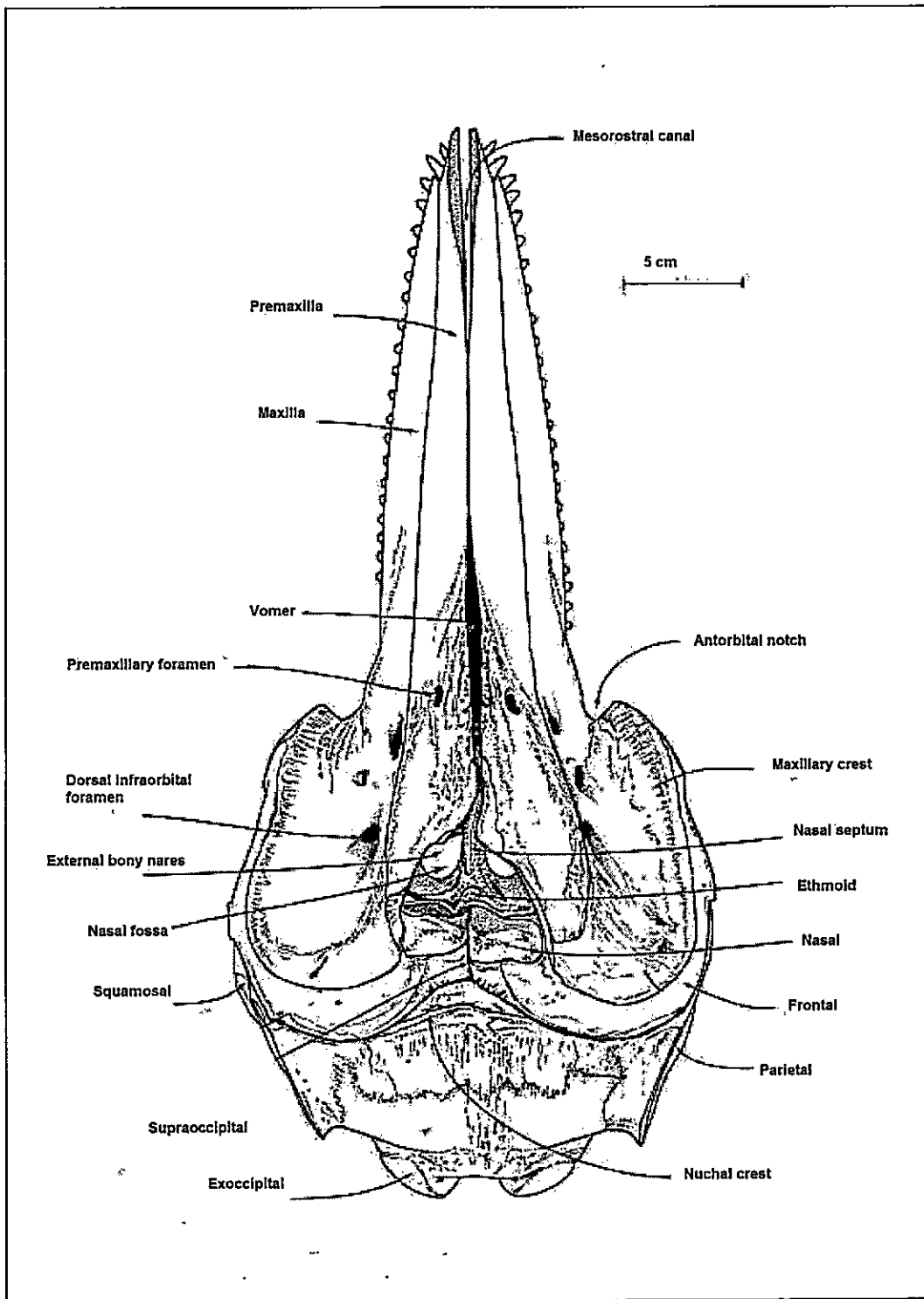


Figura 1. Esquema-tipo de la vista dorsal de un cráneo de ejemplar de odontoceto, Familia Delphinidae (Modificado de Mead & Fordyce 2009).

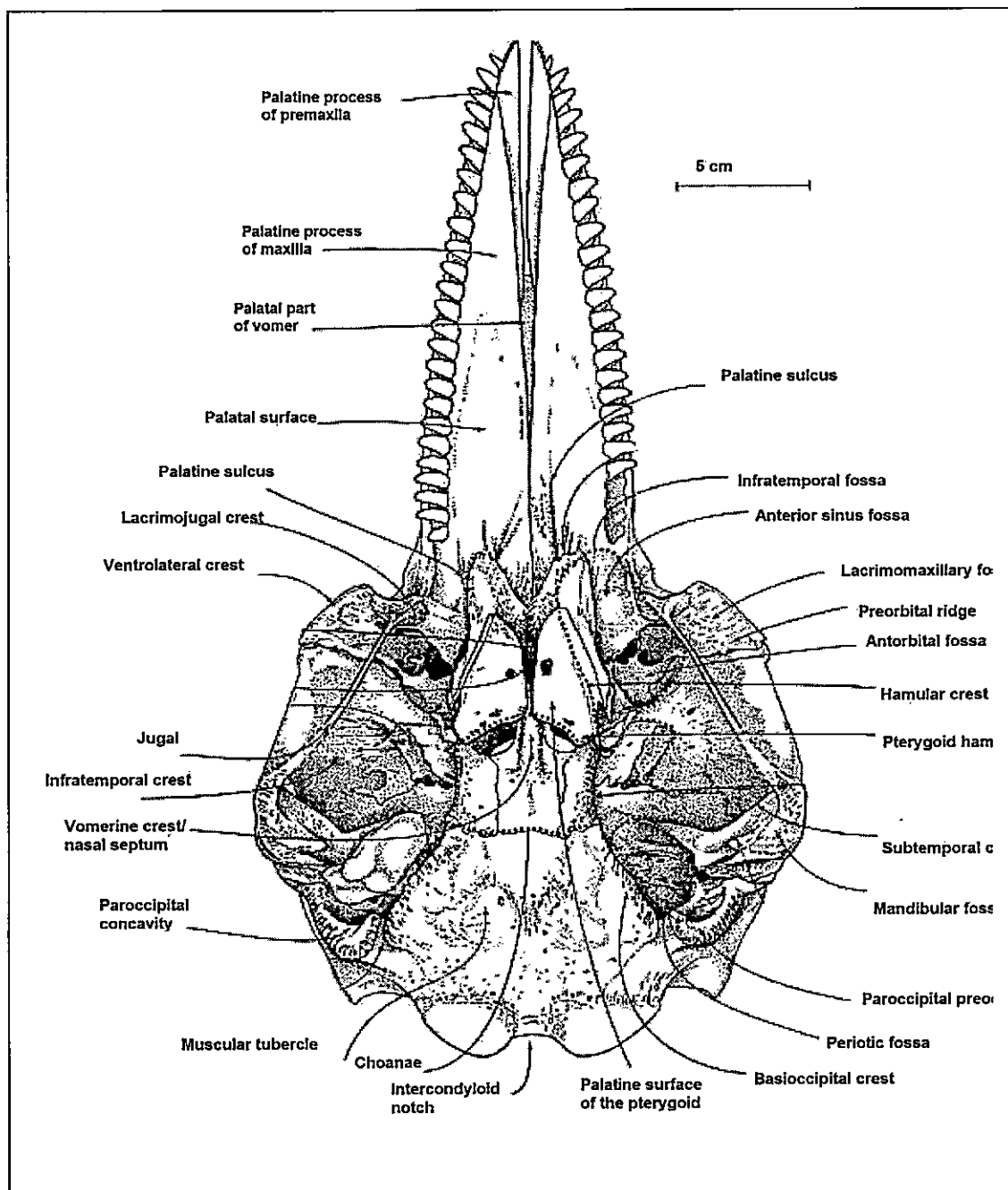


Figura 2. Esquema- tipo de la vista ventral de un cráneo de ejemplar de odontoceto, Familia Delphinidae (Modificado de Mead & Fordyce 2009).



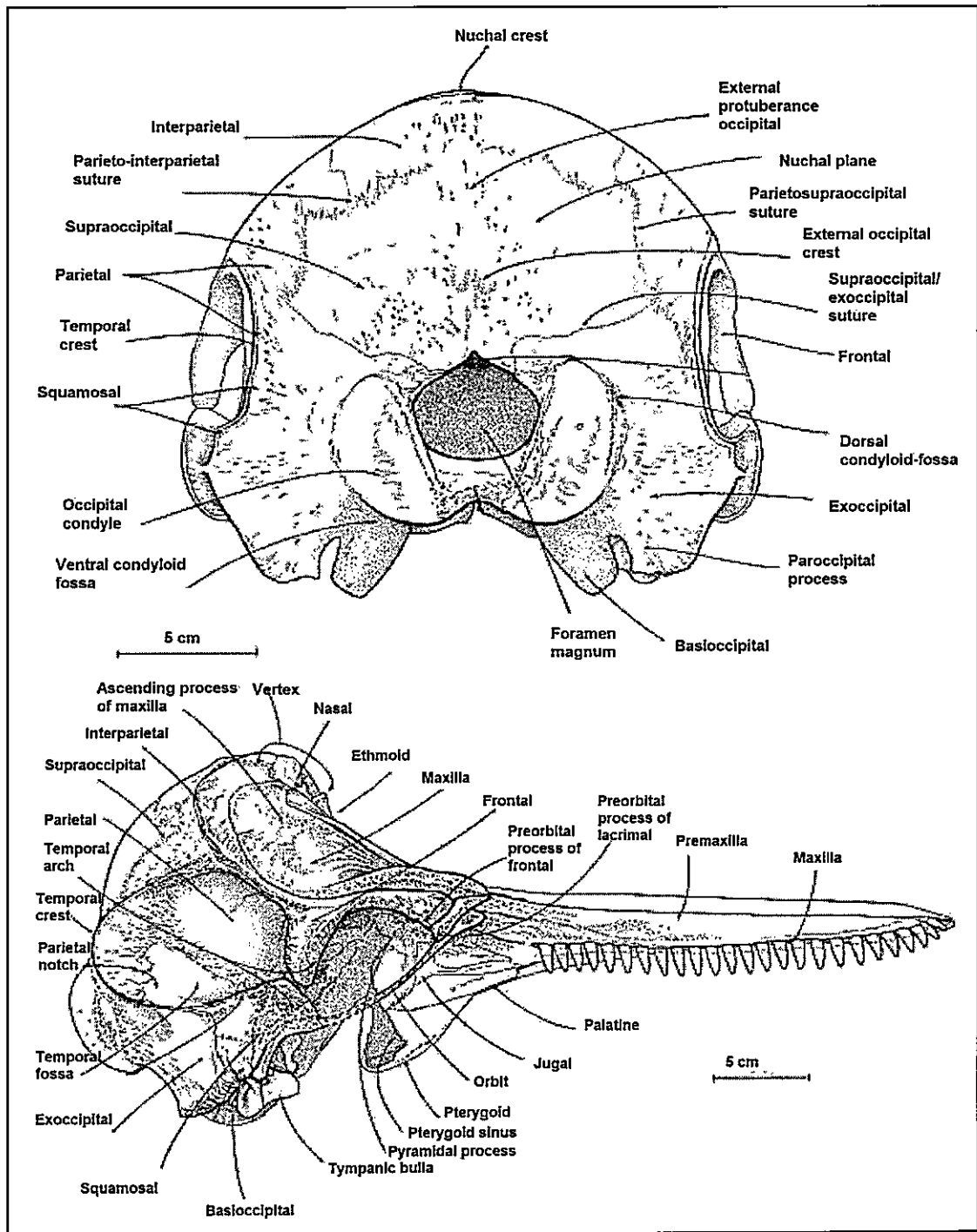


Figura 3. Esquema- tipo de la vista vista posterior (superior) y lateral (inferior) de un cráneo de ejemplar de odontoceto, Familia Delphinidae (Modificado de Mead & Fordyce 2009).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Medidas morfométricas

El estudio se basó en las medidas morfométricas de 26 cráneos de delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia*, provenientes de 7 localidades a lo largo del rango de distribución de la especie (Figura 4). Se realizó una revisión exhaustiva de la presencia de la especie en colecciones óseas tanto a nivel nacional como internacional. Adicionalmente se incluyeron ejemplares provenientes de enmalles facilitados por pescadores artesanales a la investigadora y algunos pertenecientes a colecciones particulares de otros investigadores. Las colecciones que contaban con cráneos de *C. eutropia* fueron: (1) Museo de Ciencias Naturales y Arqueología de San Antonio, San Antonio (2) Museo Nacional de Historia Natural de Santiago, Santiago, (3) Museo de Zoología de la Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas, Concepción (4) Colección del Museo del Instituto de la Patagonia, Universidad de Magallanes, Punta Arenas y (5) Smithsonian National Museum of Natural History, Washington, Estados Unidos.

A modo exploratorio y para minimizar el error asociado a factores ontogenéticos, el análisis de variación geográfica fue realizado considerando (a) solo ejemplares adultos (Guill *et al.* 2003, Ramos *et al.* 2002, Barreto 2000) y (b) ejemplares adultos y juveniles. La identificación de categoría etaria se realizó basándose principalmente en la fusión completa de los huesos parieto-occipital (Westgate 2007, Mead y Fordyce 2009) y maxilar y premaxilar (Bell *et al.* 2002). Dado que este género al parecer desarrolla una fusión craneal incompleta o en estado tardío del desarrollo (Jefferson *et al.* 2004), se complementó la observación de las suturas craneales con la medida de Longitud Cóndilo Basal (LCB, Jefferson *et al.* 2004) de 320 mm; así los individuos que presentaron una medida de superior a 320 mm fueron considerados adultos.

Se realizaron en total 48 medidas craneométricas por ejemplar, las que fueron seleccionadas de estudios comparativos del Suborden Odontoceti (Perrin 1975, Perrin 1994, Ramos 2002, Bell *et al.* 2002, Molina 2006; Simon Gutstein 2009, Mead y Fordyce 2009) y algunas identificadas durante el desarrollo del presente estudio (SOCH, VF, PMFH, FPMRB, FPMEN, Tabla 2, Figura 5). Las medidas fueron realizadas utilizando los Caliper digitales Mitutoyo 200mm y Stainless 300mm por un solo investigador, para minimizar el error inter-observador.

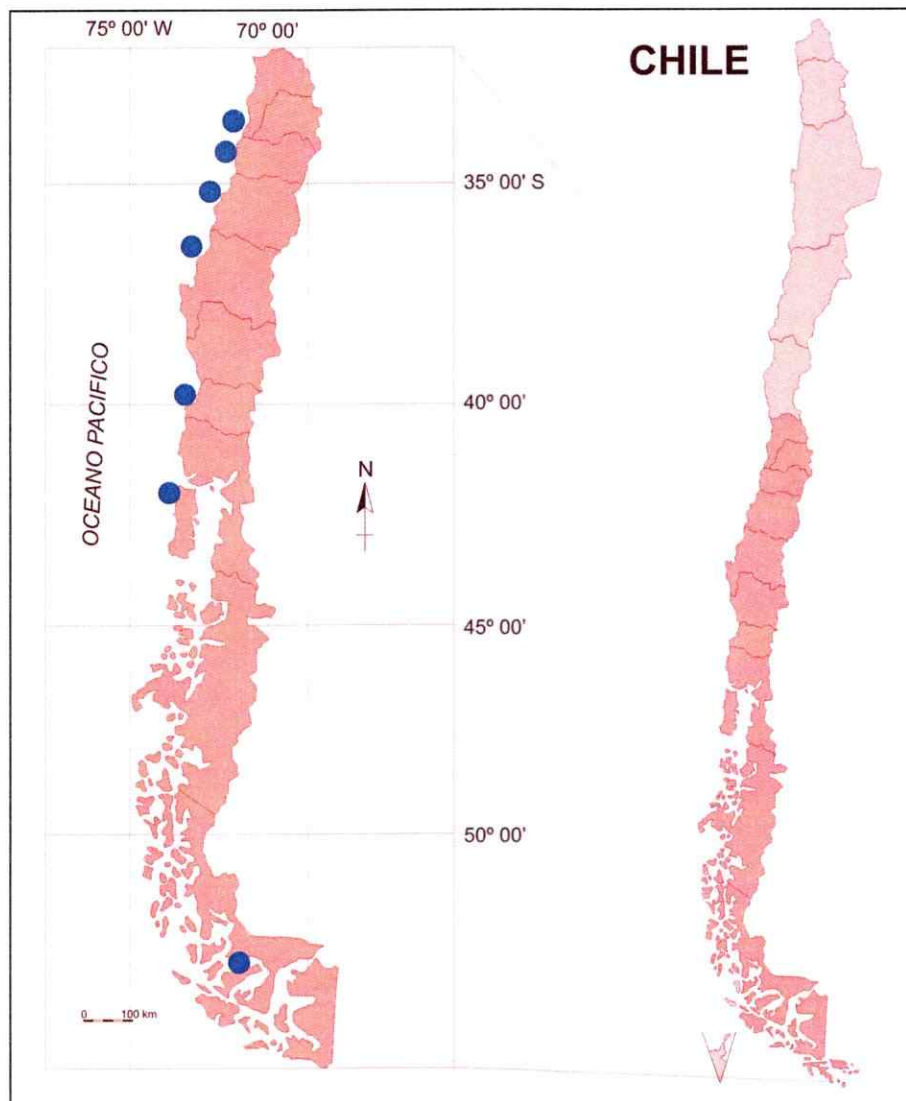


Figura 4. Localidades de procedencia de cráneos de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución. En orden latitudinal las localidades corresponden a San Antonio, Matanza, Constitución, Golfo de Arauco, Bahía de Corral, Chiloé y Punta Arenas.

Para el análisis de la información, las medidas fueron estandarizadas por la Longitud Códilo basal (LCB, Luna *et al.* 2012) y en el caso de medidas realizadas bilateralmente, se consideraron los valores del costado izquierdo (Bell *et al.* 2002, Luna *et al.* 2012). Dada la ausencia de información relacionada con la identificación sexual en la mayoría de los ejemplares, la ausencia de dimorfismo sexual a nivel craneal reportada para *C. hectori* (Baker *et al.* 2002) y la falta de evidencia para *C. eutropia*, no se realizó un análisis diferencial entre los ejemplares de este estudio. Sin embargo, se priorizaron medidas que no presenten dimorfismo sexual en otras especies (basado en Barreto 2000).

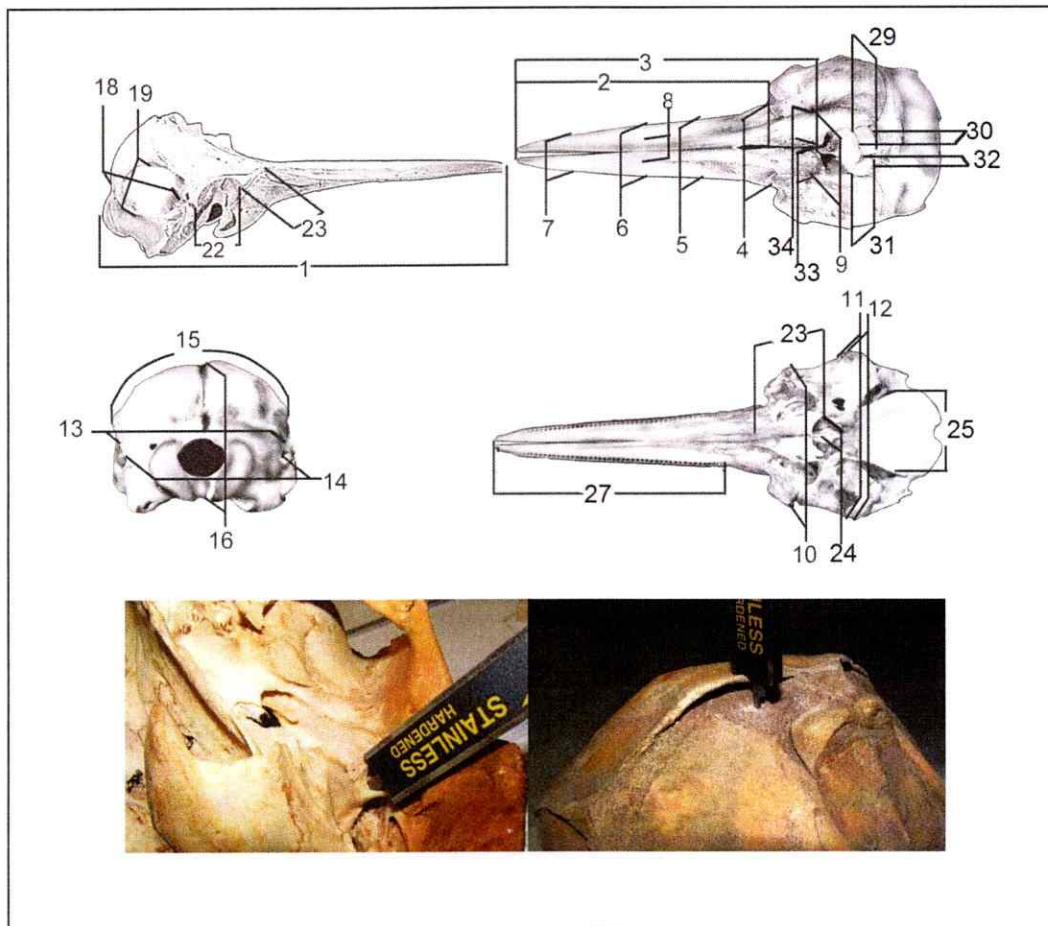


Figura 5. Ejemplos de medidas craneales a realizadas en *Cephalorhynchus eutropia* (superior, modificado de Bell *et al.* 2002) y las medidas identificadas durante el desarrollo del presente estudio VF (inferior izquierda) y SOCH (inferior derecha).

Tabla 2. Lista de medidas craneales realizadas en *C.eutropia*. (Modificadas de Perrin 1975, (Ramos *et al.* 2002, Bell *et al.* 2002, Molina 2006, Simon Gutstein 2009, Mead y Fordyce 2009).

	MEDIDA	CODIGO		MEDIDA	CODIGO
1	Longitud cóndilo-basal	CBL	25	Ancho máximo basioccipital	BOW
2	Longitud del rostro	RL	26	Longitud maxila- rostro	LMR
3	Dist del rostro – narina externa	ExN-RT	27	Longitud fila dental maxila	LFD
4	Ancho de la base del rostro	RWB	28	Distancia del nasal a la izquierda	NasL
5	Ancho del rostro a 60 mm anterior	RW60	29	Longitud nasal derecho	RnasL
6	Ancho del rostro medio	RWM	30	Ancho nasal derecho	RnasW
7	Ancho del rostro 3/4	RW3/4	31	Longitud nasal izquierdo	LnasL
8	Ancho Premaxilar medio	PMWM	32	Ancho nasal izquierdo	LnasW
9	Ancho máximo Premaxilar	GPMW	33	Ancho máximo premaxilar izquierdo	PMWL
10	Ancho máximo Preorbital	PreOrbW	34	Ancho máximo premaxilar derecho	PMWR
11	Ancho máximo Postorbital	PosOrbW	35	Distancia rostro Pterigoideos hamuli	RP
12	Ancho cigomático	ZW	36	Longitud caja craneana	LNC
13	Ancho máximo parietal	PW	37	Distancia entre cóndilos occipitales	DCO
14	Ancho mínimo de bordes parietales	BCW	38	Distancia maxilar a cresta occipital	MCO
15	Perímetro superior caja craneana	TopPer	39	Ancho máximo narina externa	ENW
16	Mayor altura vert de caja craneana	VCH	40	Ancho máximo proc supraorbital	PSOMW
17	Longitud interna caja craneana	ICL	41	Altura rostro (palatino-maxila)	RH
18	Máxima longitud fosa temporal	PTFL	42	Altura cresta supraoccipital	SOCH
19	Altura máxima fosa temporal	PTFH	43	Distancia foramen premaxilaes	PMFD
20	Longitud orbital	AOL	44	Inserción melón	MI
21	Long proceso anteorbital (lacrima)	AL	45	Prof fosa PM der al inicio de rostro	PMFH
22	Ancho mayor cresta supraoccipital	SOC	46	Dist foramen PM a base rostro	FPMRB
23	Longitud máxima de Pterigoideos	PTL	47	Dist foramen PM a narinas externas	FPMEN
24	Ancho máximo narinas internas	inNW	48	Prof fosas ventral(anexa-canal óptico)	VF

## **Análisis estadísticos**

La identificación del subset de variables que contribuyen en mayor medida a la variación geográfica se realizó mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) en el programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. 2004), identificando aquellos Componentes que junto con explicar un porcentaje de la variabilidad de los datos, dieron cuenta de variación geográfica en base a segregación de los ejemplares (casos) en el plano factorial. Posteriormente, en base a la identificación de las medidas craneométricas que más contribuyeron a estos Componentes, se evaluó la variación geográfica entre localidades mediante Análisis Multivariado de Varianza en el programa Past (Hammer *et al* 2001, Ramos 2002, Molina-Schiller 2006, Luna *et al.* 2012). De acuerdo a los resultados obtenidos se reagruparon las localidades en base a similitudes y la diferenciación entre las nuevas agrupaciones se evaluó mediante Análisis Discriminante (Ramos *et al.* 2002). El estudio de variación geográfica mediante Análisis Multivariado de Varianza y Análisis Discriminante se realizó para el set de datos considerando A) Solo adultos y B) Adultos y Juveniles.

Mediante el test univariado no paramétrico (Mann-Whitney) se evaluó la diferenciación morfométrica de las medidas realizadas entre los principales grupos encontrados. Adicionalmente se analizó la relación entre las medidas craneométricas y variables ambientales como Temperatura, Salinidad y Oxígeno Disuelto, de acuerdo a lo sugerido por Hastie (2005) y Molina-Schiller (2006) además de la Latitud, que ha sido utilizada como proxy de variables climáticas (Ashton *et al.* 2000; Blois *et al.* 2008). La data ambiental fue extraída de World Ocean Atlas 2005: web: [http://www.nodc.noaa.gov/OC5/WOA05/pr\\_woa05.html](http://www.nodc.noaa.gov/OC5/WOA05/pr_woa05.html), que cuenta con registros para cada 0,5° de latitud.

### **Isótopos estables-variación geográfica**

Finalmente, con el objetivo de tener una aproximación referente a la potencial superposición geográfica en la dieta de los ejemplares que contribuyera al estudio de variación morfológica, se realizó un análisis exploratorio de isótopos estables ( $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$ ) a ejemplares provenientes de distintas localidades en un eje latitudinal. Puesto que los consumidores que se alimentan en ambientes específicos adquieren la composición isotópica de las presas y ambientes locales, lo anterior permitiría tener una aproximación del grado de desplazamiento de los animales. Para esto se realizó extracción de colágeno de hueso (Tuross *et al.* 1988, Sabat & Martínez del Río 2002) de 9 ejemplares provenientes de las localidades de San Antonio (3), Constitución (1), Golfo de Arauco (1), Llico (1) y Punta Arenas (3). Posteriormente, las muestras fueron enviadas al Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming, USA, donde fueron analizadas con un espectrómetro de masa para isótopos estables de flujo continuo.

## RESULTADOS

Luego de la revisión completa de los 26 ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia*, 15 fueron identificados como adultos y 11 como juveniles. Del total de medidas craneométricas realizadas (48), 31 fueron seleccionadas para futuros análisis dado el estado de conservación de los cráneos, y la selección de la medida correspondiente del costado izquierdo.

### **Identificación variables craneométricas que contribuyen a variación geográfica**

Los 4 primeros componentes dan cuenta del 65% de la varianza de los datos (Tabla 3). Doce medidas craneométricas aportan significativamente al Componente 1, que explica el 29% de variabilidad de los datos. Estas medidas corresponden al ancho de la base del rostro (RBW), ancho del rostro a 60mm (RW60), ancho medio del premaxilar (PMWM), ancho máximo preorbital (PreOrbW), ancho máximo postorbital (PosOrbW), ancho cigomático (ZW), ancho máximo narinas internas (INNW), ancho máximo basioccipital (BOW), ancho máximo premaxilar izquierdo (PMWI), ancho máximo narina externa (ENW), distancia entre foramen premaxilares (PMFD) y distancia foramen premaxilar hacia narinas externas (FPMEN). La dispersión de los individuos en el plano factorial definido por los dos primeros Componentes (Figura 6) si bien, no da cuenta de una segregación por localidad, muestra una tendencia de ordenación por localidad.

Al explorar la dispersión de los individuos en el plano factorial en función de los otros Componentes, se aprecia que es el Componente 4 el que da cuenta de una segregación, separando los individuos correspondientes a la localidad de Punta Arenas (extremo Sur) del resto de los ejemplares (Figura 7). Las medidas craneométricas que más contribuyen a este Componente son: distancia del rostro a narina externa (EXNRT), ancho máximo premaxilar (GPMW), mayor altura de la caja craneana (VCH), altura máxima de la fosa temporal (TFHI), longitud orbital (OLI), fosa anexa al canal óptico (VF), ancho máximo parietal (PW) y altura de la cresta supraoccipital (SOCH).



Tabla 3. Contribución de las 31 variables craneométricas a los 4 Primeros Componentes Principales que explican el 65% de la varianza de los datos.

Variables	CP1	CP2	CP3	CP4
RL	0,040853	0,792591	-0,161241	0,376789
EXNRT	-0,262228	0,659312	-0,402299	0,444299
RWB	-0,692777	0,216582	0,186231	0,306974
RW60	-0,593612	0,211289	0,627883	0,090949
RWM	-0,418274	0,134510	0,657261	-0,070776
PMWM	-0,821618	0,191864	-0,221808	0,038408
RW34	-0,301937	-0,518100	0,214612	-0,412623
GPMW	-0,587432	0,106423	-0,111079	-0,621067
PreOrbW	-0,724266	0,243854	0,297840	-0,000429
PosOrbW	-0,804909	-0,335234	0,260765	0,061737
ZW	-0,707815	-0,259403	0,191870	0,221700
PW	-0,214847	-0,661379	-0,228503	0,401514
MPW	-0,351629	-0,781544	-0,138448	0,092011
VCH	-0,452787	-0,227816	0,390690	0,550543
TFLI	0,314295	-0,448148	-0,272885	-0,049295
TFHI	0,290803	0,155918	-0,307265	-0,549536
OLI	-0,442980	0,236447	-0,075293	-0,519307
SOC	-0,358748	-0,680257	-0,255305	0,443524
PTLI	0,026884	0,534445	0,122893	-0,027403
INNW	-0,634162	0,071681	0,010794	-0,317080
BOW	-0,594929	-0,094797	0,383592	0,216142
PMWI	-0,793721	0,117040	-0,415279	-0,055453
RP	-0,393415	0,560736	-0,621731	0,230618
MCOI	0,006347	-0,415469	-0,643702	0,303536
ENW	-0,646321	0,060032	-0,347415	-0,056223
SOCH	0,060990	0,267159	0,396570	0,402832
PMFD	-0,558550	0,187402	-0,410169	-0,356782
PMFHI	-0,276067	-0,297885	-0,677244	-0,185008
FPMRB	0,242016	-0,301784	0,504502	-0,333694
FPMEN	-0,685083	-0,117554	-0,178859	-0,154790
VF	-0,286063	-0,082345	0,216858	-0,682914

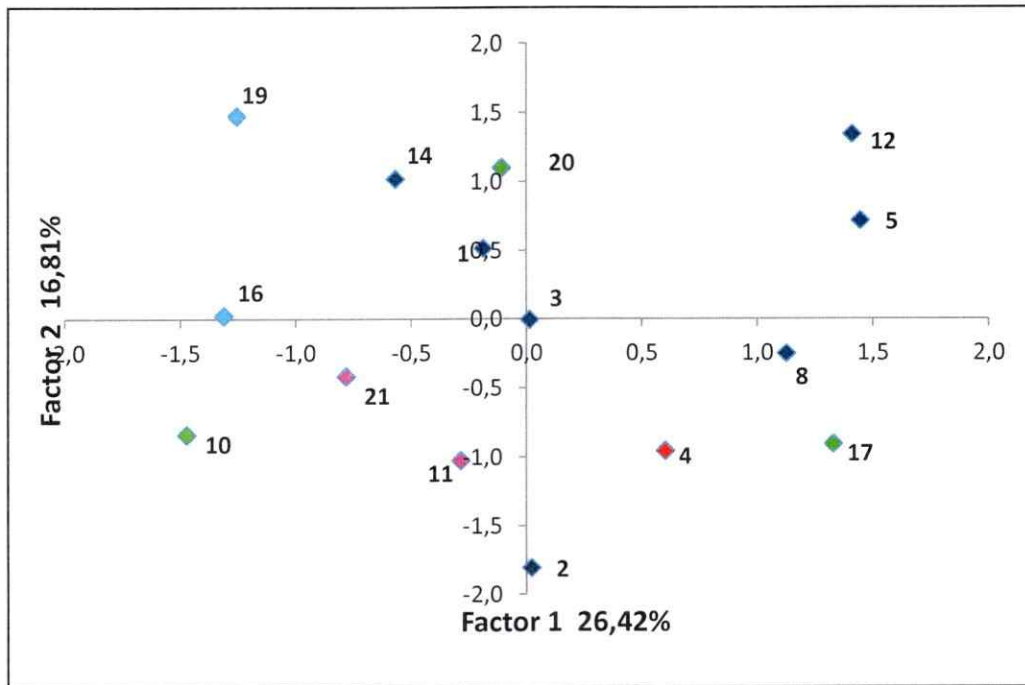


Figura 6. Plano Factorial de los Componentes Principales 1 y 2 obtenidos al analizar 31 medidas craneométricas de individuos adultos de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución. Los colores representan individuos provenientes de distintas localidades siendo: Rojo: San Antonio, Calipso: Constitución, Azul: Golfo de Arauco; Morado: Corral-Valdivia; Verde claro: Chiloé y Verde oscuro: Punta Arenas.

Al evaluar si existe diferenciación entre los grupos distribuidos latitudinalmente en base a las medidas morfológicas identificadas como importantes del Componente 4 (EXNRT, GPMW, PW, OLI, SOCH, VF), los resultados de MANOVA/CVA indican que hay diferencias significativas entre grupos en ejemplares adultos (Lambda Wilks 0,07;  $F_{3,11} = 45,34$   $p < 0,0001$ ), encontrándose diferencias significativas entre el Grupo de la Zona Sur (Chiloé-Punta Arenas) y el Grupo de latitudes intermedias (Golfo de Arauco; Figura 8 superior; Hotelling's Sequential Bonferroni: Grupo ZS v/s Grupo LI  $P = 0,001$ ). Considerando ejemplares juveniles y adultos (Figura 8 inferior) los resultados también indican diferencias significativas entre grupos (Lambda Wilks 0,2153;  $F_{19,14} = 45,34$   $p < 0,0001$ ), diferenciando el Grupo de la Zona Sur (Chiloé-Punta Arenas) del Grupo de latitudes intermedias (Golfo Arauco, Hotelling's Sequential Bonferroni: Grupo ZS v/s Grupo LI  $P = 0,001$ )

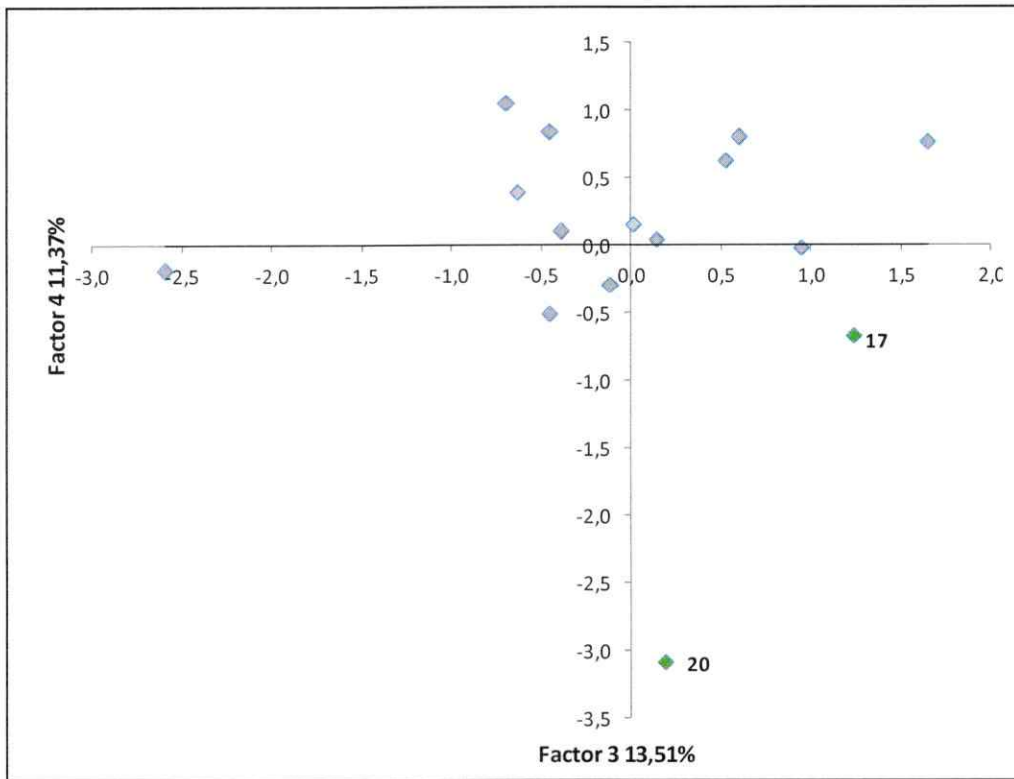


Figura 7. Plano Factorial de los Componentes Principales 3 y 4 obtenidos al analizar 31 medidas craneométricas de individuos adultos de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución. El color verde representa individuos provenientes de la localidad ubicada al extremo sur (Punta Arenas) y el color gris a los ejemplares provenientes de las otras localidades.

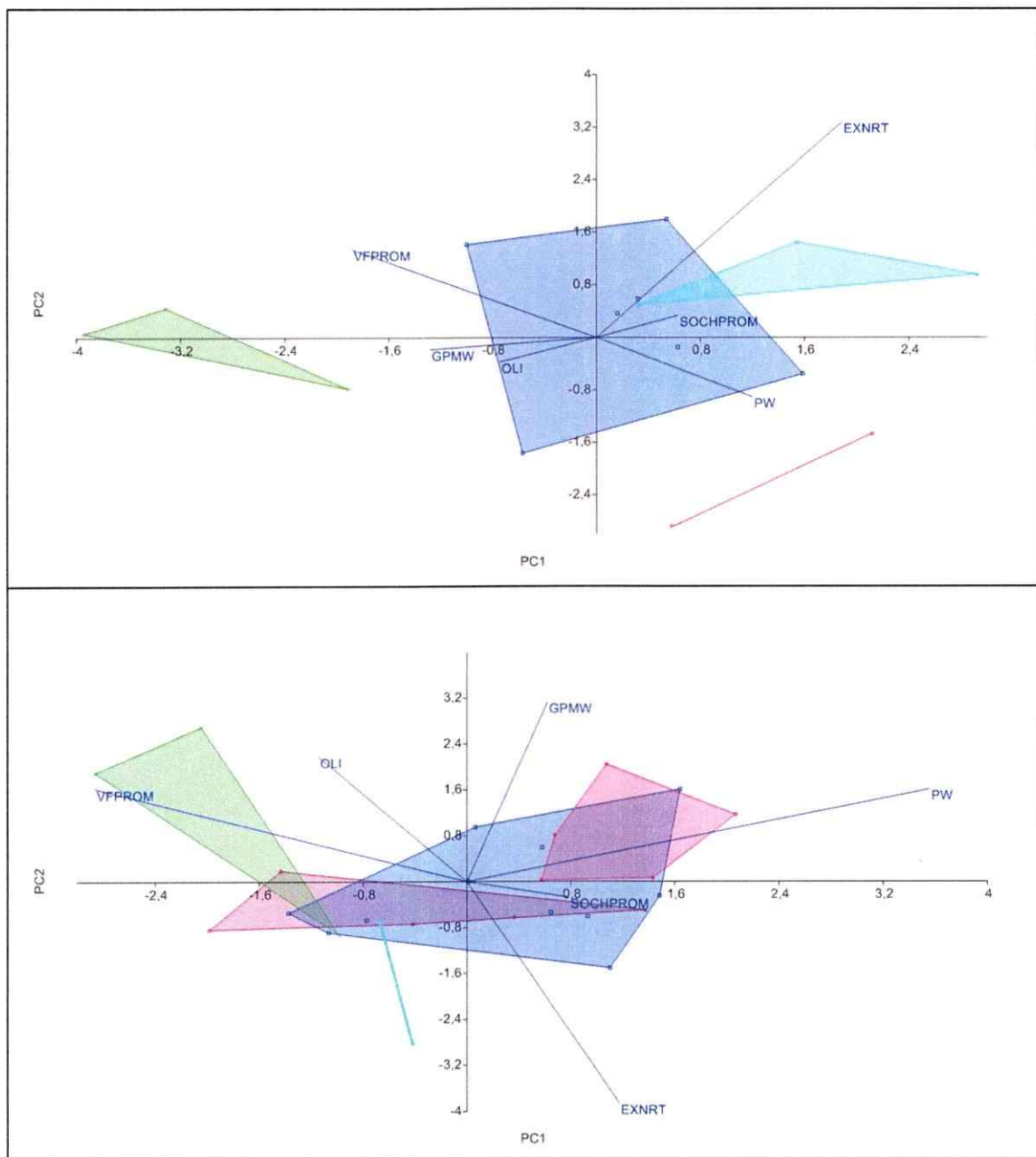


Figura 8. Plano Factorial (MANOVA /CVA) de los Componentes Principales 1 y 2 obtenidas al analizar las medidas craneométricas EXNRT, GPMW, PW, OLI, SOCH, VF para ejemplares **adultos** (superior) y **juveniles y adultos** (inferior) de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución. Los colores ilustran las agrupaciones por localidades: Calipso (Zona Extremo Norte: San Antonio-Constitución); Azul (Latitudes intermedias 1: Golfo de Arauco); Morado (Latitudes intermedias 2: Valdivia-Corral) y Verde (Zona Sur: Chiloé-Punta Arenas).

### Análisis Discriminante

Luego, al realizar análisis discriminante entre los individuos adultos reagrupados (Zona Norte v/s Zona Sur) considerando los primeros 2 Componentes Principales, se obtiene que efectivamente existen diferencias significativas entre los grupos de la Zona Norte y Zona Sur (Lamda Wilks: 0,428;  $F_{2,12} = 7,997$   $p < 0,01$ ; Hotelling: 18,257;  $F = 18,257$ ;  $p < 0,0001$ ), estableciéndose dos grupos claramente diferenciados (Figura 9) con un porcentaje de correcta clasificación del 93,33%. La función lineal discriminante (FLD) obtenida es:

$$FLD = 136,6 * CP1 + 142,5 * CP2$$

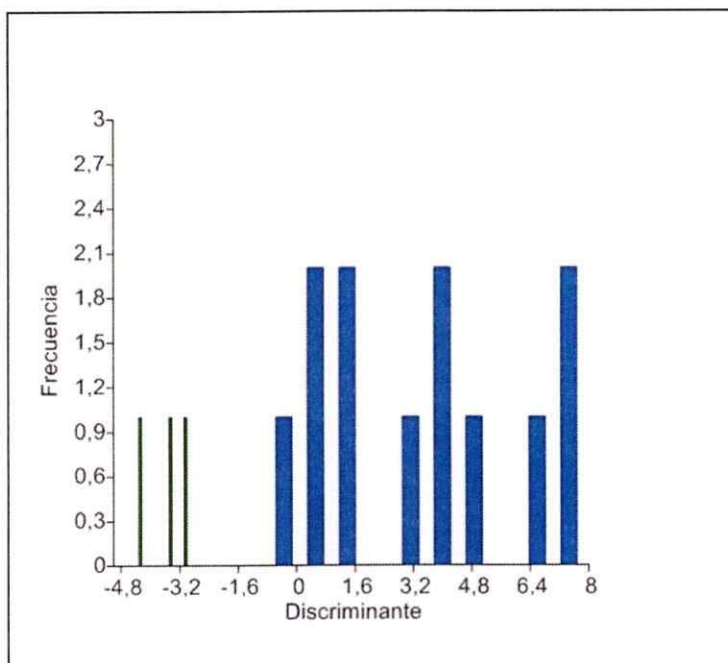


Figura 9. Análisis Discriminante sobre los Componentes Principales 1 y 2 para los grupos Norte y Sur de **ejemplares adultos** de *Cephalorhynchus eutropia*.

Al realizar análisis discriminante entre los individuos adultos considerando las medidas identificadas SOCH, VF, EXNRT, PW y GPMW entre los individuos reagrupados (Zona Norte v/s Zona Sur) se obtiene que efectivamente existen diferencias significativas (Lamda Wilks: 0,28;

$F_{1,13} = 33,08$ ;  $p < 0,00001$ ; Hotelling:  $33,892$ ;  $F = 4,692$   $p < 0,00001$ ), estableciéndose dos grupos claramente diferenciados (Figura 10) con un porcentaje de correcta clasificación del 100%. La función lineal discriminante (FLD) obtenida es:

$$FLD = 152,89 * SOCH - 205,3 * VF + 158,89 * EXNRT + 238,77 * PW - 37,66 * GPMW.$$

Y considerando los individuos adultos y juveniles reagrupados (Zona Norte v/s Zona Sur) también se obtienen dos grupos diferenciados, con un porcentaje de correcta clasificación del 88,46 % (Figura 11;  $\Lambda$  Wilks:  $0,4984$ ;  $F_{1,24} = 4,025$ ;  $p < 0,01$ ; Hotelling:  $23,6$ ;  $F = 3,93$   $p < 0,00001$  y la función lineal discriminante (FLD) obtenida es:

$$FLD = 75,632 EXNRT + 94,255 PW - 211,36 VF + 69,884 SOCH + 13,123 GPMW$$

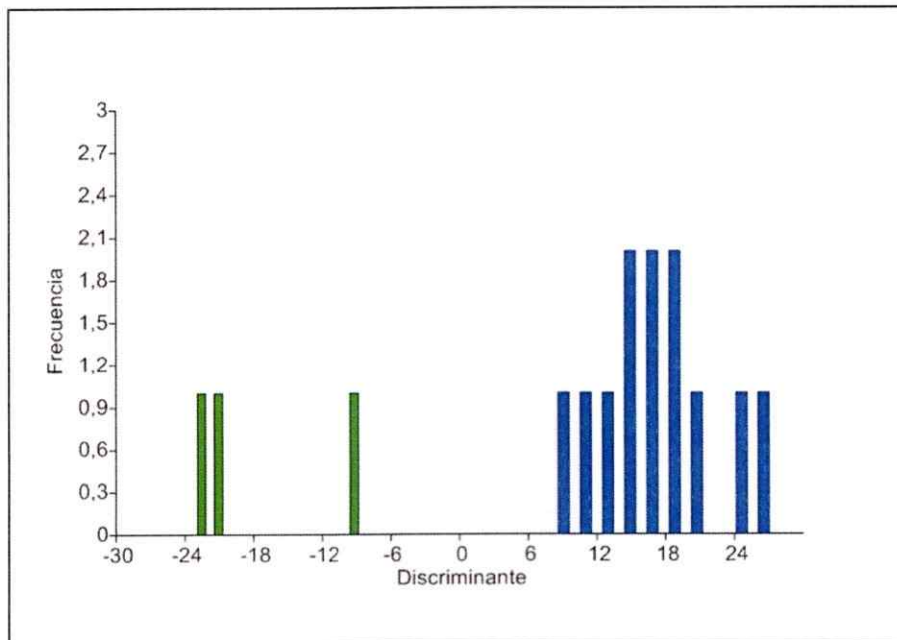


Figura 10. Análisis discriminante para las medidas craneométricas VF, SOCH, EXNRT, PW y GPMW realizadas para individuos **adultos** de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución. El color azul representa individuos de la Zona Norte (San Antonio- Corral) y el color verde, individuos de la Zona Sur (Chiloé-Punta Arenas).



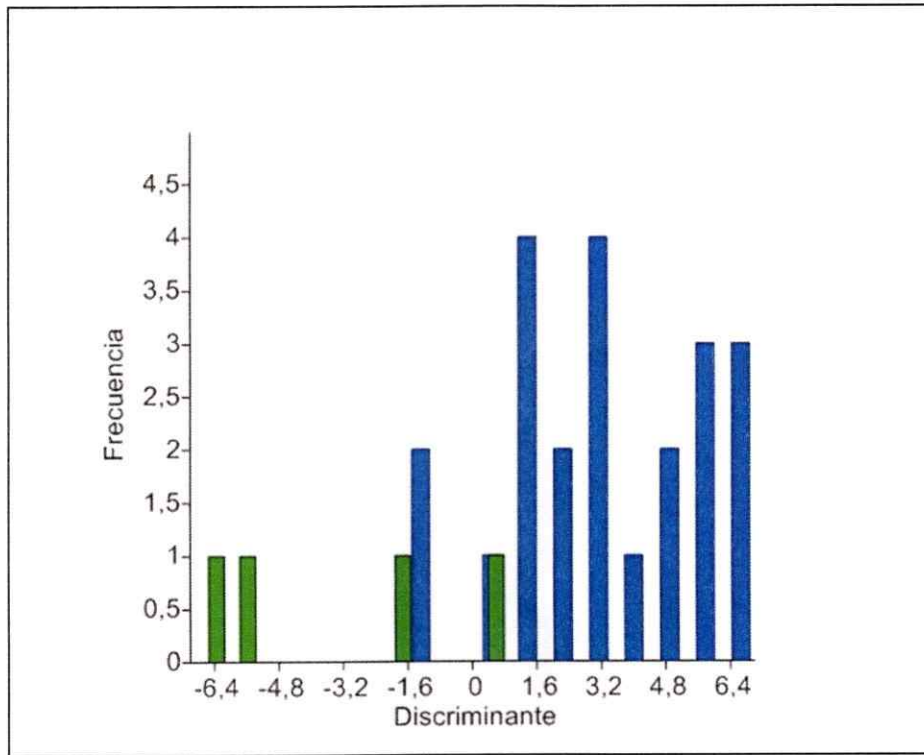


Figura 11. Análisis discriminante para las medidas craneométricas VF SOCH, EXNRT, PW y GPMW realizadas para individuos **juveniles y adultos** de *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución. El color azul representa individuos de la Zona Norte (San Antonio- Corral) y el color verde, individuos de la Zona Sur (Chiloé-Punta Arenas).

*Medidas craneométricas identificadas como importantes en variación geográfica:*

**1. Cresta Supraoccipital (SOCH)** (ver descripción Anexo 1)

En el presente estudio, al comparar los valores obtenidos para SOCH en ejemplares adultos y juveniles entre los grupos Norte y Sur, esta medida presentó un mayor valor en los ejemplares provenientes del grupo Norte, aunque no presentó diferencias significativas ( $U=1,73$   $p= 0,08$  y  $U=1,49$   $p=0,14$  respectivamente; Tabla 4, Figura 12)

Tabla 4. Ejemplo de medidas obtenidas para la Cresta Supraoccipital (SOCH) de ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia* provenientes de San Antonio, Constitución y Punta Arenas

LOCALIDAD	CODIGO EJEMPLAR	SOCH izq	SOCH der
San Antonio	CEU1003MNHN	9,3	13,65
Constitución	CEUCONSSJ	7,7	5,9
Punta Arenas	CEUCZIP0529	3	6



Figura 12. Ejemplo de alturas de la Cresta Supraoccipital (SOCH) de ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia* provenientes de San Antonio (izquierda), Constitución (centro) y Punta Arenas (derecha).



## 2. Ancho Máximo Premaxilar (GPMW): (ver descripción Anexo 1)

No se encontraron diferencias significativas en GPMW (Figura 13) al comparar ejemplares adultos y adultos y juveniles entre los grupos Norte y Sur Norte y Zona Sur ( $U = -0,72$   $p = 0,47$  y  $U = 0,355$   $p = 0,72$  respectivamente)

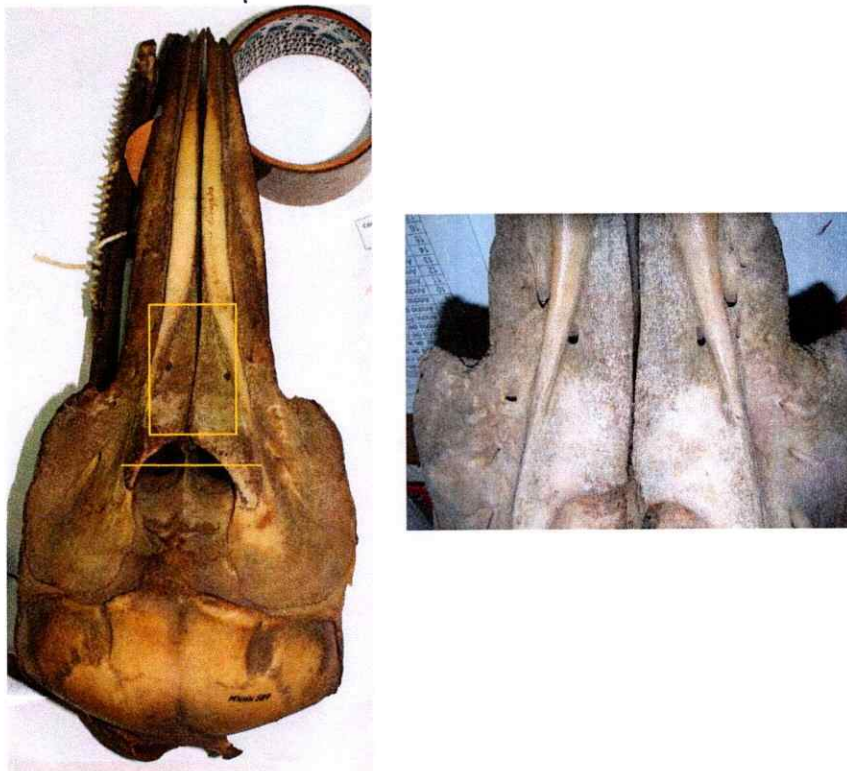


Figura 13. Ejemplo de medida Ancho Máximo Premaxilar (GPMW), forámenes y fosas premaxilares presentes en ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia*.

### 3. Ancho máximo Parietal (PW): (ver descripción Anexo 1)

En el presente estudio se encontraron diferencias significativas de PW (Figura 14) al comparar los grupos de ejemplares juveniles y adultos provenientes de la Zona Norte y Zona Sur ( $U=2,32$ ;  $p= 0,02$ ), obteniéndose mayores valores para ejemplares provenientes del Norte. Al comparar ejemplares solamente adultos de ambos grupos, si bien los valores son mayores en el Norte, no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ( $U= 1,69$   $p= 0,09$ )

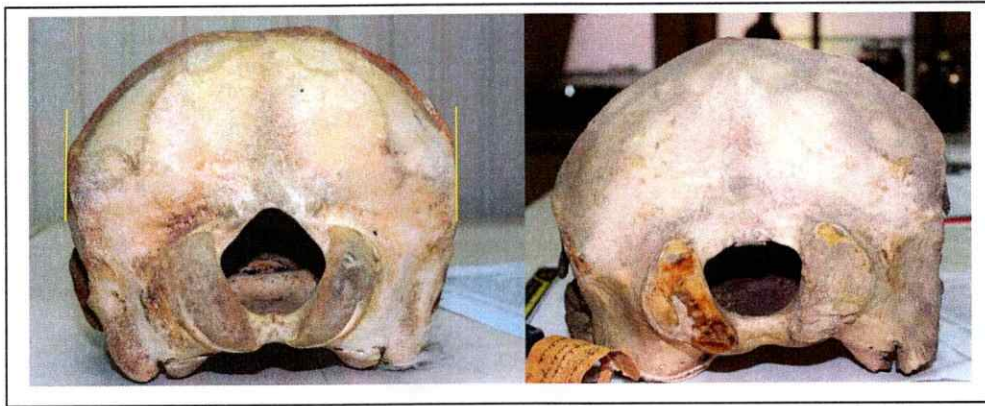


Figura 14. Ejemplo de medida Ancho Máximo Parietal (PW) realizada en ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia*.

### 4. Altura de la fosa temporal (TFH) y Longitud Orbital (LO): (descripción Anexo 1)

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos para TFH y LO (Figura 15) entre los grupos de individuos provenientes de la Zona Norte y Zona Sur tanto para ejemplares adultos como adultos y juveniles, aunque los valores de LO para los individuos de la Zona Sur fueron superiores.

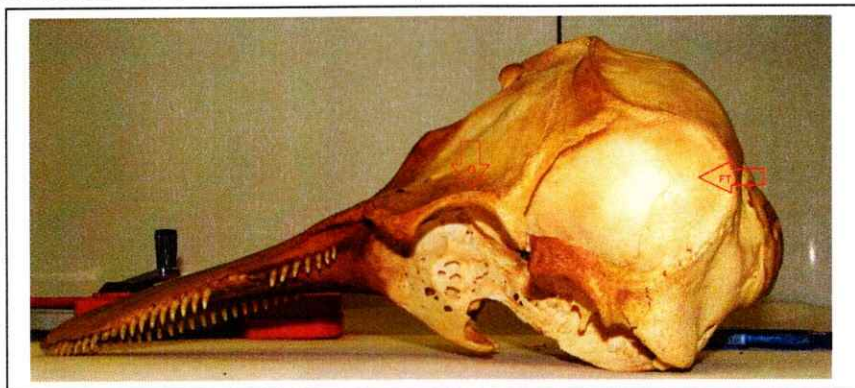


Figura 15. Fosa temporal (FT) y órbita ocular (O) de un ejemplar de *Cephalorhynchus eutropia*.

**Distancia del rostro a narina externa (EXN-RT)** (ver descripción Anexo 1)

Los valores de EXN-RT (Figura 5) obtenidos en el presente estudio para los delfines adultos provenientes de la Zona Norte y Sur presentaron diferencias significativas ( $U= 2,02$   $p= 0,04$ ), siendo mayores los valores obtenidos para la Zona Norte. En el caso de ejemplares adultos y juveniles, los ejemplares provenientes de la Zona Norte presentaron mayores valores para esta medida aunque no presentaron diferencias significativas en la comparación Norte v/s Sur ( $U=1,7$ ;  $p= 0,08$ ).

**Fosa anexa al canal óptico (VF):** (ver descripción Anexo 1)

VF correspondió a una de las medidas identificadas durante el desarrollo del presente estudio. Dado el hallazgo de esta nueva cavidad, el registro se realizó de manera cualitativa y cuantitativa (Figura 16), registrando profundidad y descripción de la fosa en ambos costados del cráneo del ejemplar. La Fosa anexa al canal óptico (VF) presentó diferencias significativas entre los grupos Norte y Sur al comparar tanto ejemplares adultos como adultos y juveniles ( $U= -2,19$ ,  $p= 0,027$  y  $U=-2,46$ ,  $p= 0,01$  respectivamente) presentando los ejemplares provenientes de la Zona Sur, valores significativamente superiores a los provenientes de la Zona Norte, sobre todo en aquellos ejemplares pertenecientes a la localidad de Punta Arenas (Tabla 5, Figura 16)

Tabla 5. Ejemplo de medidas obtenidas para la Fosa anexa al canal óptico (VF) de ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia* provenientes de San Antonio, Constitución y Punta Arenas.

LOCALIDAD	CODIGO EJEMPLAR	VF izq	VF der	Comentarios
San Antonio	Ceu4MSA	1	0	FV izq muy pequeña. Der ausente
Constitución	Ceu98CH	6	2,5	FV amplias pero poco desarrolladas
Punta Arenas	CeuCZIP1002	14	16	FV muy desarrolladas



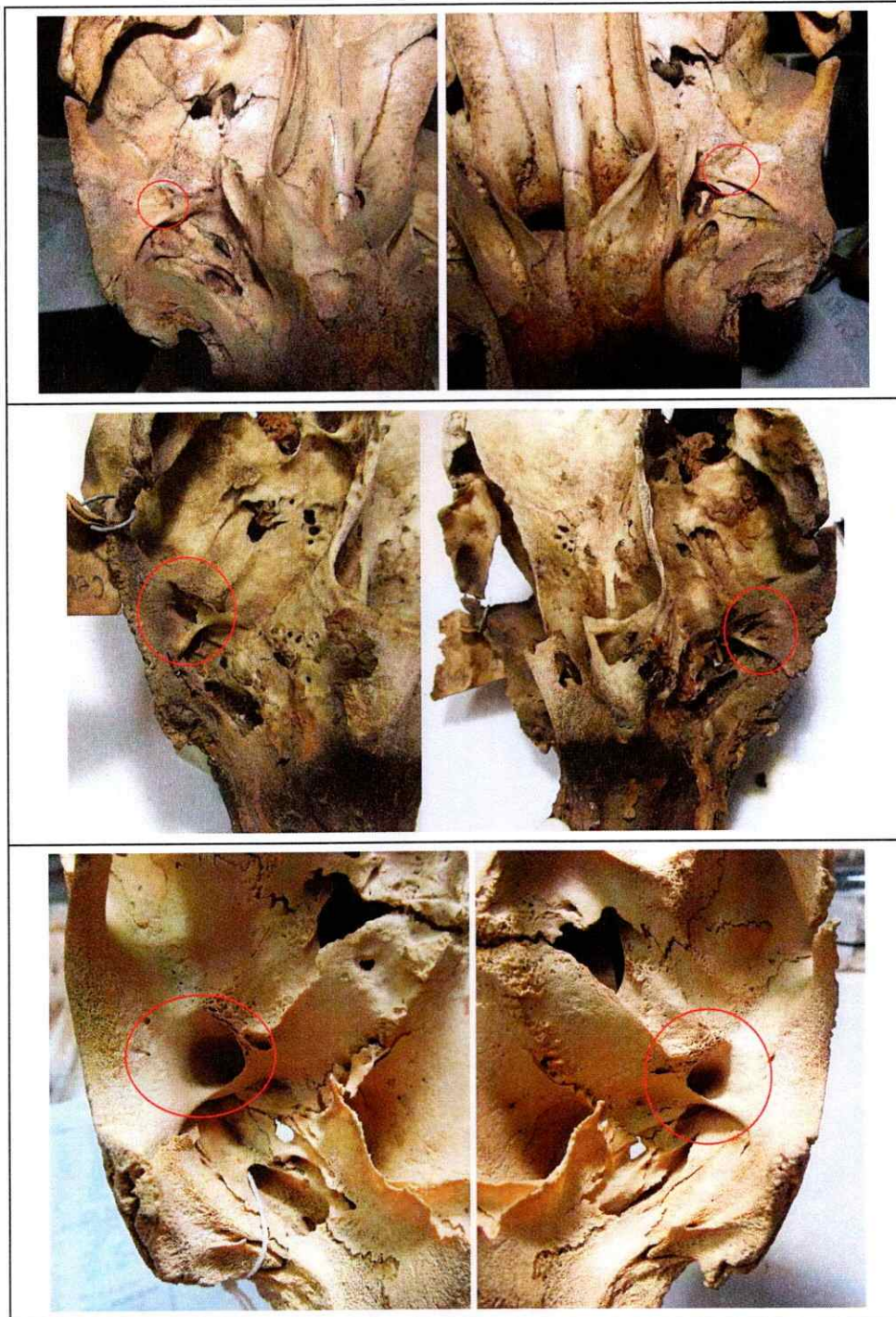


Figura 16. Ejemplo Fosas anexas al canal óptico (VF) de ejemplares de *Cephalorhynchus eutropia* provenientes de San Antonio (superior), Constitución (medio) y Punta Arenas (inferior).

### **Asociación medidas craneométricas y variables ambientales**

Al explorar si existe asociación entre las medidas craneométricas realizadas y las variables ambientales y geográficas (Temperatura, Salinidad superficial, Oxígeno y Latitud), se obtiene que para ejemplares adultos, las medida EXNRT se correlaciona negativamente con la Latitud ( $r = -0,58$   $p < 0,05$ ) y con el Oxígeno ( $r = -0,56$   $p < 0,05$ ) y positivamente con la Temperatura ( $r = 0,53$   $p < 0,05$ ) y la Salinidad ( $r = 0,56$   $p < 0,05$ ). La medida RL se correlaciona negativamente con la Latitud ( $-0,53$   $p < 0,05$ ) y con el Oxígeno ( $-0,55$   $p < 0,05$ ) y positivamente con la Salinidad ( $r = 0,53$   $p < 0,05$ ) es decir, para estas dos medidas se observa una disminución hacia el Sur. En cambio, la medida VF se correlaciona positivamente con la Latitud ( $r = 0,70$   $p < 0,05$ ) y negativamente con la Salinidad y la Temperatura ( $r = -0,68$  y  $r = -0,77$   $p < 0,05$ ) mostrando así, un aumento hacia el Sur.

En el caso de ejemplares adultos y juveniles se obtienen que las medidas INNW, PW y VF se asocian significativamente con variables ambientales. Así, INNW se correlaciona positivamente con la Latitud y con el Oxígeno ( $r = 0,47$  y  $r = 0,40$   $p < 0,05$ ), y negativamente con la temperatura y con la Salinidad ( $r = -0,45$  y  $r = -0,48$   $p < 0,05$ ); de igual manera, VF se correlaciona positivamente con la Latitud y negativamente con la Temperatura y Salinidad ( $r = 0,69$ ;  $r = -0,74$  y  $r = -0,66$   $p < 0,05$ ), presentando estas medidas mayores valores hacia el Sur. PW en cambio, se correlaciona negativamente con la Latitud y positivamente con la Temperatura y la Salinidad ( $r = -0,44$ ;  $r = 0,44$ ;  $r = 0,46$   $p < 0,05$ ) mostrando una disminución hacia el Sur.

### Isotopos estables-variación geográfica

Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de los 9 ejemplares de *C.eutropia* analizados se muestran en la Tabla 6, Figura 17, ilustrados con distintos colores por localidad. Al evaluar si hay diferencia significativa entre los valores isotópicos por localidad, se obtiene que para  $\delta^{13}\text{C}$ , las muestras provenientes de la localidad de San Antonio (latitudes extremo Norte) difieren significativamente de las provenientes de Constitución-Concepción (latitudes intermedias;  $U=-1,96$   $p=0,04$ ), siendo mayores los valores obtenidos para latitudes intermedias. Y para  $\delta^{15}\text{N}$  las muestras provenientes de la localidad de San Antonio (latitud extremo Norte) difieren significativamente de las provenientes del la localidad de Punta Arenas (latitud Extremo Sur;  $U= 1,96$   $p=0,04$ ), siendo mayores los valores registrados para la localidad de San Antonio.

A lo largo del eje latitudinal, se encontró una asociación negativa significativa entre  $\delta^{15}\text{N}$  y la Latitud ( $r=-0,73$   $p<0,05$ ), es decir los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  se empobrecen hacia el Sur. No se encontró asociación significativa entre  $\delta^{13}\text{C}$  y la latitud.

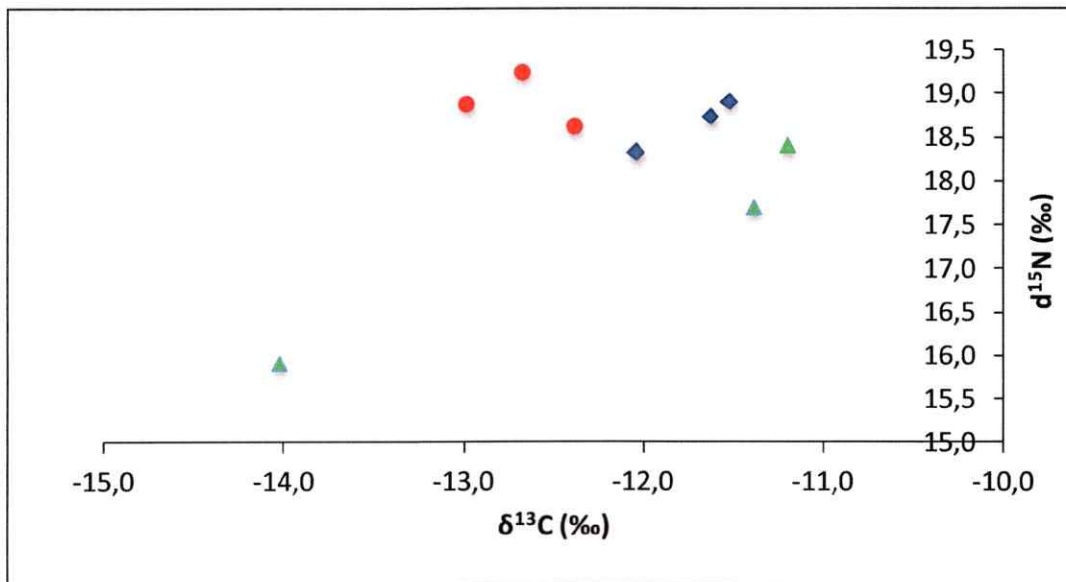


Figura 17. Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de para muestras de hueso de *Cephalorhynchus eutropia* provenientes de Latitudes Norte (San Antonio, color rojo) Latitudes Intermedias (Constitución, Concepción; color azul) y Latitudes Sur (Punta Arenas; color verde).

Tabla 6. Valores promedio de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  ( $\pm\text{DE}$ ) para las muestras hueso de *Cephalorhynchus eutropia* en Latitudes Norte (San Antonio), Latitudes Intermedias (Constitución, Concepción) y Latitudes Sur (Punta Arenas).

ZONA	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Latitudes Norte	$-12,7 \pm 0,29$	$18,92 \pm 0,32$
Latitudes Intermedias	$-11,7 \pm 0,28$	$18,66 \pm 0,31$
Latitudes Sur	$-12,2 \pm 1,58$	$17,35 \pm 1,27$

## DISCUSIÓN

El presente estudio da cuenta de la variación geográfica a nivel de morfometría craneal en *Cephalorhynchus eutropia* en un eje latitudinal. Desde el punto de vista craneométrico, se identifican principalmente dos grupos (1) Grupo Norte, compuesto por ejemplares provenientes de San Antonio a Corral-Valdivia y (2) el Grupo Sur, compuesto por ejemplares provenientes de Chiloé - Punta Arenas. Las variables craneométricas que principalmente contribuyen a esta diferenciación corresponden a VF, SOCH, EXNRT, PW y GPMW.

### *Variables craneométricas que contribuyen a variación geográfica*

En un contexto de relación estructura-función para cráneos de odontocetos, Perrin (1975) propone 5 elementos que explicarían esta asociación integrada, los que consideran: la caja craneana, la estructura de recepción del sonido y alimentación, elementos auditivos, de visión y estructuras asociadas a la respiración y producción del sonido. Fordyce (1994), en un análisis relacionado con la anatomía facial de odontocetos, menciona que las estructuras blandas dictan la forma de la contra-parte ósea, puesto que ésta se forma más tardíamente en el desarrollo. Dentro de este contexto, la cresta Supraoccipital (SOCH) es una estructura relacionada con el desarrollo de los sacos vestibulares y los sacos nasofrontales, ambos involucrados en el desplazamiento de aire, ya sea como reservorio aéreo o reflector del sonido (Mead 1975); y por su parte, el tamaño del Premaxilar (GPMW) está relacionado con el desarrollo de las fosas premaxilares y de los sacos premaxilares, estructuras que son parte del complejo nervioso infraorbital (Mead & Fordyce 2009) y están asociadas directamente con la ecolocalización puesto que otorgan soporte al melón. Dado lo anterior, es de esperar que mayores valores en estas variables se presenten en ejemplares que habitan ambientes con mayor turbidez, donde puesto que la visibilidad es menor, resulta necesario un sistema de ecolocalización más desarrollado. Lo anterior se condice con que los mayores valores registrados para estas medidas corresponden a



individuos provenientes de la Zona Norte (localidades de San Antonio-Matanza) donde está descrita la marcada preferencia de la especie por zonas estuarinas (Goodall *et al.* 1988b, Capella *et al.* 1999, Pérez-Alvarez *et al.* 2007) y por ende de menor visibilidad. En cambio, la localidad más representada en lo cráneos de la Zona Sur, es Seno Otway-Seno Skyring, en las cercanías de Punta Arenas, donde la visibilidad es mayor producto de una menor influencia glacial. En este mismo sentido, una mayor extensión del melón así como un mayor desarrollo de los sacos aéreos que rodean al melón, los cuales contribuyen a una mayor capacidad de enfoque y a la generación de un espejo acústico cóncavo, han sido identificados como caracteres presentes en delfines de río, siendo potencialmente consecuencias adaptativas a ambientes fluviales (Gutstein 2013). GMPW ha sido una variable identificada como discriminante en la separación de odontocetos de diferentes áreas geográficas en otros estudios a nivel intra-específico (Molina-Schiller *et al.* 2006).

Las medidas relacionadas con el tamaño del rostro (EXNRT) y el tamaño del parietal (PW) estarían potencialmente asociadas a tamaño, y de acuerdo con Perrin (1975), variaciones en una estructura con dependencia funcional, se inter-relaciona directamente con variaciones en otras estructuras, por lo que su análisis e interpretación es más bien de manera conjunta que independiente. Así, un mayor desarrollo de la porción lateral de la caja craneana conjuntamente con una mayor fosa temporal, estaría asociado a actividades de carácter alimentario, por un mayor desarrollo del músculo temporal y una mordida más fuerte (Perrin 1975, Perrin *et al.* 2011). De la misma manera, un rostro más marcado, mandíbulas más robustas y dientes más largos sugerirían una adaptación a alimentarse de presas de mayor tamaño (Perrin *et al.* 2011). Perrin (1975) sugiere que los elementos del rostro se verían directamente influenciados por variaciones en la dieta, y cambios en la ecología trófica de los animales implicaría modificaciones a nivel rostral más rápidas que en otras estructuras del cráneo. Un rostro más robusto sería ventajoso en individuos que se alimenten en aguas costeras sobre presas demersales, puesto que estas tienden a ser de mayor y más irregular tamaño que las presas

pelágicas. Por otro lado, un rostro de menor tamaño y más delgado se vería favorecido en ambientes pelágicos, donde las presas son más pequeñas y de movimientos rápidos. La información existente relacionada con la dieta de *C. eutropia* es escasa y proviene principalmente de análisis de contenido estomacal de individuos enmallados en redes pesqueras en estudios puntuales (Oporto 1990). Sin embargo, en las proximidades del río Maule, Región del Maule, pescadores artesanales identifican el área costera de pesca del róbalo, *Eleginops maclovinus*, como área principal de alimentación del delfín chileno, (Pérez-Alvarez *et al.* 2007), lo que podría dar un indicio de alimentación costera y de fondo al menos en ciertas localidades de la Zona Norte. Además en esta zona la sardina común (*Strangomera bentincki*) ha sido reportada como presa del delfín chileno (Oporto 1988; Goodall 1994<sup>a</sup>), siendo ésta de mayor tamaño que la sardina austral (*Spartus fueguensis*) potencial presa en la zona de los canales (Zona Sur). Lamentablemente no existe información formal relacionada con la dieta del delfín chileno para la Zona Sur, pero dada la topografía de la costa chilena, se podría pensar que una alimentación costera, en extensas playas de poca profundidad como ocurre en la Zona Norte, es poco probable.

Por su parte, las fosas anexas al canal óptico (VF) corresponden a dos cavidades ubicadas en la porción ventral del cráneo, identificadas por primera vez durante el presente estudio. Los mayores valores de esta medida fueron registrados para ejemplares provenientes de localidades ubicadas el extremo sur (Punta Arenas). Las cavidades se disponen a ambos costados del cráneo, en el área próxima al canal óptico, y aunque una interpretación funcional de esta estructura de manera independiente es compleja, potencialmente podría relacionarse con aislamiento auditivo. En este sentido, los ejemplares provenientes de mayores latitudes (Sur) también presentaron mayores valores de la Longitud orbital (LO) (aunque no se diferencia significativamente del grupo Norte), consecuente con la mayor visibilidad presente en las localidades de procedencia de estos ejemplares. Esta variación ha sido asociada a una especialización a diferentes tipos de ambientes en otros estudios (Perrin 1994, Perrin *et al.*

2011) asociándose un mayor tamaño ocular con un mayor desarrollo de la visión durante el buceo (Land & Nilson 2002).

La diferenciación de estas dos agrupaciones (Norte y Sur) en base a caracteres morfométricos craneales se ve reforzada mediante los resultados obtenidos con análisis discriminante tanto para ejemplares adultos como para ejemplares adultos y juveniles. Estas unidades poblacionales han sido paralelamente identificadas mediante análisis genéticos, donde una fuerte estructuración a nivel de marcadores moleculares (microsatélites y ADN mitocondrial) ha sido encontrada aún en ausencia de una evidente barrera geográfica, proponiéndose que la diferenciación genética podría reflejar adaptación ecológica a diferentes ambientes y uso de recursos (Capítulo 1 y 3 presente estudio). Cabe mencionar en este mismo sentido que un fuerte patrón de estructuración con diferencias a nivel genético y morfométrico ha sido reportado para el congener endémico de Nueva Zelanda, *Cephalorhynchus hectori*, entre las Islas Norte y Sur. En este caso, dos subespecies (*C. hectori maui* para la Isla del Norte y *C. hectori hectori* para la Isla del Sur) han sido reconocidas (Baker *et al.* 2002). El estudio morfológico en *C. hectori* se realizó sobre las unidades poblacionales ya diferenciadas a nivel genético y las medidas craneométricas que más contribuyeron a la diferenciación de la población de la Isla del Norte v/s la Isla del Sur se relacionan con tamaño del rostro, siendo los rostros de los ejemplares del Norte más largos y anchos que los del Sur; y con el Ancho Premaxilar, el cual también presenta mayores valores en los ejemplares del Norte. Por tanto, dos de las tres medidas anteriormente señaladas, concuerdan con las identificadas como importantes para la diferenciación Norte/Sur del delfín chileno en el presente estudio. En este contexto, y de acuerdo con Westage (2007) se plantea que dada la compleja interdependencia entre la función y anatomía del cráneo, variaciones craneales ocurrirían solo en presencia de una presión selectiva diferencial y aislamiento reproductivo.

La diferenciación de tipos de ambientes (Norte /Sur) en el caso del presente estudio, coincide con dos de las unidades biogeográficas descritas para ambientes marinos: (1) el área ubicada entre 30° S to 42° S (Zona Intermedia o Central) y (2) el área ubicada entre los 42° S to 56° S denominada Provincia Magallánica o Región de Fiordos Australes (Camus 2001 y Escribano *et al.* 2003). Estos patrones biogeográficos se relacionan con variaciones oceanográficas asociadas al origen e instalación de la actual Corriente de Deriva del Oeste (Thiel *et al.* 2007). La Zona Intermedia o Central está caracterizada por la presencia de la Corriente de Humboldt (Montecino *et al.* 2000, Thiel *et al.* 2007) siendo uno de los ecosistemas marinos más productivos a lo largo de la línea costera del Ecuador, Perú y Norte de Chile (Thiel *et al.* 2007). Esta área se caracteriza por presentar un borde costero expuesto, con presencia de desembocaduras de ríos (Strub *et al.* 1998), donde *C. eutropia* mostraría preferencia por ambientes estuarinos (Goodall *et al.* 1988b, Capella *et al.* 1999, Pérez-Alvarez *et al.* 2007). Por el contrario, la Zona de fiordos australes es una zona de canales y fiordos (Goodall *et al.* 1994), donde los delfines han sido registrados principalmente asociados a ambientes protegidos. Esta zona es una de las menos estudiadas para la especie, y la información existente proviene de estudios locales de duración reducida (Heinrich 2006, Dawson 2009). Ambas regiones se diferencian también en la caracterización de su composición íctica (Ojeda *et al.* 2000, Escribano *et al.* 2003).

#### *Aproximación dieta (isótopos estables)-variación geográfica*

Dado que la especialización trófica ha sido uno de los factores descritos que contribuyen a la variación geográfica en odontocetos, manifestándose en caracteres craneales como variación en tamaño y número de dientes, longitud y ancho de la región rostral y orbital y tamaño de la fosa temporal, entre otros (Amano & Miyazaki 1992, Perrin 2002, Perrin 2003, Molina-Schiller 2006, Amaral 2009) es necesario detenerse en este punto puesto que variaciones morfométricas relacionadas han sido identificadas durante el presente estudio. Lamentablemente la

información en cuanto a dieta del delfín chileno es escasa y no se cuenta con registros que avalen que el ítem presa de la especie en el Norte es diferente al ítem presa en el Sur. Sin embargo, los resultados del análisis de isótopos estables realizados en el presente estudio a ejemplares provenientes del Norte, Centro y Sur de la distribución de la especie, sugieren que no habría una superposición dietaria entre localidades (Figura 17), encontrándose diferencias isotópicas significativas entre localidades (para  $\delta^{13}\text{C}$  entre las localidades Norte y Centro y para  $\delta^{15}\text{N}$  entre las localidades Norte y Sur). Lo anterior, a modo general y considerando esta información con cautela dado el bajo tamaño muestral, nos arroja dos posibilidades: o bien los animales se alimentan en una misma zona de presas distintas lo que se traduciría en una señal isotópica diferente; o se alimentan en diferentes lugares. Dado el carácter generalista de los odontocetos (Berta *et al.* 2006) y que los ejemplares provienen de diferentes localidades, lo más probable es que la diferencia en señal isotópica identificada sea producto de zonas diferentes de alimentación. Lo anterior nos indicaría que los animales se alimentarían frecuentemente en la zona donde habitan, presentando desplazamientos restringidos y no grandes migraciones. Esto es consecuente con el patrón de ordenación de los individuos por localidad encontrado en el presente estudio al observar la distribución de los individuos en el plano factorial de los Componentes Principales 1 y 2 y con los resultados obtenidos a nivel molecular (ADN mitocondrial-DLoop) de carácter intra-poblacional (Población Norte v/s Población Sur, Capítulo 3). En ambos casos, no se observa una homogeneización de los datos, sino por el contrario, una tendencia a la diferenciación y estructuración a escala geográfica reducida, ilustrando rasgos de desplazamientos reducidos y conductas filopátricas de la especie, tal como ha sido descrito para las distintas especies del género *Cephalorhynchus* (Dawson *et al.* 2002).

Los resultados de isótopos estables indican que hay una asociación negativa entre  $\delta^{15}\text{N}$  y la latitud, encontrándose menores valores de  $\delta^{15}\text{N}$  hacia el sur. Variaciones latitudinales similares han sido registradas en estudios de pinípedos (Muñoz *et al.* en preparación, Auriol-Gamboa *et*

*al.* 2006 y Auriol-Gamboa *et al.* 2009), quienes encuentran que a medida que la latitud aumenta en 4°N, el valor de  $\delta^{15}\text{N}$  de la materia orgánica particulada (MOP) disminuye en 1‰. Este patrón de disminución de  $\delta^{15}\text{N}$  con la latitud podría deberse tanto a diferencias en las contribuciones de nitrógeno (nitrato de aguas profundas, nitrato proveniente de zonas de nitrificación, insumos continentales y fijación del nitrógeno), como a diferencias en su utilización (Montoya 2007; Muñoz *et al.* en preparación). Así mismo, la intensidad de los eventos de surgencia y la extensión de la desnitrificación sub-superficial contribuyen a una diferenciación espacial en valores de  $\delta^{15}\text{N}$  del fitoplancton (Graham *et al.* 2010), esperándose valores superiores de  $\delta^{15}\text{N}$  en zonas altamente productivas (Graham *et al.* 2010), como es la zona central de Chile (Montecino *et al.* 2000, Thiel *et al.* 2007). Por otra parte, la marca isotópica  $\delta^{13}\text{C}/\delta^{12}\text{C}$  permite discriminar el origen de la productividad primaria en sistemas simples, donde existen diferentes fuentes isotópicas (ej fitoplancton v/s macroalgas) (Hobson & Welch 1992 y Fredriksen 2003) y el patrón  $\delta^{15}\text{N}/\delta^{14}\text{N}$ , muestra el enriquecimiento a nivel trófico, con un aumento de 3–4‰ por nivel (Michener *et al.* 1994), pudiendo modelar la posición de un consumidor en la red trófica marina. De esta manera diferentes estudios han encontrado variación de marca isotópica a nivel intraespecífico en odontocetos, pudiendo diferenciar grupos que se alimenten de presas pelágicas de menor nivel trófico de otros que se alimentan de presas costeras con una mayor posición trófica (Fontaine *et al.* 2007). Aunque este nivel de interpretación de los resultados se escapa de los objetivos de este trabajo, lleva a plantearse nuevas interrogantes enfocadas a una comparación de ecología trófica entre localidades, donde un mayor número de muestras y contar con la marca isotópica de la oferta alimentaria es crucial.

#### *Asociación medidas craneométricas con variables ambientales y geográficas*

En relación a asociación de las medidas craneométricas con variables oceanográficas y con la Latitud se obtiene que para ejemplares adultos las medidas asociadas con tamaño de rostro

(EXNRT y RL) decrecen con la latitud, al igual que el ancho parietal (PW) en el caso de adultos y juveniles. Sin embargo, las fosas anexas al canal óptico (VF) aumentan con la latitud en ambos casos. Lo anterior, considerando las medidas EXNR, RL y PW como proxy de tamaño corporal, nos estaría dando cuenta de manera preliminar, de una tendencia contraria a lo que propone la regla de Bergman (similar a otros estudios de odontocetos, Ramos *et al* 2002, Molina-Schiller 2006 y carnívoros, Meiri *et al.* 2007), puesto que medidas asociadas a tamaño estarían disminuyendo a medida que la Temperatura decrece; sin embargo estaría potencialmente acorde a lo propuesto por Rosenzweig 1968. La Regla de Bergmann establece que homeotermos de mayor tamaño se encuentran en mayores latitudes o climas más fríos puesto que una menor relación superficie/ volumen se traduciría en una mayor retención del calor por unidad de masa (Mayr 1963, Boyce 1978, Blackburn *et al.* 1999), así mismo una mayor relación superficie /volumen contribuiría a una mayor disipación del calor, siendo ventajoso un menor tamaño en climas más cálidos (Yom-Tov *et al.* 2003). Por su parte, la Hipótesis de Productividad de Rosenzweig indica que el tamaño de mamíferos carnívoros estaría explicado por productividad ambiental, sugiriendo una asociación positiva entre productividad ambiental y tamaño corporal (Wigginton and Dobson 1999; Yom-Tov and Geffen 2006). El patrón craneométrico en gradiente latitudinal encontrado para las medidas EXNRT-RL-PW en *C. eutropia* estaría potencialmente asociado con esta última hipótesis (similar a lo encontrado para hembras de lobo marino común, *Otaria flavescens*, Sepúlveda *et al.* 2013, en otros carnívoros Meiri *et al.* 2007 y odontocetos Amano *et al.* 1992), puesto que los mayores valores se encontrarían en las principales zonas de surgencia costera y en los principales sitios de desembarques pesquero, considerando abundancia pesquera de potenciales presas de la especie, como proxy de productividad. A lo largo de la costa chilena, es usual la ocurrencia de surgencias costeras entre las latitudes 18° S y 38° S debido a la orientación de la costa y al régimen de vientos, donde predominan los del S y SW, (Bakun & Nelson 1991), identificándose focos importantes en Valparaíso, San Antonio, Constitución (Sievers *et al.* 2000, Bello *et al.* 2004) y Talcahuano. De similar manera, los

mayores desembarques pesqueros a nivel general y de potenciales presas de delfín chileno (sardina común, róbalo) se realiza en la región del Bío –Bío (Sernapesca 2011, 2010), sugiriendo ambas aproximaciones, una mayor productividad ambiental en estas latitudes intermedias. Esta relación positiva sugiere el importante rol de la productividad primaria en el tamaño corporal (tal como ha sido encontrado en otros estudios Yom-Tov *et al.* 2003, Meiri *et al.* 2007, Blois *et al.* 2008, Sepúlveda *et al.* 2013) indicando que la temperatura no es el único factor involucrado (Yom-Tov *et al.* 2003). La variación morfológica en cetáceos es un factor que aún carece de explicación en algunos casos, debido principalmente a la diferencia en aproximaciones a morfología básica, que han sido utilizado tradicionalmente en otros vertebrados (Pynesson *et al.* 2011).

En resumen, el presente estudio da cuenta de variación geográfica en caracteres morfométricos craneales de *C. eutropia* a lo largo de su distribución. Por una parte se diferencian dos grandes grupos (Norte y Sur) ubicados respectivamente en dos unidades biogeográficas marinas que presentan características ambientales, topográficas y de oferta alimentaria diferenciadas. Un análisis exploratorio de ecología trófica sugiere que no hay superposición trófica entre ejemplares de distintas localidades, lo que concuerda con el patrón de diferenciación morfométrica y molecular a escala geográfica reducida encontrada en la presente Tesis y por ende, con las conducta filopátrica y desplazamientos reducidos, descritos a nivel de género. Adicionalmente, se encuentra un patrón craneométrico asociado a la Hipótesis de productividad de Rosenweig encontrando una relación positiva entre medidas asociadas a tamaño corporal con zonas identificadas como de alta productividad en la costa chilena. En base a lo anterior y dado que las medidas craneométricas que contribuyen a la variación geográfica son variables funcionales, se propone que la variación geográfica encontrada podría ser resultado de especialización y desarrollo de ecolocalización como consecuencia de adaptación a diferentes ambientes.



El presente estudio contribuye de manera preliminar a la investigación de variación geográfica a nivel de caracteres morfométricos y de ecología trófica del delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia*, única especie de cetáceo endémica de nuestro país, y a nivel de mamíferos marinos en el Pacífico Suroriental, siendo uno de los primeros realizados a lo largo de distribución de la especie; y destaca la importancia y utilidad de integración de herramientas de estudio como lo son análisis morfométricos, moleculares y de ecología trófica. Los resultados deben ser corroborados y ampliados con futuros estudios que consideren un mayor número de ejemplares a analizar y un análisis comparativo ampliado de ecología trófica de la especie.

## ANEXO 1

### Descripción medidas craneométricas que contribuyen a variación geográfica

**Cresta Supraoccipital (SOCH):** Llamada también cresta nugal, divide entre la porción posterior del cráneo (región occipital) y la porción anterior o dorsal. Forma parte el hueso supraoccipital. En *Tursiops* y otros odontocetos, la cresta supraoccipital se extiende desde la línea media hacia el parietal, adyacente y prácticamente perpendicular a la cresta temporal (Figura 1, 3). El hueso frontal se ubica lateralmente a la cresta supraoccipital, proporcionado soporte a esta estructura (Mead & Fordyce 2009). En relación a la estructura blanda que se encuentra relacionada con esta estructura ósea, destacan la presencia de los sacos vestibulares y los sacos nasofrontales, ambos involucrados en el movimiento de aire ya sea como reservorio aéreo o reflector del sonido (Figura 18, Mead 1975)

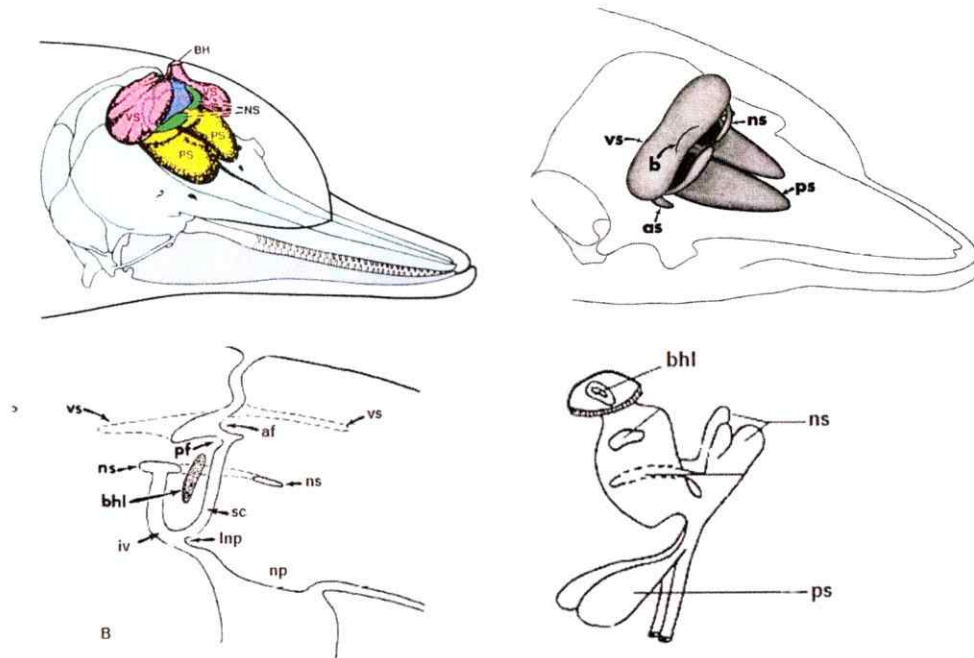


Figura 18. Esquema de estructuras blandas principales del complejo naso-frontal en Delphinidae. Bhl = orificio respiratorio, iv= vestibulo inferior, m=melón, ns= saco nasofrontal, ps= saco premaxilar, vs= saco vestibular (modificado de Mead 1975).

**Ancho Máximo Premaxilar (GPMW):** El premaxilar forma la parte anterior del cráneo y también el piso del pasaje antero-nasal (Figura 1). Está rodeada por la maxila, el vómer y el nasal. En odontocetos esta estructura ósea se encuentra modificada en relación a la maxila básica de mamíferos por el desplazamiento de los nasales hacia posterior y el desarrollo ascendente de la maxila. El premaxilar conforma la mayor parte del borde anterior del nasal externo y en él destaca la presencia de la fosa premaxilar y de los forámenes premaxilares (FPMRB), los cuales en odontocetos, son parte del complejo nervioso infraorbital. Como estructura blanda asociada, destaca la presencia de los sacos premaxilares, alojados en la superficie dorsal del premaxilar (Figura 13).

**Ancho máximo Parietal (PW):** El parietal forma las paredes laterales de cráneo, colindando con el frontal, escamoso, interparietal y exoccipital (Figura 1 y 3). Se encuentra en directa relación con el área occipital, la cual es una parte importante del sistema locomotor de los cetáceos puesto que facilita la conexión con la columna vertebral, siendo la porción anterior de inserción de una serie de músculos epiaxiales. Está formado por el interparietal, supraoccipital y osificaciones exoccipitales (Figura 1 y 3). El exoccipital forma parte de la pared posterolateral del cráneo. En su porción media presenta osificaciones pareadas llamadas cóndilos occipitales. Se encuentra rodeada dorsalmente por el supraoccipital, anterolateralmente por los parietales, anteriormente por los escamosos y anteroventralmente por el basioccipital (Figura 19). El interparietal se encuentra comúnmente fusionado en mamíferos y en particular en odontocetos se fusiona con el supraoccipital justo antes del nacimiento. Lateralmente colinda con el parietal ubicándose en posición posterior al supraoccipital. El supraoccipital conforma el borde más dorsal del foramen magnum y parte del techo del cráneo.

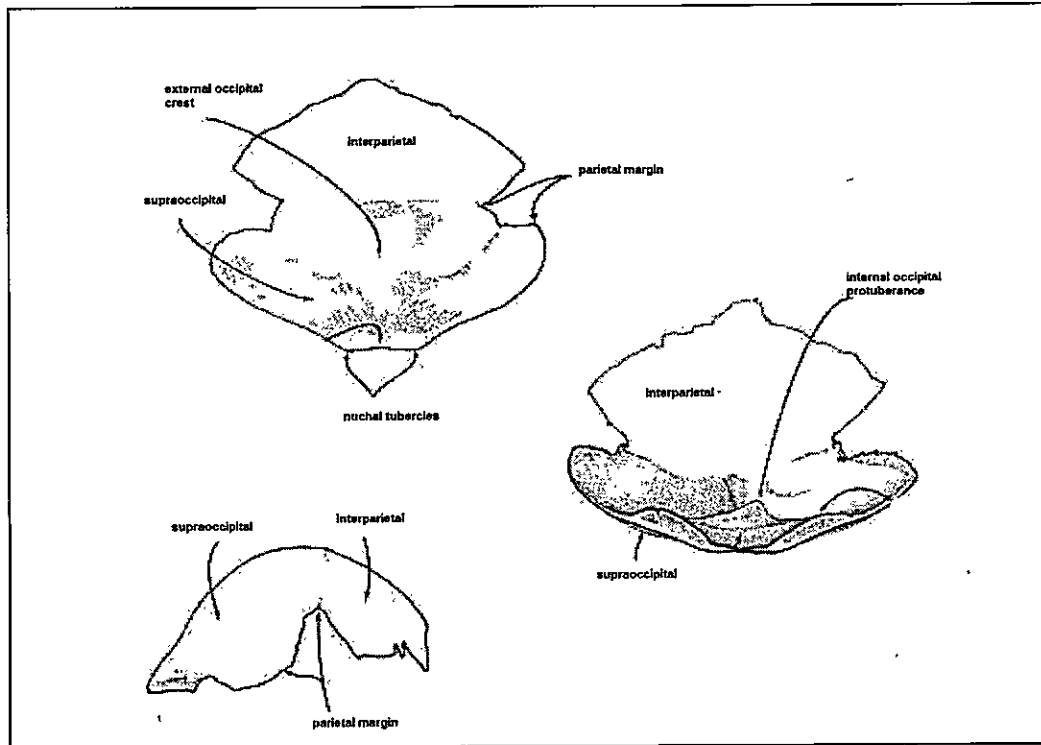


Figura 19. Esquema supraoccipital desarticulado de un cráneo de neonato (modificado de Mead & Fordyce 2009).

**Altura de la fosa temporal (TFH) y Longitud Orbital (LO):** La fosa temporal corresponde a una cavidad o depresión ubicada a ambos costados y base del cráneo; de forma semicircular en vista lateral. Está formada principalmente por el escamoso, parietal y frontal. En Delphinidae el borde ventrolateral de la fosa temporal está formado posteriormente por el proceso cigomático del escamoso y anteriormente por el proceso cigomático del frontal. El jugal se desplazado ventralmente articulando con el lacrimal y el maxilar, formando el borde ventral de la órbita. La órbita en cetáceos es abierta en su porción ventral (Figura 20). Está formada principalmente por el frontal, en jugal y el lacrimal. El maxilar no forma parte de la órbita en odontocetos. El tamaño de la fosa temporal, así como variaciones del tamaño orbital han sido identificados como caracteres que presentan variación geográfica, siendo asociado principalmente a especializaciones tróficas y/o de ambientes

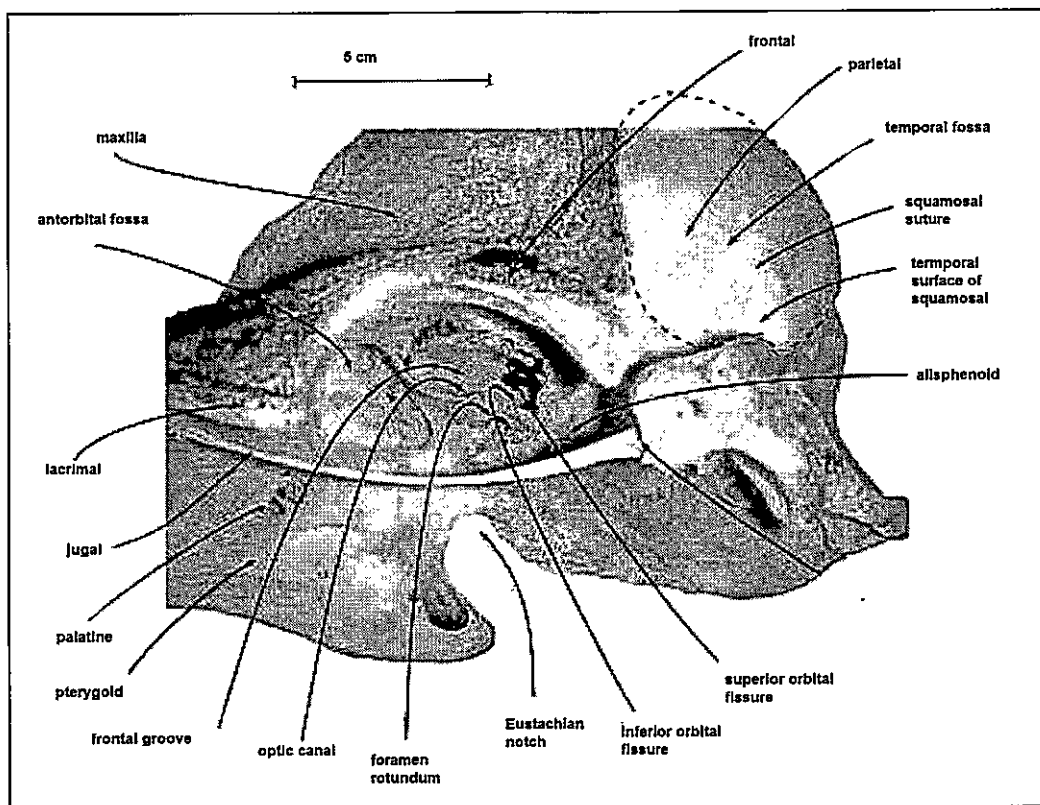


Figura 20. Esquema órbita ocular en Delphinidae (modificado de Mead & Fordyce 2009).

**Distancia del rostro a narina externa (EXN-RT).** Esta medida da cuenta de la longitud del rostro siendo directamente un proxy de tamaño. Los huesos que comprende son principalmente los premaxilares por dorsal, descritos anteriormente e ilustrados en las Figuras 1 y 3.

**Fosa anexa al canal óptico (VF):** Corresponde a dos cavidades ubicadas en la porción ventral del cráneo, identificadas por primera vez durante el presente estudio. Las cavidades se disponen a ambos costados del cráneo, en el área próxima al canal óptico, relacionándose probablemente con aislamiento auditivo.



## BIBLIOGRAFIA

- Aguayo-Lobo, A. Torres, D. Y Acevedo, J. 1998. Los Mamíferos Marinos de Chile: I. Cetacea. Ser. Cient. Inst. Antart. Chil. 48: 19-159.
- Amano, M. Miyazaki, N. 1992. Geographic variation and sexual dimorphism in the skull of Dall's porpoises, *Phocoenoides dalli*. Mar. Mamm. Sci 8(3): 240-261.
- Amaral, A. Coelho, M. Marugan-Lobón, L. Y Rohlf, F. 2009. Cranial shape differentiation in three closely delphinid cetacean species: Insights into evolutionary history. Zool. 112: 38-47.
- Ashton, K. Tracy, M. DeQueiroz, A. 2000. Is Bergmann's Rule Valid for Mammals?. Am Nat 156: 390-415.
- Baker A, Smith, A. Y Pichler, F. 2002. Geographical variation in Hector's dolphin: recognition of new subspecies of *Cephalorhynchus hectori*. J. R. Soc. N. Z. 32 (4):713-727.
- Bakun, A.Y Nelson, C. 1991. The seasonal cycle of wind stress curl in sub-subtropical eastern boundary current regions. J. Phys. Oceanogr., 21: 1.815-1.834.
- Barreto, A.. 2002. Variação Craniana e Genética de *Tursiops truncatus* (Delphinidae, Cetacea) na Costa Atlântica da América do Sul. Tese apresentada à Universidade do Rio Grande como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Oceanografia Biológica 111pp.
- Bell, C. Kemper, C. Y Conran, J. 2002. Common dolphins *Delphinus delphis* in southern Australia: a morphometric study. Aust. Mamm. 24: 1-10.
- Bello, M. Barbieri, A. Salinas, A. Soto, L. 2004. Surgencia costera en la costa central de Chile durante el ciclo El Niño la Niña 1997-1999. En S Avaria, J carrasco, J Ruttland y E Yañez (eds) 2004. El Niño-La Niña 1997-2000. Sis efectos en Chile, CONA, Chile. Valparaíso pp 77-94.
- Blackburn, T. Gaston, K. L Y Loder, N. 1999. Geographic gradients in body size: a clarification of Bergmann's rule. Div Dist 5: 165-174.
- Blois, J. Feranec, J. Hadly, R. 2008. Environmental influences on spatial and temporal patterns of body-size variation in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). J Biogeogr 35: 602-613.
- Boyce, M..1978. Climatic variability and body size variation in the muskrats (*Ondatra zibethicus*) of North America. Oecol 36: 1-19.
- Capella, J. Gibbons, J. Y Vilina, Y. 1999. Nuevos registros del delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia* (Gray, 1846) en Chile central, extremo norte de su distribución. Est. Oceanol. 18: 65-67.
- Dawson, S. 2002. *Cephalorynchus dolphins*. En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), Encyclopedia of Marine Mammals. pp 200-203. Academic Press, San Diego.
- Escribano, R. Fernández, M. Aranís, A. 2003. Physical-chemical processes and patterns of diversity of the Chilean eastern boundary pelagic and benthic marine ecosystem: An overview. Gayana 67, 190-205.

Fiedler, P. Y Reilly, C. 1993. Interannual variability of dolphin habitats in the eastern tropical Pacific. II. Effects on abundances estimated from tuna vessel sightings 1975–1990. *Fish. Bull. US* **92**, 451 – 463 .

Fontaine, M. Tolley, K. Siebert, U. Gobert, S. Lepoint, G. Bouquegneau, J. 2009 Long-term feeding ecology and habitat use in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from Scandinavian waters inferred from trace elements and stable isotopes. *BMC Ecol.* **7**: 1–12.

Fredriksen, S. 2003. Food web studies in a Norwegian kelp forest based on stable isotope ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) analysis. *Mar Ecol Prog Ser* **2003**, 260:71-81.

Futuyma, J. 1998. *Evolutionary biology*. 3d edn. Sinauer, Sunderland, Mass.

Goodall, R. 1994a. Chilean dolphin, *Cephalorhynchus eutropia* (Gray 1846). In: Ridgway SH, Harrison Red. *Handbook of marine mammals*. San Diego, Academic Press. Pp. 269–287.

Goodall, R. Norris, K. Galeazzi, A. Leatherwood, S. Miller, S. Cameron, I. Kastelein, R. Y Sobral, A. 1988a. Studies of Commerson's dolphins, *Cephalorhynchus commersonii*, off Tierra del Fuego, 1976–1984, with a review of information on the species in the South Atlantic. *Rep. Int. Whal. Commn, Special Issue 9*: 3–70.

Goodall, R. Norris, K. Galeazzi, A. Oporto, J. Y Cameron, I. 1988b. On the Chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* Gray, 1846. *Rep. Int. Whal. Commn, Special Issue 9*: 197–257.

Goodall RNP 1994b. Commerson's dolphin *Cephalorhynchus commersonii* (Lacepede 1804). En: Ridgway; S. Harrison, R (eds) *Handbook of Marine Mammals*. San Diego, Academic Press. Pp. 241–267.

Gould, S Y Jhonston, J. 1972. Geographic variation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **3**: 457-498.

Graham, B. Koch, H. Newsome, S. McMahon, K Y Aurioles, D. 2010. Using Isoscapes to Trace the Movements and Foraging Behavior of Top Predators in Oceanic Ecosystems. En: West, J.B.; Bowen, G.J.; Dawson, T.E.; Tu, K.P. (Eds.). *Understanding movement, pattern, and process on Earth through isotope mapping*. Springer: 487 pp.

Guill, J. Hoo, J. Heins, D. 2003. Body shape variation within and among three species of darters (Perciformes: Percidae). *Ecol Freshw Fish* **12**: 134-140.

Gutstein, C. Cozzuol, M. Vargas, A. Suárez, M. Schultz, C. 2009. Patterns of skull variation of *Brachydelphis* (Cetacea, Odontoceti, Pontoporiidae) from South-Eastern Pacific Neogene. *J. Mammal* **90**: 504-519.

Gutstein, C. 2013. Evolución de las estructuras asociadas a la ecolocalización en delfines de río y marinos (Cetacea, Odontoceti) de América del Sur. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias c/m en Ecología y Biología Evolutiva. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. 420 pp.

Hammer, O. Harper, D Y Ryan D. 2001. Past : Paleontological statistics Software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* vol 4 issue 1art 4: 9 pp.

- Hastie, G. Swift, R. Slesser, G. Thompson, P. Y Turrell, W. 2005. Environmental models for predicting oceanic dolphin habitat in the Northeast Atlantic. *J. Mar. Sci.* 62: 760-770.
- Heinrich, S. 2006. Ecology of Chilean dolphins and Peales dolphins at isla Chiloe, Southern Chile. A thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. School of Biology. University of St Andrews. 258pp.
- Dawson, S. 2009. *Cephalorynchus dolphins*. En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), *Encyclopedia of Marine Mammals*. pp 191-196. Academic Press, San Diego.
- Hobson, K. Y Welch, A. 1992. HE: Determination of trophic relationships within a high arctic food web using delta-13C and delta-15N analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 1992, 128:1-10.
- Jefferson, T. Y Van Waerebeek, K. 2004. Geographic variation in skull morphology of humpback dolphins (*Sousa* spp.). *Aquat. Mamm.* 30, 3-17.
- Land, M. Y Nilsson, D, 2002. *Animal Eyes*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Luna, C. Goodman, S. Thatcher, O. Jepson, P. Andersen, L. Tolley, K. Y Hoelzel, A. 2012. Phenotypic and genetic divergence among harbour porpoise populations associated with habitat regions in the North Sea and adjacent sea. *J Evol Biol.*25(4):674-81.
- Mayr, E. 1963. *Animal species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Mead, J. Fordyce, R. 2009. The therian skull: a lexicon with emphasis on the odontocetes. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 627: 1-249.
- Meiri, S. Yom-Tov, Y. Geffen, E. 2007. What determines conformity to Bergmann's rule?. *Global Ecol Biogeogr* 16: 788-794.
- Meiri, S. Y Dayan, T. 2003. On the validity of Bergmann's rule. *J. Biogeogr.* 30:331-351.
- Meiri S, Dayan T Y Simberloff D. 2004. Carnivores, biases and Bergmann's rule. *Biol. J. Linn. Soc* 81: 579-588.
- Michener, R. Schell, D. 1994. Stable isotopes ratios as tracers in marine and aquatic food webs. En: Lajtha, K. Michener, R. (eds). *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Oxford: Blackwell;:138-157.
- Molina-Schiller, D. 2006. Variacao Geografica do boto de Burmeister, *Phocoena spinipinni*, (Burmeister 1865) (Cetacea: Phocoenoide) nas costa Atlantica e Pacifica da America do Sul. Universidade Federale do Rio Grande do Sul. 223pp.
- Montecino, V. Y Quiroz, D. 2000. Specific primary production and phytoplankton cell size structure in an upwelling area off the coast of Chile (30°S). *Aquat. Sci.* 62: 364-380.
- Montoya, J. 2007. Natural abundance of 15N in marine planktonic ecosystems. En: Michener R. and K. Lajtha (eds) *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*, 2nd Edition. Blackwell Publishing, pp. 176-207.



Muñoz, L Newsome, S. Pavez, G. Quiñones, R. Santos, M.Y Sepúlveda, M. *En preparación*. Marine top predators showed unexpected  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values along a latitudinal gradient.

Murphy, S. Herman, J. Pierce, G. Rogan, E.Y Kitchener, A. 2006. Taxonomic variation of Common dolphins (*Delphinus*) in the Eastern north Atlantic. *Mar. Mamm. Sci.* 22(3): 573-59.

Ojeda, P. Labra, F. Y Muñoz, A. 2000. Biogeographic patterns of Chilean littoral fishes. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 73: 625-641.

Oporto, J. 1988. Biología descriptiva y status taxonómico del delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia*, Gray 1846 (Cetacea: Delphinidae). Magister en ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia Chile.

Oporto J, A. Brieva, L. 1990. Interacción entre la pesquería artesanal y pequeños cetáceos en la localidad de Queule (IX región), Chile. Pages 197-204 en 4 Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, Valdivia, Chile.

Pérez-Alvarez, MJ, Alvarez, E. Aguayo-Lobo, A Y Olavarría, C. 2007. Occurrence and distribution of Chilean dolphin, *Cephalorhynchus eutropia*, in coastal waters of central Chile. *New N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 41: 405-409.

Perrin, W. Thieleking, J. Walker, W. Archer, F. I Robertson, K. 2011. Common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in California waters: Cranial differentiation of coastal and offshore ecotypes. *Mar. Mamm. Sci.* 27 (4): 769-792.

Perrin, W. Y Brownell, R. 1994. A brief review of stock identity in small marine cetaceans in relation to assessment of driftnet mortality in the North Pacific . *Rep. Int. Whal. Commn. Spec. Iss.* 15, 393 – 401.

Perrin, W. F. 1975. Variation of spotted and spinner porpoise (genus *Stenella*) in the eastern Pacific and Hawaii. *Bulletin of the Scripps Institution of Oceanography of the University of California* 21: 1-206.

Perrin, W. 1984. Patterns of geographical variation in small cetaceans. *Acta Zool. Fenn* 172: 137-140.

Perrin, W. Yablokov, A. Barlow, J. Y Mina, M. 1994. Comparison of the resolving power of metric and Non-metric Cranial Characters in defining Geographical Populations of dolphins. *Scientific Publications Committee. Nat. Hist. Museum of Los Angeles County* 447: 1-15.

Perrin, W. 2002. Geographic Variation En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), *Encyclopedia of Marine Mammals*. pp 510-516. Academic Press, San Diego.

Perrin, W. 2003. Cranial sexual dimorphism and geographic variation in Fraser's dolphin, *Lagenodelphis hosei*. *Mar. Mamm. Sci.*: 19(3): 484-501.

Pichler, F. Dawson, S. Slooten, E. Y Baker, C. 1998. Geographic isolation of Hector's dolphin populations described by mitochondrial DNA sequences. *Conserv. Biol.* 12, 676- 682.

- Pichler, F. Robineau, D. Goodall, N. Meyer, N. Olavarría, C. Y Baker, S. 2001. Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). *Mol Ecol* 10, 2215-2223.
- Pichler, F. Y Baker, C. 2000: Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. *Proc. R. Soc. Lond., B*, 267: 97-102.
- Pynesson, N. Sponberg, A. 2011. Reconstructing Body Size in Extinct Crown Cetacea (Neoceti) Using Allometry, Phylogenetic Methods and Tests from the Fossil Record. *J. Mamm. Evol.* 18(4): 269-288.
- Ramos, R. Beneditto, A. Siciliano, S. Santos, M. Zerbini, A. Bertozzi, C. Vicente, A. Zampiroli E. Alvarenga, F. Y Lima, N. 2002. Morphology of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) off Southeastern Brazil: Sexual Dimorphism, Growth and Geographic Variation. *Lajam* 1(1):129-144.
- Reyes, J. Y Molina, D. 1997. Clave artificial para la identificación de cráneos de cetáceos del Pacífico Sureste. *Bol. Mus. Nac. Histo.Nat. Chile*, 46: 95-119.
- Robineau, D. Goodall, R. N. P. Pichler, F. Y Baker, C. 2007. Description of a new subspecies of Commerson's dolphin *Cephalorhynchus commersonii*, inhabiting the coastal waters of the Kerguelen Islands. *Mammalia*: 172-180.
- Robineau, D. 1984. Morphologie externe et pigmentation du dauphin de Commerson *Cephalorhynchus commersonii* (Lacepede, 1804) en particulier celui des îles Kerguelen. *Can. J. Zool.* 62: 2465-2475.
- Rosenzweig, M. 1968. The strategy of body size in mammalian carnivores. *Am Midl Nat* 80: 299-315.
- Sabat, P.Y Martínez del Río, C. 2002. Inter- and intraspecific variation in the use of marine food resources by three Cíndodes (Furnariidae, Aves) species: carbon isotopes and osmoregulatory physiology. *Zool.* 105: 247-256.
- Santos, M. G, Pierce, J. Learmonth, R. Red, H. Ross, I. Patterson, D. Reid, A. Y Beare, D. 2004. Variability in the diet of harbor porpoises *Phocoena phocoena* in Scottish waters 1992-2003. *Mar. Mamm. Sci.* 20(1):1-27.
- Schnell, G. Douglas, M Y Hough, D. 1986. Geographic variation in offshore spotted dolphins (*Stenella attenuata*) of the eastern tropical Pacific Ocean. *Mar. Mamm. Sci.* 2 (3): 186-213.
- Secchi, E.Wang, R. Murray, J. Rocha-Campos; R. Y White, B. 1998. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Can. J. Zool.* 76:1,622-7.
- Sepúlveda, M. Oliva, D. Duran, R. Urra, A. Pedraza, S. Majluf, P. Goodall, N. Crespo, E. 2013. Testing Bergmann's rule and the Rosenzweig hypothesis with craniometric studies of the South American sea lion. *Oecol.* 171 (4):809-17.
- Sernapesca 2011-2010. Anuario estadístico de Desembarque de Pesca Total por región. [www.sernapesca.cl](http://www.sernapesca.cl).

Sievers, H. Y Vega, S. 2000. Respuesta físico-química de la bahía de Valparaíso a la surgencia generada en punta Curaumilla y al fenómeno El Niño. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 35(2):153-168.

Thiel, M. Macaya, E. Acuña, Arntz, W. Bastias, H. Brokordt, K. Camus, P. Castilla, J. Castro, L. Cortés, M. Dumont, C. Escribano, R. Fernandez, M. Gajardo, R. Gaymer, R. Gomez, I. González, A. González, H. Haye, P. Illanes, P. Iriarte, P. Lancellotti, P. Luna-Jorquera, P. Luxoro, P. Manríquez, P. Marín, V. Muñoz, P. Navarrete, S. Pérez, S. Poulin, E. Sellanes, J. Sepúlveda, H. Stotz, W. Tala H. Thomas, A. Vargas, C. Vásquez, J. Y Vega, J. 2007. The Humboldt Current System Of Northern and Central Chile. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 45: 195-344.

Tuross, N. Fogel, M Y Hare, P. 1998. Variability in the preservation of the isotopic composition of collagen from fossil bone. *Geoch. et Cosmoch. Acta* 59: 929-935.

Westgate, A. 2007. Geographic Variation in Cranial Morphology of Short-beaked Common Dolphins (*Delphinus delphis*) from the North Atlantic. *J. Mamm.* 88(3):678-688.

Wiggington, J. Dobson, F. 1999. Environmental influences on geographic variation in body size of western bobcats. *Can J Zool* 77: 802-813.

Yañez, P 1948. Vertebrados marinos chilenos. I. Mamíferos. *Rev. biol. mar. oceanogr. Valparaíso* 1(2): 103-123.

Yom-Tov, Y. Geffen, E. 2006. Geographic variation in body size: the effects of ambient temperature and precipitation. *Oecol.* 148: 213-218 .

Yom-Tov, Yom-Tov, S. Baagoe, H. 2003. Increase of skull size in the red fox (*Vulpes vulpes*) and Eurasian badger (*Meles meles*) in Denmark during the twentieth century: an effect of improved diet?. *Evol Ecol Res* 5: 1037-1048.

### **CAPITULO III: Biogeografía histórica de *C. eutropia*: Impacto de los ciclos glaciales sobre la distribución y la diversidad genética del delfín chileno**

#### **RESUMEN**

Variaciones climáticas asociadas a los ciclos glaciales ocurridos durante el Pleistoceno han influido en los patrones biogeográficos y de distribución actual de muchas especies, en particular en las regiones polares y templadas frías. Reconstrucciones demográficas inferidas a partir de la diversidad genética han demostrado que estas fluctuaciones se relacionan con episodios de expansión-contracción poblacional. *Cephalorhynchus eutropia* se distribuye a lo largo de la costa de Chile, comprendiendo dos áreas geográficamente distintas: La zona norte (Valparaíso-Puerto Montt), conformada principalmente por costa expuesta, bahías y estuarios, la cual no ha sido afectada directamente durante los períodos glaciales y la zona sur (Chiloé-Isla Navarino), conformada principalmente por fiordos y canales que sí han sido afectados reiterativamente por períodos glaciales. Mediante la señal genética obtenida de ADN mitocondrial (región control), el presente estudio analiza la contribución de los ciclos glaciales, en particular del Ultimo Máximo Glacial, sobre los patrones de distribución, estructura poblacional y diversidad genética del delfín chileno. Se identificaron dos unidades genéticas poblacionales mediante programa de estructuración poblacional espacial (Zona Boreal y Zona Austral), las cuales se encuentran genéticamente diferenciadas ( $\Phi_{ST} = 0,53$   $P = 0,012$  y  $F_{ST} = 0,24$   $P = 0,014$ ). La diversidad haplotípica y nucleotídica obtenida para la Zona Austral fue significativamente menor que la obtenida para la Zona Boreal, lo que, sumado a la genealogía haplotípica caracterizada por tener un haplotipo dominante del cual emergen haplotipos de baja frecuencia y al ajuste de la distribución de diferencias entre pares de secuencias, da cuenta de una expansión poblacional reciente para esta zona estimada hace aproximadamente 16.000 años (mismatch) o 11.000 años (skylineplot). Lo anterior es consecuente con la información cronológica de datación de

ciclos glaciales reportada para estas latitudes, particularmente durante el Último Máximo Glacial. Se propone que la distribución actual del delfín chileno se ajusta al modelo biogeográfico de Expansión-Constracción y que las poblaciones ubicadas al sur de su rango de distribución se habrían originado de manera posterior al retiro de los hielos, probablemente como resultado de un proceso de recolonización postglacial proveniente de las poblaciones ubicadas al norte, caracterizado por efectos fundadores y una rápida expansión poblacional.

## INTRODUCCIÓN

Los patrones biogeográficos de especies tanto terrestres como marinas están altamente influenciados por eventos históricos como fluctuaciones en el nivel del mar o la ocurrencia de ciclos glaciales (Collin & Mantenon 2002). Así, los ciclos glaciales del Pleistoceno, datados dentro de los últimos dos millones de años, son reconocidos como los eventos históricos más significativos ocurridos durante el último tiempo evolutivo de muchas especies, principalmente en las zonas templadas y polares (Hewitt 1996, 1999). Precisamente, la distribución de muchas de estas especies está relacionada con el último evento glacial y con la transición hacia el período interglacial actual (Avice *et al.* 1998).

Desde una aproximación temporal, las fluctuaciones climáticas recientes, correspondientes al Pleistoceno tardío, se relacionan con variaciones poblacionales a nivel intra-específico (Avice & Walker 1998), y sus efectos en patrones filogeográficos y variabilidad poblacional han sido evaluados en diferentes taxa (Avice *et al.* 1998). En este contexto, el modelo biogeográfico de Expansión-Contracción (E-C) (Provan and Bennett 2008) propone que especies de zonas templadas-frías que sobrevivieron el Último Máximo Glacial (UMG) contraerían su rango de distribución a zonas menos afectadas por el hielo y posteriormente, luego del retiro de los hielos, recolonizarían zonas de altas latitudes. De esta manera, sucesivos efectos fundadores que ocurren durante la expansión del rango geográfico hacia áreas previamente cubiertas por hielo provocan que las poblaciones re-colonizadoras deriven de la población fuente, diferenciándose genéticamente (Hewitt 1996, 2000) y exhibiendo reducidos niveles de diversidad (Knowles 2001).

La mayoría de los estudios de biogeografía ligados a los ciclos glaciales del Pleistoceno han sido desarrollados en el Hemisferio Norte y sólo algunos a lo largo de las costas del Hemisferio Sur, donde las características físicas, geológicas y el contexto evolutivo son muy diferentes (Sánchez *et al.* 2011). Las glaciaciones que ocurrieron durante el Pleistoceno cubrieron un área mucho

mayor y fueron de mayor impacto en el Hemisferio Norte que en el Hemisferio Sur, dado principalmente la disposición de los continentes (Lowell *et al.* 1995). Dentro de los eventos glaciales ocurridos en Sudamérica, la más antigua de las glaciaciones patagónicas se desarrolló entre 7 y 5 Ma (Mioceno tardío-Plioceno temprano), seguida de un mínimo de 8 glaciaciones durante el Plioceno tardío. Durante el Pleistoceno temprano (1,2 Ma) ocurre la Gran Glaciación patagónica, con el posterior desarrollo de 14 a 16 épocas geoclimáticas frías intercaladas de sus correspondientes equivalentes cálidos. Posteriormente, dentro de los eventos glaciales ocurrido en el Pleistoceno medio-tardío, destaca la Última Gran Glaciación (UGG) que alcanzó su máximo hace 25.000 años con el Último Máximo Glacial (UMG), el cual finaliza hace 16.000 años (Pleistoceno tardío). Finalmente tuvieron lugar dos nuevos re-avances glaciares hace 15.000-10.000 años (Tardiglacial; Rabassa *et al.* 2005). Estos eventos glaciales produjeron cambios climáticos que influyeron en los ecosistemas tanto marinos como terrestres durante los últimos 5 millones de años. Variaciones en el nivel del mar de hasta 100-140 metros, y de al menos 5-6°C de temperatura superficial del mar se estiman durante los ciclos glaciales-interglaciales (Rabassa *et al.* 2005). Geográficamente, la capa de hielo durante las glaciaciones del Pleistoceno se extendería hasta profundidades del Océano Pacífico por el rango de expansión Oeste, sumergiéndose por el costado occidental de la isla de Chiloé al sur de los 43°S. La zona de fiordos y canales al sur de Chiloé se encontraba cubierta por una extensa capa de hielo durante el UMG que se extendía hasta el borde de la plataforma continental (Hulton *et al.* 2002), mientras que por el costado oriental de Sudamérica, actual plataforma submarina Atlántica, alcanzarían solo hasta el río Gallegos (51°S) (Figura 1; Rabassa & Claperton 1990; Rabassa & Cornato 2009).

Dentro de este contexto, organismos que presentaran una distribución continua a lo largo del extremo sur de Sudamérica debieran reflejar modificaciones de patrones biogeográficos producto de las glaciaciones (Collin & Mantenon 2002), infiriendo (1) divergencia de especies

como resultante de refugios alopátricos durante los períodos glaciales (Alexandrino *et al.* 2000) o bien (2) variaciones poblacionales a nivel intra-específico (Avice & Walker 1998). Algunos estudios de patrones biogeográficos y estructuraciones genéticas poblacionales en especies marinas en relación a variaciones climáticas en Sudamérica, corresponden a *Acanthina monodon* que se distribuye en el litoral rocoso entre los 28° y 55°S (Sánchez *et al.* 2011). Análisis de ADN mitocondrial de individuos provenientes de las tres regiones biogeográficas marinas revelan la presencia de 3 grupos (clusters) con diferentes niveles de diversidad genética y con estructura genética poblacional espacial, mostrando un calce perfecto de una de las unidades genéticas con el quiebre biogeográfico de los 30°S. La segunda unidad genética no concuerda con el quiebre geográfico de los 42°S, pero sí con uno ubicado a mayores latitudes y su genealogía en forma de estrella sugiere una recolonización postglacial hacia el sur de los 42°S (Sánchez *et al.* 2011). Para *Durvillaea antarctica*, estudios basados en ADN mitocondrial (COI) y cloroplastos (rbcL) revelan dos unidades genéticas para el centro y sur de Chile. La estructura genética encontrada en la región patagónica (49° -56°S) resulta ser homogénea y revela señales de recolonización postglacial (Fraser *et al.* 2010). Gonzalez-Wevar *et al.* (2012) reporta evidencia de estructuración genética poblacional y variaciones demográficas en tres unidades genéticas poblacionales de *Nacella magallanica* en Patagonia Pacífica, Atlántica e Islas Malvinas. La reconstrucción demográfica sugiere un proceso de recolonización reciente (<10 ka) seguido de un período de expansión poblacional postglacial al menos en la unidad genética poblacional de Patagonia Pacífica. Efectos de eventos climáticos sobre el patrón de estructuración genética poblacional, demográfica y rutas de dispersión en Sudamérica son reportados también para el róbalo, *Eleginops maclovinus* (Ceballos *et al.* 2012), *Galaxias maculatus*, (Zemlak *et al.* 2010), huillín, *Lontra provocax* (Vianna *et al.* 2011), entre otros.

Para el Orden Cetacea, también se ha evidenciado que las variaciones climáticas y oceanográficas han contribuido sustancialmente al patrón de distribución actual, variación geográfica y estructuración poblacional de algunas especies (LeDuc 2002). En su mayoría, los



antecedentes provienen de estudios realizados en el Hemisferio Norte. La expansión reciente de poblaciones de belugas, *Delphinapterus leucas*, en el Neártico occidental, correspondería a un evento posterior al retroceso de los hielos pleistocénicos y la cronología de los eventos postglaciales probablemente habría determinado las rutas de dispersión de esta especie desde sus refugios glaciares (O'Corry-Crowe *et al.* 1997). Para *Lagenorhynchus albirostris*, en el Atlántico Norte, análisis demográficos (mismatch distribution) basados en ADN mitocondrial, sugieren una expansión en la población de la costa Noruega- Mar de Barrents y una expansión geográfica en la población de las islas británicas del Mar del Norte posterior a los eventos glaciales del Pleistoceno (Banguera-Hinestroza *et al.* 2010). Lo anterior podría deberse principalmente a las variaciones del nivel del mar y distribución de presas que influirían en el aislamiento y posterior conexión de poblaciones. Así, para esta especie de hábitats costeros, la expansión norte a lo largo de la costa noruega sería producto de eventos fundadores provenientes desde la población del mar de Norte (Banguera-Hinestroza *et al.* 2010). Otros ejemplos referentes a cambios en la distribución de especies en relación a variaciones climáticas son los reportados para *Phocoena phocoena*, *Lagenorhynchus albirostris* y *Balaenoptera acutorostrata* en el mar del Norte dado principalmente sus requerimientos ambientales para alimentación y crianza (Weir *et al.* 2007) y para *Eschrichtius robustus* en el Pacífico del Norte, donde las variaciones del nivel del mar y la disponibilidad de ambientes no cubiertos por hielo en el Pleistoceno tardío, modificaron sus rangos de distribución y abundancia (Pyneson *et al.* 2011).

El género *Cephalorhynchus* corresponde a un género de delfines del Hemisferio Sur, de pequeño tamaño, costeros, y de distribución restringida. Individuos de las distintas especies del género serían residentes a un área geográfica local, no existiendo evidencia de migraciones a grandes escalas (Dawson 2002). La amplia pero discontinua distribución del género *Cephalorhynchus* podría reflejar una restricción a hábitats de zonas templada-frías del Hemisferio Sur. Análisis

filogenéticos basados ADN mitocondrial indican que las cuatro especies del género formarían un grupo monofilético, proponiendo que el género se habría originado al sur de Africa (*C heavisidii*), posteriormente y producto de la Corriente de Deriva del Oeste (West Wind Drift) habrían llegado a Nueva Zelanda (*C. hectori*). Un efecto fundador posterior originaría la población que colonizó Sudamérica, la cual producto de las glaciaciones de Tierra del Fuego habría dado origen a *C.eutropia* y *C commersonii* y recientemente (10.000 años) una población de *C commersonii* habría fundado la población de las Islas Kerguelen (Pichler *et al.* 2001).

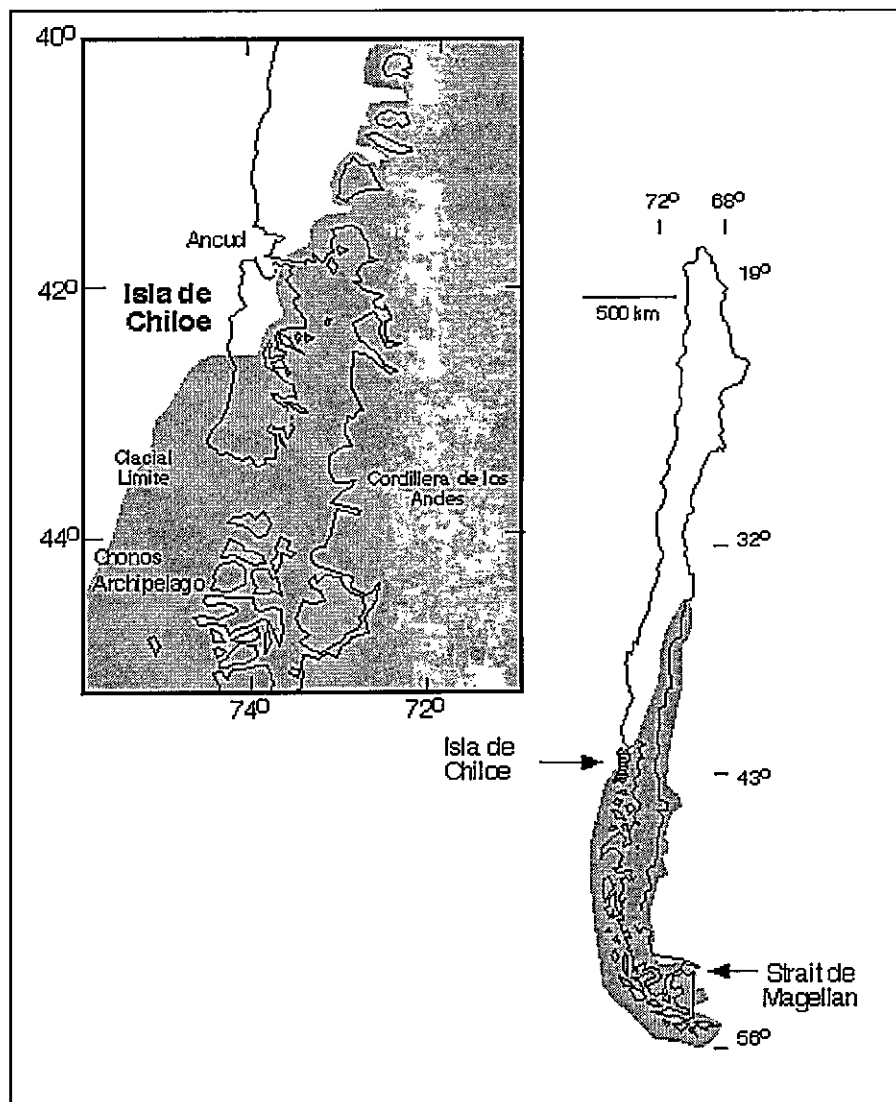


Figura 1. Límites de la Masa de Hielo durante el Último Máximo Glacial (UMG) en Sudamérica (Modificado de Thorson 1999).

El delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia* es la única especie de cetáceo endémica de nuestro país (Yáñez, 1948) y uno de los odontocetos más desconocidos a nivel mundial (Goodall *et al.* 1988). Se distribuye a lo largo de la costa central y sur de Chile, desde Concón (32°56'S) a Isla Navarino (55°14' S) (Goodall 1994a, Aguayo-Lobo *et al.* 1998), siendo caracterizada como una especie costera, de aguas poco profundas, al igual que sus congéneres (Dawson 2002). Habita en dos áreas geográficamente distintas: la costa abierta, bahías y estuarios desde Valparaíso (33°02'S) a Chiloé (42°00'S) y canales y fiordos entre Chiloé y la Isla Navarino (55°14'S; Goodall *et al.* 1994a), quiebre geográfico concordante con el límite glacial norte registrado durante el Último Máximo Glacial (Rabassa & Cornato 2009, Figura 1) y con las regiones biogeográficas descritas para el ecosistema marino de sistemas pelágicos (1) región centro-sur de surgencia (30°- 42°) y (2) la región austral de fiordos (44°-55°S) (Escribano *et al.* 2003). En el área de distribución norte (Valparaíso-Chiloé), la especie muestra una marcada preferencia por zonas estuarinas (Goodall *et al.* 1988, Capella *et al.* 1999, Pérez-Alvarez *et al.* 2007), factor que potencialmente condicionaría su distribución. Mediante la señal genética obtenida de ADN mitocondrial (región control), el presente estudio da cuenta de contribución de los ciclos glaciales, en particular, del Último Máximo Glacial, sobre los patrones de distribución, estructura poblacional y diversidad genética del delfín chileno.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se colectó un total de 66 muestras de tejido provenientes de 8 localidades a lo largo de la costa de Chile, entre los 35°20'S; 72°25'W y 52° 40'S; 72° 30'W (Figure 2). Las muestras se obtuvieron de individuos adultos mediante técnicas de muestreo con soporte de goma (skin swabbing; N=10, Harlin *et al.* 1999), biopsias (N=41; Krutzen *et al.* 2002) y animales enmallados (N=15). Posterior al muestreo, el tejido se mantuvo en ethanol 90% y la extracción de ADN se realizó mediante el método de extracción salina (Aljanabi and Martínez 1997).

### **Amplificación Adn mitocondrial (región control)**

Se amplificó un fragmento de 663 bp de la región control de AND mitocondrial en 64 individuos. Para lo anterior se utilizaron los partidores M13Dlp1.55'-TGTA AACGACAGCCAGTTCACCCAAAGCTGRARTTCTA-3' y 8G 5'GGAGTACTATGTCCTGTAACCA; Dalebout *et al.* 2005) y se secuenció en ambas direcciones. El protocolo de amplificación consideró un volumen total de 25 ul que consistió en 5ul PCR buffer 10X, 2ul MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1ul de cada partidador, 2ul de dNTP's 200mM, 0,3 ul de Taq DNA Polymerasa (Invitrogen Life Technologies) y 50ng DNA. Los perfiles de temperatura correspondieron a: un periodo de desnaturalización de 2 min a 94°C seguido de 30 ciclos de 30s a 94°C, un período de anillamiento de 40 s a 56°C y de extensión 40 s a 72°C. Finalmente, se incluyó un período de extensión final de 10 minutos a 72°C

### **Sexaje**

Se identificó el sexo de cada individuo mediante el uso simultáneo de 2 sets de partidores (Gilson *et al.* 1998) con lo que se obtiene la amplificación de un fragmento de 442-445 bp correspondiente a los genes ZFX/ZFY tanto en machos como en hembras (Aasen and Medrano 1990) y un fragmento de 224 bp correspondiente al gen SRY solo en machos (Gilson *et al.* 1998). La determinación sexual se realiza en base al número de bandas que se visualice en el gel, obteniendo dos bandas (445-224 bp) en el caso de los machos y solo una banda (445 bp,

Gilson *et al.* 1998) en el caso de las hembras (Figura 3). La identificación sexual se realizó 2 a 3 veces por individuo, utilizando siempre un individuo de sexo conocido como control positivo.

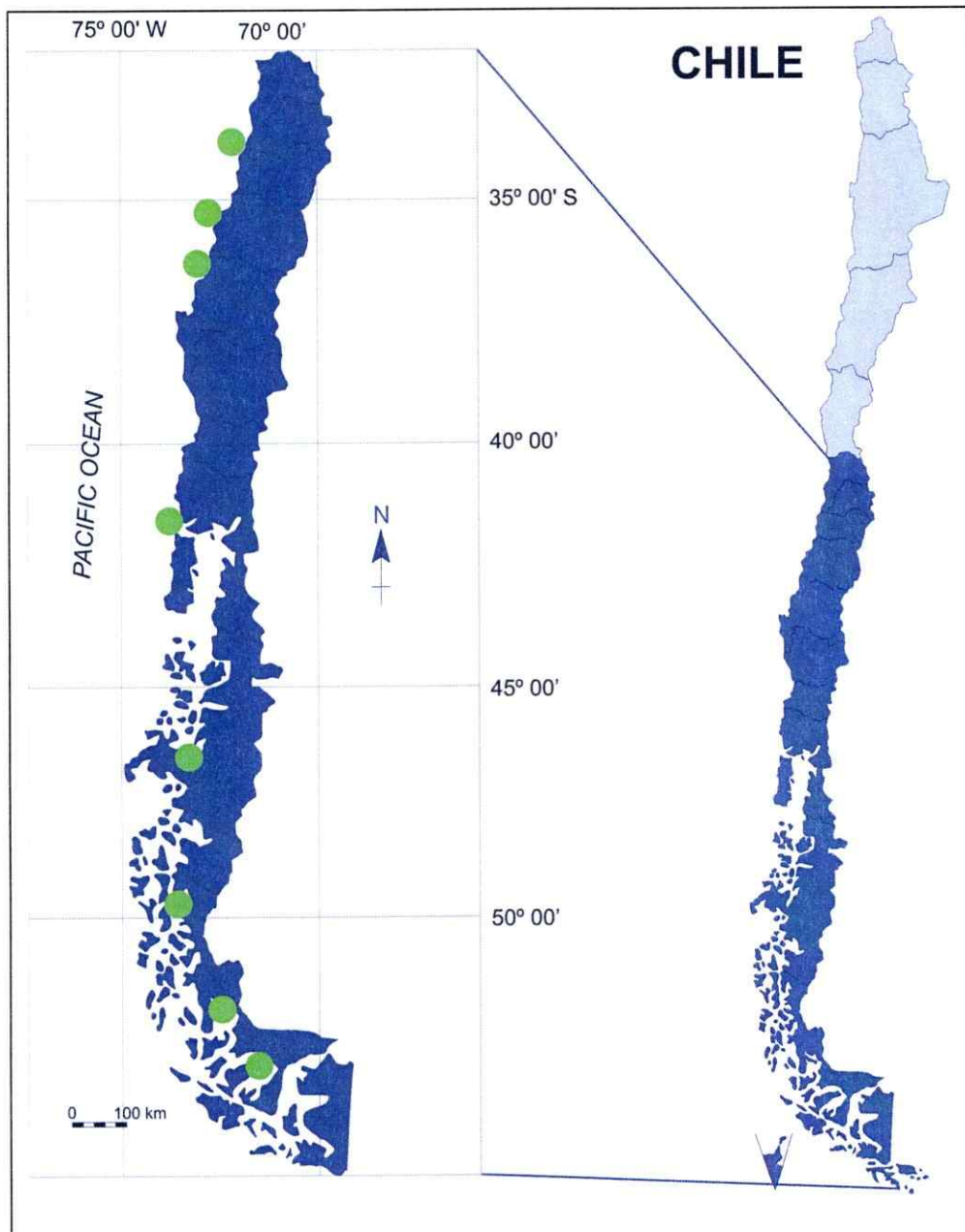


Figura 2. Localidades de muestreo para el delfín chileno, Chilean dolphin, *Cephalorhynchus eutropia*, a lo largo de la costa de Chile. Los círculos corresponden de Norte a Sur a: San Antonio, Constitución, Concepción, Maullín, Aysén, Bernardo O´Higgings, Puerto Natales y Punta Arenas.

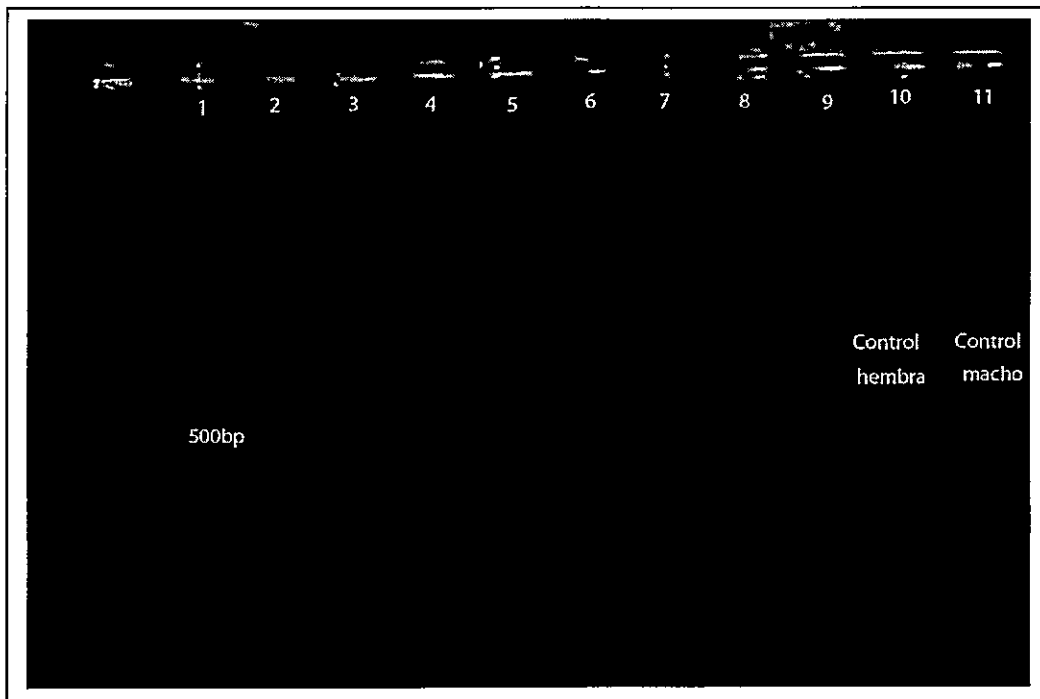


Figura 3. Gel de visualización sexaje *C. eutropia*. La obtención de dos bandas (445-224 bp) en el gel determina un individuo macho y de una banda (445bp) un individuo hembra.

### Análisis ADN mitocondrial

Las secuencias fueron editadas y alineadas en el programa PROSEQ 2.91 (Filatov 2002) y posteriormente, se realizó un test de confirmación de identificación de especie (Blast: Basic Local Alignment Search Tool) en Genebank y en DNA Surveillance (Ross *et al.* 2003).

La identificación de unidades poblacionales o clusters se realizó mediante el programa de análisis de estructuración poblacional espacial GENELAND (Guillot *et al.* 2009). Este programa utiliza un modelo estadístico de inferencia bayesiana en base a información de individuos georeferenciados en conjunto con el set de secuencias. Se utilizó el modelo no correlacionado de frecuencia alélica, con 1.000.000 de iteraciones MCMC y registros cada 100.

Posteriormente, las secuencias fueron divididas en las unidades poblacionales identificadas con el programa descrito anteriormente. Se estimaron los índices de diversidad genética como:

Número de haplotipos ( $k$ ), número de sitios polimórficos ( $S$ ), diversidad haplotípica ( $H$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) número de diferencias entre pares de secuencias ( $\pi$ ) para todo el set de secuencias y por unidad poblacional. Los análisis fueron realizados con el programa Dnasp (Librado & Rozas 2009). A fin de considerar las diferencias de muestreo entre áreas, los valores de riqueza haplotípica se ajustaron al tamaño muestral mediante rarefacción utilizando el programa PAST (Hammer *et al.* 2001). Se realizaron las pruebas de neutralidad de Tajima (1989) y  $F_u$ 's  $F_s$  (Fu 1997) mediante el programa Dnasp (Librado & Rozas 2009).

Las relaciones genealógicas entre haplotipos se analizaron mediante la construcción de una red de haplotipos mediante algoritmo median-joining en NETWORK 4.5.1.0 (Rohlf 2002). La diferenciación genética se evaluó mediante Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) en ARLEQUIN v.3.1.1. (Excoffier *et al.* 2005) considerando las 8 localidades de muestreo, agrupadas en los grupos (clusters) definidos por los programas de estructuración espacial. De esta manera se estimaron los índices de diferenciación genética poblacional  $\Phi_{st}$  (que considera distancia entre haplotipos) y  $F_{st}$  (que considera frecuencias haplotípicas). La presencia de estructura filogeográfica se analizó mediante el programa PERMUT (Petit *et al.* 2010), evaluando si  $NST \gg GST$  ( $\Phi_{st} \gg F_{st}$ ) mediante comparaciones de los valores de  $N_{st}$  estimados con aquellos obtenidos a través de 10.000 permutaciones. Dado que  $GST$  es una medida de la diferenciación genética entre poblaciones en base a diferencias en frecuencias haplotípicas, y  $NST$  considera la diferencia entre frecuencias haplotípicas junto con las diferencias filogenéticas entre haplotipos, un valor de  $NST$  superior, da cuenta de estructura filogeográfica.

Las variaciones demográficas de la especie tanto en el área de estudio total como en las unidades poblacionales identificadas, se realizó mediante la construcción de la distribución de diferencias entre pares de secuencias (Mismatch distribution; Rogers and Harpending 1992), evaluando el ajuste del modelo a los datos observados mediante el índice de ajuste

"Harpending's raggedness index" (Harpending 1994; Schneider and Excoffier 1999) implementado en el programa Dnasp 4.0 (Rozas *et al.* 2003). Un valor no significativo para este índice, indica que la población está en expansión (Harpending 1994). Cuando fuera pertinente, es decir, cuando los datos observados se ajustaran al modelo de expansión poblacional esperado, se estimaron los parámetros de expansión poblacional basados en los modelos de expansión (Rogers & Harpending, 1992). Para lo anterior se considera  $\tau = 2\mu t$  y se mide por unidades de tiempo evolutivo;  $\mu$  = tasa de mutación por secuencia por año y  $t$  = tiempo en años transcurrido desde la expansión.

Adicionalmente, para estimar la historia demográfica de la especie se utilizó el modelo basado en coalescencia "Bayesian Skyline Plot" implementado en el programa Beast (Drummond *et al.* 2007). Este método permite estimar la dinámica poblacional a través del tiempo, directamente desde el set de secuencias (Drummond *et al.* 2005), generando una distribución a posteriori del parámetro tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ) y estimación del tiempo del ancestro común más reciente (tMRCA) en las genealogías de coalescencia. Se analizó el set de datos bajo el modelo de reloj molecular estricto usando como tasa de mutación (1,5%) por millones de años (Ho *et al.* 2005) y el modelo de mutación HKY, estimado previamente con Mr Modeltest v.2.3.8 (Posada 2008). La convergencia de las cadenas MCMC se observaron mediante el programa Tracer v 1.5 (Rambaut & Drummond 2007), verificando visualmente los valores de tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ) obtenidos.

En base a los resultados de los análisis previamente descritos, se elaboraron escenarios demográficos históricos los cuales fueron puestos a prueba mediante el método ABC (Approximate Bayesian Computation, Beaumont *et al.* 2002). Para lo anterior, se utilizó como base los grupos (clusters) definidos anteriormente mediante programas espaciales de estructuración poblacional. Se comparó la probabilidad posterior de dos posibles escenarios de



diferenciación genética histórica para la especie. En el primer escenario "Refugio" se propone que la población de *C. eutropia* presente en el área Sur de su distribución (Canal de Chacao hacia el Sur) habría sido afectadas por el Último Máximo Glacial (UMG) reduciendo su tamaño poblacional y manteniéndose en áreas restringidas. Posteriormente, habría ocurrido una expansión poblacional, luego del retiro de los hielos. En el segundo escenario "Recolonización" se propone que durante el UMG, *C. eutropia* se encontraba exclusivamente en el área ubicada geográficamente al Norte del Canal de Chacao (Valparaíso- Puerto Montt, Zona Norte). La población de la Zona Sur se habría originado de manera posterior al retiro de los hielos, mediante una colonización postglacial proveniente de la Zona Norte, caracterizada por efectos fundadores y rápida expansión poblacional (Figura 4). Las probabilidades posteriores se estimaron mediante DIYABC (Cornuet *et al.* 2008) utilizando parámetros históricos, demográficos y mutacionales como insumos. Se consideró distribución uniforme de los datos, con información inicial para los parámetros demográficos (priors) de:  $N = 100-1000000$ ;  $t_2 = 5000-150000$ ;  $N_b = 1-1000$ ;  $t_3 = 50000-200000$  y  $t_1 = 3000-15000$ . Mediante regresión logística se comparó la máxima verosimilitud de ambos escenarios (Cornuet *et al.* 2008) y se estimó la probabilidad posterior de ajuste de cada modelo mediante la función "Confidence in scenario choice"

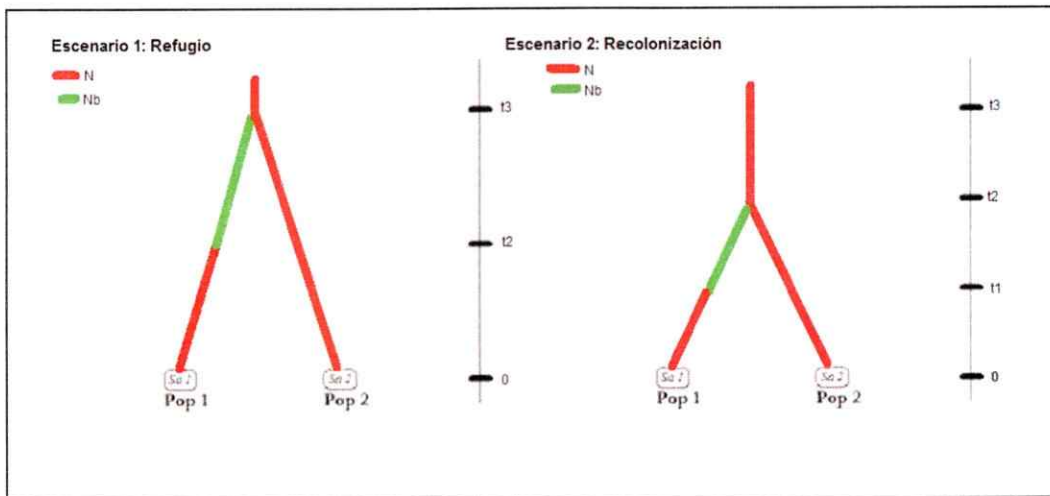


Figura 4. Escenarios demográfico-históricos propuestos para el delfín chileno a lo largo de su distribución. El escenario 1 corresponde al "modelo refugio" y el 2 al "modelo recolonización". N: Tamaño poblacional; Nb: Tamaño poblacional reducido (cuello de botella o efecto fundador); t3: Inicio glaciación; t2: Inicio desglaciación; t1: Durante fase de desglaciación.

## RESULTADOS

### *Identificación de unidades poblacionales*

Mediante el programa de estructuración poblacional espacial utilizado se identificaron dos unidades poblacionales (Figura 5). La unidad poblacional "Zona Boreal" está compuesta de (secuencias) individuos pertenecientes a las localidades ubicadas entre San Antonio y Concepción y la unidad poblacional "Zona Austral" de individuos pertenecientes a las localidades ubicadas entre Maullín y Punta Arenas (Figura 1). La probabilidad de membresía, o pertenencia de las localidades muestreadas a cada uno de los grupos identificados se muestra en la Figura 4. Es posible observar que las muestras pertenecientes a la Zona Boreal tienen la probabilidad más alta de pertenecer al grupo 1, y las muestras de la Zona Austral la de pertenecer al grupo 2.

### *Network*

Se definió un total de 14 haplotipos mediante 15 sitios polimórficos encontrados. El haplotipo más frecuente (H1, 31 muestras) fue el único haplotipo compartido entre las Zonas Boreal y Austral, aunque en diferentes frecuencias. Los haplotipos H3-H4-H7 presentaron frecuencias de 5-6 individuos, los haplotipos H2-H6-H10-H13, frecuencias de 2 a 3 individuos y los haplotipos únicos (H5-H8-H9-H11-H12-H14) se encontraron presentes en un solo individuo. La relación genealógica entre haplotipos y su frecuencia relativa se muestra en la Figura 5 y Tabla 1 respectivamente. Se observa que del haplotipo 1, haplotipo más frecuente, emergen haplotipos de baja frecuencia, separados por sólo un paso mutacional (H11, H9 y H10), generando una genealogía en forma de estrella, compuesta principalmente por individuos de la Zona Austral (color amarillo). Una genealogía más antigua se observa para los haplotipos de la Zona Boreal (verdes), los cuales se encuentran en su mayoría separados por más pasos mutacionales (Figura 6).

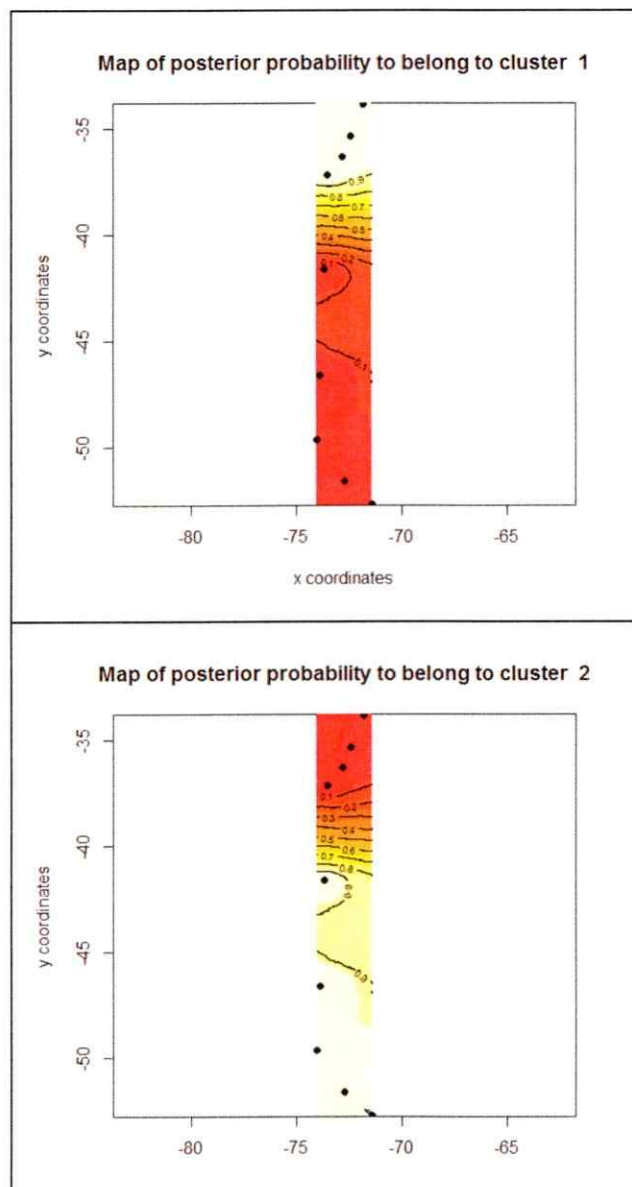


Figura 5. Probabilidad posterior de membresía o pertenencia y discontinuidad genética mediante el modelo espacial GENELAND para el delfín chileno a lo largo de su distribución. Las líneas indican la posición espacial de las discontinuidades genéticas y los colores más claros sugieren las probabilidades más altas de los individuos (localidades) de pertenecer a esa población. Se identificaron 2 poblaciones genéticas, el mapa superior representa la población ubicada en la Zona Boreal y el inferior el de la Zona Austral.

Tabla 1. Frecuencias haplotípicas de ADN Mitocondrial para *C. eutropia* en toda el área de estudio, Zona Austral y Boreal.

Haplotipos	Boreal	Austral	Total
H1	5	26	31
H2		3	3
H3	5		5
H4	6		6
H5	1		1
H6	3		3
H7		6	6
H8		1	1
H9		1	1
H10		2	2
H11		1	1
H12		1	1
H13	2		2
H14		1	1
Samples	22	42	64

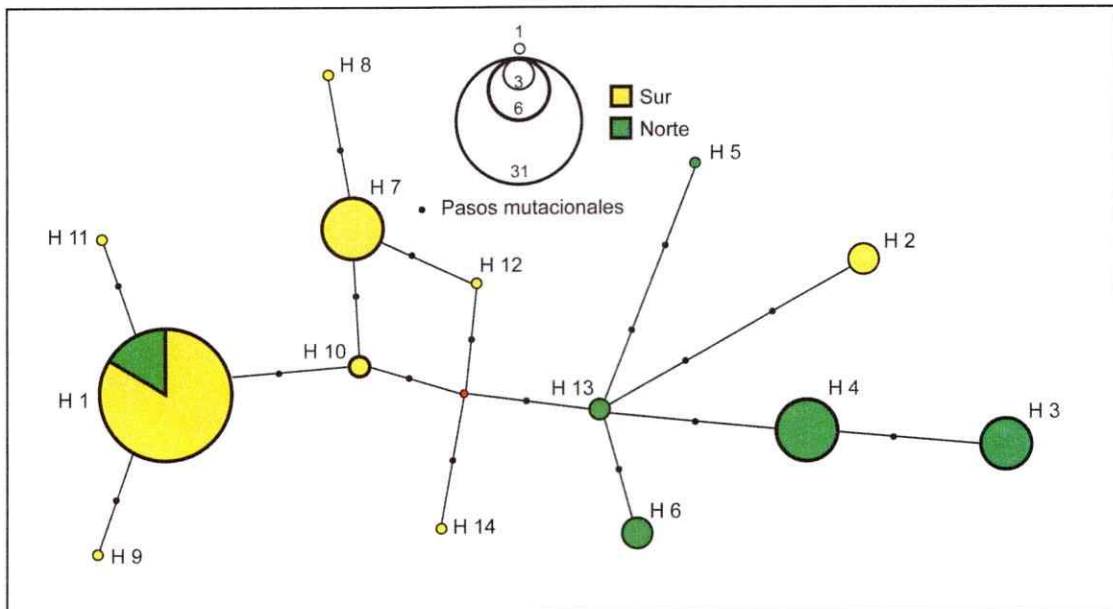


Figura 6. Red de haplotipos correspondiente a la región control de ADNmt de *C. eutropia* a lo largo de su distribución. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de individuos. La longitud de las líneas es proporcional al número de pasos mutacionales entre haplotipos. Verde: Zona Boreal y Amarillo: Zona Austral.

La diversidad haplotípica en el área de estudio completa fue de ( $h$ )  $0,75 \pm 0,053$  y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de  $0,38\% \pm 0,002$  (Tabla 2). Al considerar cada Zona por separado, la diversidad haplotípica fue mayor en el Área Boreal ( $0,83 \pm 0,034$ ) que Austral ( $0,57 \pm 0,086$ ;  $X^2=16,1$   $df=1$   $P=0,001$ ). La diversidad nucleotídica estimada fue de  $0,30\% \pm 0,002$  en la Zona Boreal y  $0,23\% \pm 0,001$  en la Zona Austral (Tabla 2). En relación a las pruebas de neutralidad de Fu's  $F_s$  y Tajima  $D$ , para ambas zonas se obtuvieron valores negativos y no significativos (Zona Boreal: Fu's  $F_s$  y Tajima  $D$ :  $-0,345$  ns y  $-0,41$ ns, respectivamente y Zona Austral:  $-2,499$  y  $-1,004$ , respectivamente).

Tabla 2. Diversidad genética (663 bp ADNmt de la región control) para el delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución. N: Número de muestras, Hap N: Número de haplotipos, Hap r: Número de haplotipos después de rarefacción, h: Diversidad haplotípica y  $\pi$ : Diversidad nucleotídica.

Localidad	DNAmT				
	N	Hap N	Hap r	$h \pm (SD)$	$\pi\% \pm (SD)$
Area Total	64	14		$0,75 \pm 0,053$	$0,38 \pm 0,002$
Boreal	19	6	6	$0,83 \pm 0,034$	$0,30 \pm 0,002$
Austral	45	9	$6,3 \pm 1,13$	$0,57 \pm 0,086$	$0,23 \pm 0,001$

El análisis molecular de Varianza (AMOVA) indica que el 53,4% y 24,1% de la variación estaría explicada por la variación entre grupos ( $\Phi_{ST} = 0,53$   $P = 0,012$  y  $F_{ST} = 0,24$   $P = 0,014$  respectivamente) (Tabla 3). La presencia de estructuración filogeográfica se avala con los resultados del programa PERMUT, obteniendo mayores valores para el índice  $\Phi_{ST}$  en relación al  $F_{ST}$  ( $N_{st} > G_{st}$ ;  $P = 0,0004$ ).

Tabla 3. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) considerando un total de 8 localidades de muestreo distribuidas en la Zona Boreal y Zona Austral a lo largo de la distribución del delfín chileno.

Fuente de Variación	Método distancia: Pairwise differences			Frecuencias haplotípicas		
	% Varianza	Índice	P	% Varianza	Índice	P
Entre grupos	53,42	$\Phi_{st}=0,53$	0,012	24,1	FST=0,24	0,014
Entre localidades dentro de los grupos	6,69	FSC=0,14	0,007	8,89	FSC=0,12	0,007

En cuanto a la distribución de diferencias pareadas entre secuencias (mismatch distribution), la curva construida con secuencias de individuos de la Zona Austral, fue la que presentó un mayor grado de ajuste al modelo de expansión esperado, obteniendo un Índice de ajuste de Raggedness de 0,19;  $p=0,40$ . Dado lo anterior, no se puede rechazar que los datos observados tengan una distribución similar a lo esperado por el modelo expansión. Por el contrario, la curva construida para la Zona Boreal, presentó Índice de ajuste de Raggedness de 0,18;  $p=0,025$  (Figura 7), rechazando en este caso, que los datos observados se ajusten a lo esperado por el modelo de expansión.

El valor de Tau para la Zona Austral fue de  $\tau = 0,32$ . Considerando una tasa de de mutación de 1,5% por millón de años (Ho *et al.* 2005), el comienzo de la expansión para la Zona Austral se estima en aproximadamente 16.000 años.

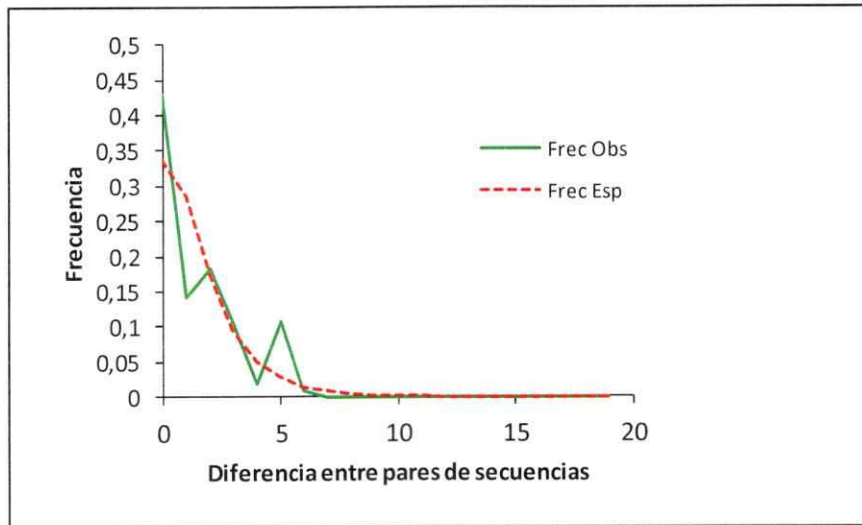


Figura 7. Distribución de diferencias entre pares de secuencias (Mismatch distribution) para secuencias de ADN Mitocondrial (Región control) de *Cephalorhynchus eutropia* para la Zona Austral.

Los análisis de Bayesian skyline plots de cada uno de los grupos genéticos mostraron que la población de delfín chileno de la Zona Boreal (Figura 8 superior) mantiene su tamaño poblacional constante en el tiempo entre 40.000 y 12.000 años atrás y luego se observa una tendencia al decrecimiento poblacional; en cambio la población de la Zona Austral, presenta un incremento poblacional iniciándose hace aproximadamente 11.000 años. El ancestro más reciente para ambas zonas es similar, estimándose aproximadamente hace 170.000 años.



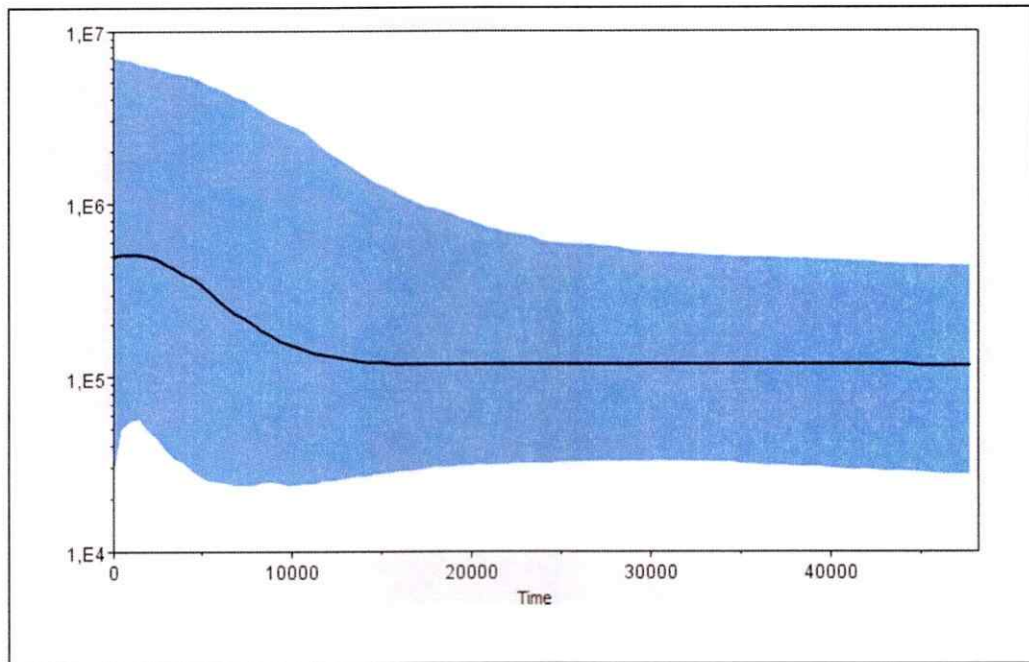
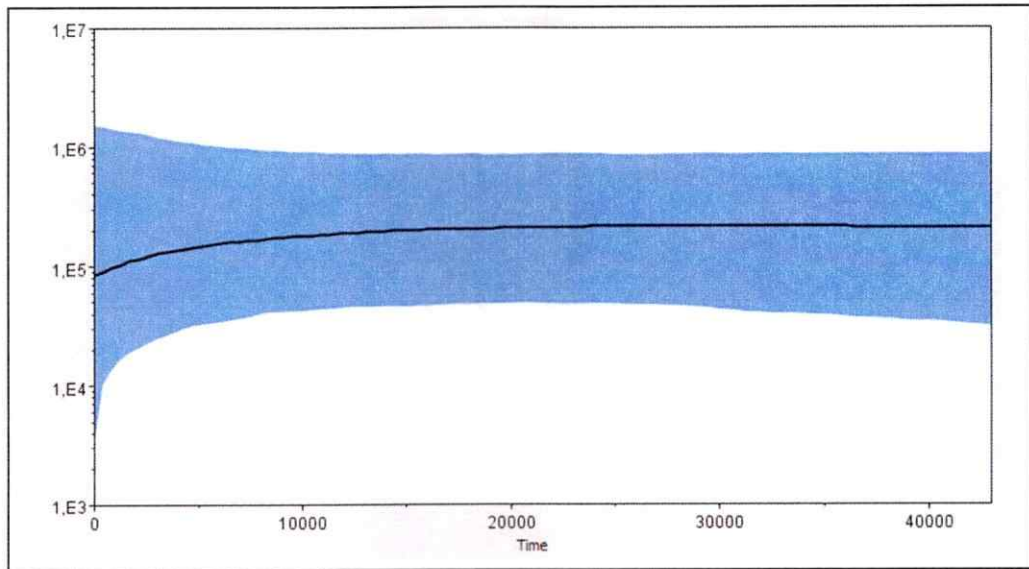


Figura 8. Bayesian skyline plot para la Zona Boreal (superior) y Austral (inferior) del delfín chileno a lo largo de su distribución.

El programa ABC (Approximate Bayesian Computation) discrimina entre los dos escenarios propuestos para la historia demográfica y estructura genética de *C eutropia* a lo largo de su distribución. Los resultados apoyan con la más alta probabilidad de ocurrencia el escenario 2 "Recolonización" (Figura 9 y 10) en el cual la población de delfín chileno de la Zona Sur se habría originado de manera posterior al retiro de los hielos, mediante una colonización postglacial proveniente de la Zona Norte, caracterizada por efectos fundadores y rápida expansión poblacional. El riesgo de equivocarse en rechazar el escenario 1 (refugio glacial), evaluado mediante las 500 simulaciones, fue de  $p=0,008$ . Los valores de los parámetros demográficos estimados para el escenario 2 corresponden a  $N= 46.000$  (39.000-57.000);  $N_b= 680$  (607-614);  $t_1= 16.300$  (9.230-9570);  $t_2= 17.000$  (11.500-11.000);  $t_3= 124.000$  (123.000-128.000).

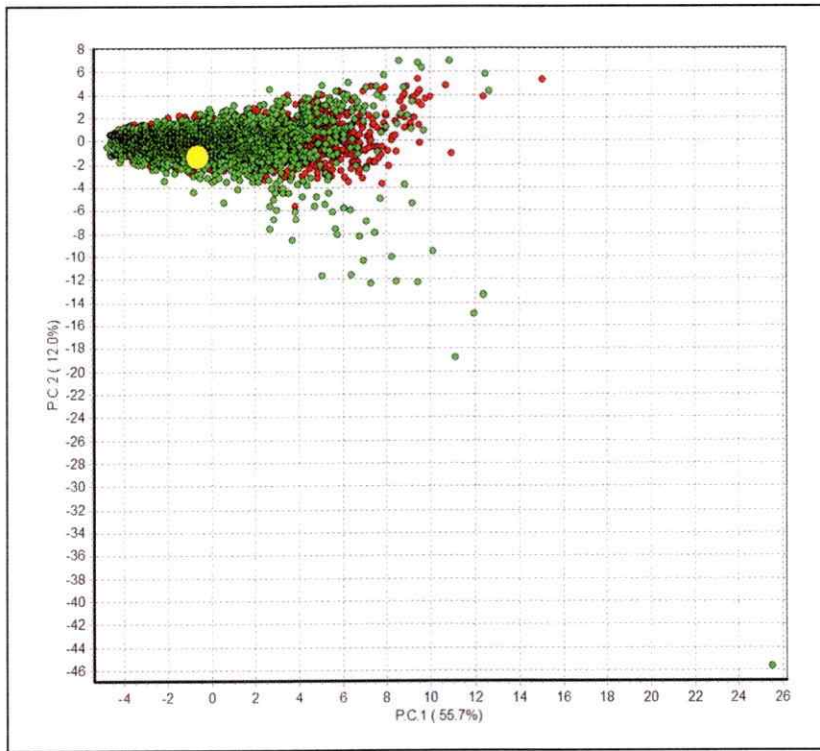


Figura 9. Análisis de componentes principales (PCA) sobre los dos escenarios demográfico-históricos propuestos para el delfín chileno a lo largo de su distribución. En color rojo se representa el Modelo Refugio y en verde el Modelo Recolonización. El color amarillo representa el set de datos observados.

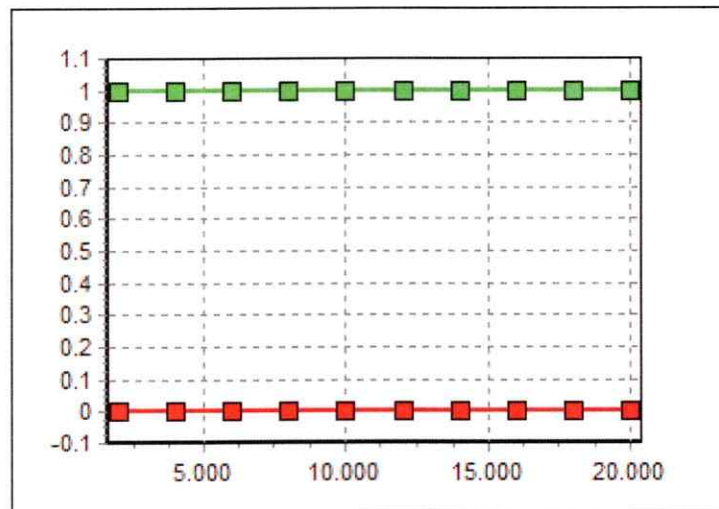


Figura 10. Selección de escenarios histórico-demográficos propuestos para el delfín chileno a lo largo de su distribución mediante regresión logística, programa DYABC. El color verde representa el escenario 2 "Modelo Recolonización" y el color rojo el escenario 1 "Modelo Refugio".

## DISCUSION

El presente estudio filogeográfico da cuenta de la contribución de los cambios climáticos pasados, particularmente el Último Máximo Glacial sobre los patrones de distribución, estructura poblacional y diversidad genética de *Cephalorhynchus eutropia*.

En términos generales, la diversidad haplotípica mitocondrial estimada para *Cephalorhynchus eutropia* a lo largo de su distribución se encuentra dentro del rango descrito para otras especies de delfines (*Lagenorhynchus albirostris* en el mar del Norte,  $0.7320 \pm 0.0031$ , Banguera-Hinestroza *et al.* 2010; *Tursiops truncatus* en el Atlántico Norte,  $h = 0,49 - 0,70$ , Rosel *et al.* 2009 y en el Golfo de México,  $h = 0,44 - 0,79$ , Sellas *et al.* 2005; y para *Delphinus delphis* en Australia,  $h = 0,35 - 0,95$ , Moller *et al.* 2011). De igual manera, valores similares de diversidad haplotípica han sido reportados para sus congéneres *C commersonii* en Argentina ( $h = 0,807$  Pimper *et al.* 2010) y *C hectori* en Nueva Zelanda ( $h = 0,846$  Hamner *et al.* 2012). En cambio, la diversidad nucleotídica obtenida ( $\pi = 0,0038$ ) para el delfín chileno es menor a la obtenida para especies como *Delphinus delphis* en Australia oriental ( $\pi = 0,004-0,008$ ; Moller *et al.* 2011), para *Tursiops truncatus* en el Golfo de México ( $\pi = 0,007-0,011$ ; Sellas *et al.* 2005) y para su congener *C hectori* ( $\pi = 0,0079$ , Hamner *et al.* 2012), pero similar a lo observado en poblaciones de cetáceos que históricamente presentan tamaños poblacionales reducidos o se han visto fuertemente afectados por actividades antrópicas (Bérubé *et al.* 1998, Natoli *et al.* 2006, Rosel *et al.* 2009, Banguera-Hinestroza *et al.* 2010, Pimper *et al.* 2010). En especies que han sido muy afectadas, los valores de diversidad nucleotídica pueden ser muy bajos, como se ha observado en una población aislada de *Phocoena phocoena* en el mar Negro ( $\pi = 0,0011$ ; Rosel *et al.* 1995) o inclusive llegar a  $\pi = 0,00001$  en *Phocoena sinus* (Rosel and Rojas-Bracho 1999) y en *Cephalorhynchus hectori maui* (Pichler y Baker 2000). Una baja diversidad nucleotídica es también esperable en poblaciones que han sufrido variaciones demográficas históricas, como una expansión poblacional después de un cuello de botella, frecuentemente asociada a los ciclos glaciales del Pleistoceno (*Lagenorhynchus albirostris*, Banguera-Hinestroza *et al.* 2010).

La distribución actual de *Cephalorhynchus eutropia* abarca dos áreas geográficamente distintas en relación al impacto de los ciclos glaciales: La zona norte (Valparaíso-Chiloé), conformada principalmente por costa expuesta, bahías y estuarios, la cual no ha sido afectada directamente durante los períodos glaciales y la zona ubicada más al sur (Chiloé-Isla Navarino), conformada principalmente por fiordos y canales que sí han sido perturbados reiterativamente durante los períodos glaciales. El presente estudio de la diversidad genética de la región control del ADMmt de *C. eutropia* muestra el efecto diferencial de los episodios glaciales en estas dos regiones cumpliendo con las predicciones del modelo Expansión-Constracción:

(1) Identifica dos unidades genéticas poblacionales divididas latitudinalmente (Zona Boreal y Zona Austral), las cuales corresponden de manera general con las áreas afectadas y no afectadas por los períodos glaciales. La separación de estas unidades es bastante marcada y su diferenciación genética poblacional es avalada con los valores de los Índices de diferenciación poblacional, donde consecuentemente los valores de  $\Phi_{ST}$  son superiores a los de  $F_{ST}$ , dando cuenta de un patrón de estructuración genético histórico (Chih-Horng and Avise 2005, Amaral 2010). El límite geográfico entre las dos unidades poblacionales coincide con la extensión del UMG puesto que la Zona Austral se encontraba cubierta por una extensa capa de hielo que se sumergía por el costado occidental de la isla de Chiloé al sur de los 43°S (Hulton *et al.* 2002, Rabassa & Cornato 2009).

(2) Al comparar los valores de diversidad para ambas zonas, se observa que la Zona Austral, área afectada por los ciclos glaciales, presenta los valores más bajos tanto de diversidad haplotípica como nucleotídica, y a su vez, la genealogía haplotípica de esta zona presenta un haplotipo dominante del cual emergen haplotipos de baja frecuencia. Esta forma de la genealogía, bajos niveles de diversidad genética y la presencia de un haplotipo dominante, son características propias de poblaciones que han experimentado expansión poblacional reciente

(Slatkin *et al.* 1991, Rogers & Harpending 1992). Lo anterior, sumado al ajuste de la distribución del número de diferencias entre pares de secuencias y a los parámetros del modelo demográfico de Rogers and Harpending (1992), avala una expansión poblacional para la Zona Austral. Por el contrario, la red de haplotipos obtenida para la Zona Boreal da cuenta de una genealogía más antigua, donde no se detecta un crecimiento poblacional reciente.

(3) La datación de expansión poblacional estimada en el presente estudio para la Zona Austral de *C. eutropia* según el modelo de expansión instantáneo (Rogers & Harpending, 1992) es de aproximadamente 15.000-16.000 años mientras el análisis bayesiano basado en coalescencia (Bayesian skyline plot) sugiere que la población de delfín chileno correspondiente a la Zona Austral presentó un patrón de estabilidad poblacional en el tiempo y un incremento poblacional que se inició aproximadamente 11.000 años atrás. Lo anterior es consecuente con la información cronológica de datación de ciclos glaciales reportada para estas latitudes, particularmente durante el Último Máximo Glacial. Temporalmente, en el límite norte de Patagonia Pacífica, el avance glacial data de hace 17.900 años y la desglaciación se habría iniciado hace aproximadamente 17.500 años (Moreno y León 2003), sincrónicamente a través de Patagonia (Hein *et al.* 2010). De manera similar, en el Estrecho de Magallanes, el avance glacial final ocurrió hace aproximadamente 17.000 años y el mayor y más rápido período de desglaciación se presentó entre 14.000 y 10.000 años (Hulton *et al.* 2002, Heusser 1998, McCulloch *et al.* 2005). El completo retiro de los hielos en el área de Tierra del Fuego y Canal Beagle data desde hace 11.600 años (Hein *et al.* 2010; Heusser *et al.* 1998, De Pol-Holz *et al.* 2006). La población de la Zona Boreal en cambio, habría mantenido su tamaño poblacional constante hasta hace 12.000 años, luego de lo cual se observa una tendencia, no significativa, de decrecimiento poblacional. Esta señal, posiblemente generada por una falta de haplotipos únicos que se observa en la población de la zona Boreal, podría reflejar una disminución actual de esta población relacionada con actividad antrópica.

Basándose en la estructura genética de *C. eutropia* y en los escenarios histórico-demográficos propuestos, el escenario de "Recolonización" aparece como el más probable. En este escenario se propone que durante el Último Máximo Glacial, *C. eutropia* se encontraba exclusivamente en el área ubicada geográficamente al Norte del Canal de Chacao (Valparaíso- Puerto Montt, Zona Boreal). La población actual de la Zona Austral se habría originado de manera posterior al retiro de los hielos, mediante una colonización postglacial proveniente de la Zona Norte, caracterizada por efectos fundadores y rápida expansión poblacional. Variaciones a nivel de productividad primaria, distribución de presas y disminución del ítem alimentario en la zona afectada por el UMG, podrían ser los potenciales factores que explicarían la ausencia de *C. eutropia* en la zona Austral durante el UMG. La importancia de estos factores en la conexión y aislamiento de poblaciones de cetáceos así como en episodios de expansión-contracción, ha sido identificada producto de cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno para diferentes especies (Costedoat *et al.* 2006; Harlin-Cognato *et al.* 2007, Banguera-Hinestroza *et al.* 2010, Pyneson *et al.* 2011, Weir *et al.* 2007). A diferencia de lo encontrado para el delfín chileno, un estudio realizado en el mamífero acuático *Lontra provocax* (Vianna *et al.* 2011) en similares latitudes, sugiere que para esta especie un escenario demográfico-histórico de persistencia en la región durante el UMG es el más plausible. Lo anterior basado principalmente en la ausencia de una genealogía haplotípica en forma de estrella, ausencia de señal de crecimiento poblacional para la zona y altos valores de diversidad genética observados en la zona afectada por los hielos. Según los autores la persistencia del huillín en la zona afectada por los hielos habría sido posible por la sobrevivencia de otras especies acuáticas y marinas que sirvieran de fuente alimentaria y/o producto de cambios en la dieta de la especie que le permitiera una posible adaptación al ambiente marino durante el UMG (Vianna *et al.* 2011).

De manera global, la distribución geográfica de las localidades de muestreo de delfín chileno correspondientes a ambas unidades genéticas poblacionales concuerda con las zonas afectadas

y no afectadas por los ciclos glaciales. Sin embargo, la localidad ubicada en el límite o zona de transición entre ambas unidades poblacionales (Maullín) pertenece a la población de la Zona Austral, aunque geográficamente se ubica en un área no afectada directamente por los hielos. Por lo tanto, y en estricto rigor, la separación de las unidades poblacionales Zona Boreal y Austral, no coincidiría exactamente con el límite norte de expansión glacial en el área. Lo anterior podría deberse a que (1) esta localidad de muestreo se ubica en un área periglacial, es decir, en una zona contigua a la extensión de la capa de hielo, donde los efectos de las variaciones climáticas producto de los ciclos glaciales afectan de manera igualmente intensa (Slaymaker 2011). De ser así, Maullín se habría visto afectada por el avance del UMG y *C. eutropia* no habría permanecido en esta zona; posteriormente, luego del retiro de los hielos, esta localidad habría sido una de las primeras zonas recolonizadas. Sin embargo, la presencia actual del delfín chileno en zonas próximas a glaciares como por ejemplo en la Laguna San Rafael (46°40S), indica la resistencia por parte de la especie a bajas temperaturas, permitiendo proponer una segunda hipótesis en la cual (2) las poblaciones de delfines presentes en la localidad de Maullín, ubicada en la zona de transición de ambas unidades genéticas poblacionales, habrían permanecido en la zona durante el UMG, siendo una de las localidades recolonizadoras de la Zona Austral post-retiro de los hielos y explicando así su cercanía genética con los grupos de las zonas recolonizadas. No obstante, es necesario considerar también que podría haber una sub-representación de los haplotipos de la Zona Boreal en la unidad muestral de Maullín, localidad ubicada en el límite o zona de transición entre ambas unidades poblacionales.

En resumen, el presente estudio contribuye al conocimiento de la historia demográfica de *Cephalorhynchus eutropia* en relación a las variaciones climáticas históricas, particularmente los ciclos glaciales pleistocénicos sobre los patrones de distribución, estructura poblacional y diversidad genética de la especie. Se propone que la distribución actual del delfín chileno se



ajusta al modelo biogeográfico de Expansión-Constracción y que las poblaciones ubicadas al sur del rango de distribución del delfín chileno, se habrían originado de manera posterior al retiro de los hielos, probablemente como resultado de un proceso de recolonización postglacial proveniente de las poblaciones ubicadas al norte, caracterizado por efectos fundadores y una rápida expansión poblacional. Considerando los resultados obtenidos y destacando que esta especie es uno de los sujetos de estudio de más difícil acceso, el presente estudio genético, el primero en esta especie, se considera un importante avance en el conocimiento del único delfín endémico de nuestro país y uno de los más desconocidos a nivel mundial. Esta investigación representa una importante contribución al estudio de la biogeografía histórica de los mamíferos marinos en el hemisferio sur y en particular en especies que se distribuyen en áreas afectadas directamente por los ciclos glaciales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aasen, E. Y Medrano, J. 1990 Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotech.* 8 (12):1279-81.
- Aguayo-Lobo, A. Torres, D. Y Acevedo, J. 1998. Los Mamíferos Marinos de Chile: I. Cetacea. *Ser. Cient. Inst. Antart. Chil.* 48: 19–159.
- Alexandrino, J. Froufe, E. Arntzen, J. Y Ferrand, N. 2000. Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Mol Ecol* 9: 771-781.
- Aljanabi, S. Y Martínez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* Vol. 25, No. 22:4692–4693.
- Amaral, A. Beheregaray, L. Bilgmann, K. Freitas, L. Robertson, K. Sequeira, M. Stockin. K. Coelho, M. Y Möller, L. 2010. A multilocus perspective on the worldwide population structure of common dolphins (*genus Delphinus*). *Int. Whal. Commn doc. SC/62/SM2*.
- Avise, J.C. (1992) Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*, 63, 62±76.
- Avise, J. Walker, D. Johns, G. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proc R Soc Lond* 265:1707–1712.
- Avise, J. 2005. Speciation. *Perspect. Bio. Med.* 48:315-316.
- Banguera-Hinestroza, A. Bjorge, J. Reid, P. Jepson Y Hoelzel, R. 2010. The influence of glacial epochs and habitat dependence on the diversity and phylogeography of a coastal dolphin species: *Lagenorhynchus albirostris*. *Cons.Genet* 11(5): 1823-1836.
- Beaumont, M. W, Zhang. I Balding, D. 2002. Approximate Bayesian Computation in Population Genetics. *Genet.* 162: 2025–2035.
- Berube, M. Aguilar, M. Dendanto, A. Larsen, D. Notarbartolo, F. Sears, D. Sigurjonsson, N. Urban, R. Palsbøll, P. 1998. Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balaenoptera physalus* Linnaeus 1758: analysis of mitochondrial and nuclear loci. *Mol Ecol* 7:585–599.
- Capella, J. Gibbons, J. Y Vilina, Y. 1999. Nuevos registros del delfín chileno, *Cephalorhynchus eutropia* (Gray, 1846) en Chile central, extremo norte de su distribución. *Est. Oceanol.* 18: 65–67.
- Ceballos, S. Lessa, E. Victorio, M. Fernández, D. 2012. Phylogeography of the sub-Antarctic notothenioid fish *Eleginops maclovinus*: evidence of population expansion. *Mar Biol*, 159:499–505.
- Chih-Horng, Y Avise,. 2005. Phylogeographic breaks in low-dispersal species: the emergence of concordance across gene trees. *Genet.*124: 179-186.

- Collin, R. Y. Mantenon, M. 2002. Integrative Approaches to Biogeography: Patterns and Processes on Land in the Sea: *Integr.Comp. Biol.* 42: 911-912.
- Cornuet, J. Santos, F. Beaumont, M. Robert Y C. Marin, J. 2008. Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinforma.*24: 2713–2719.
- Costedoat, C. Chapazz, R. Barascud, B. Guillard, O. Gilles, A. 2006. Heterogeneous colonization pattern of European cyprinids, as highlighted by the dace complex Teleostei: Cyprinidae. *MolPhylogenet Evol* 41:127–148.
- Dalebout, M. Robertson, K. Frantzis, A. Engelhaupt, D. Mignucci- Giannoni, A. Rosario-Delestre, R. Baker, C. 2005. Worldwide structure of mtDNA diversity among Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*): implications for threatened populations. *Mol Ecol* 14:3353–3371.
- Dawson, M. Y Jacobs, D. 2001. Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biol. Bull.* 200, 92-96.
- Dawson, S. 2002. *Cephalorynchus dolphins*. En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), *Encyclopedia of Marine Mammals*. pp 200-203. Academic Press, San Diego.
- De Pol-Holz, R. Ulloa, O. Dezileau, L. Kaiser, J. Lamy, F. Hebbeln, D. 2006. Melting of the Patagonian Ice Sheet and deglacial perturbations of the nitrogen cycle in the eastern South Pacific. *Geophys Res Lett* 33:L04704.
- Drummond, A. Rambaut, A. Shapiro, B. Pybus, O. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22: 1185–1192.
- Drummond, A. Rambaut, A. 2007.: BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees. *BMC Evol Biol* 7:214.
- Escribano, R. Fernández, M. Aranis, A. 2003. Physical-chemical processes and patterns of diversity of the Chilean eastern boundary pelagic and benthic marine ecosystem: An overview. *Gayana* 67, 190–205.
- Excoffier, L. Laval, G. Y Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinforma.* Online, 1: 47-50.
- Filatov, D. 2002. ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. Not.* 2, 621-624.
- Fraser, C. Thiel, M. Spencer, H. Waters, J. 2010. Contemporary habitat discontinuity and historic glacial ice drive genetic divergence in Chilean kelp. *BMC Evol Biol* 2010, 10:203.
- Fu, Y. 1997. Statistical neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genet.* 147:915–925.
- Gilson, A. Syvanen, M. Levine, K. Y Banks, J. 1998. Deer gender determination by polymerase chain reaction: Validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *Calif. Fish. Game* 84(4): 159-169.

- González-Wevar, C. Hune, M. Cañete, J. Mansilla, A. Nakano, T. Poulin, E. 2012. BMC Evol. Biol. 2012, 12:139.
- Goodall, R. 1994a. Chilean dolphin, *Cephalorhynchus eutropia* (Gray 1846). En: Ridgway SH, Harrison, R (eds) Handbook of Marine Mammals. San Diego, Academic Press. Pp. 269–287.
- Goodall RNP 1994b. Commerson's dolphin *Cephalorhynchus commersonii* (Lacepede 1804). En: Ridgway; S. Harrison, R (eds) Handbook of Marine Mammals. San Diego, Academic Press. Pp. 241–267.
- Goodall, R. Norris, K. Galeazzi, A. Oporto, J. Y Cameron, I. 1988. On the Chilean dolphin *Cephalorhynchus eutropia* Gray, 1846. Rep. Int. Whal. Commn, Special Issue 9: 197–257.
- Guillot, G. Leblois, R. Coulon, A. Y Frantz, A.. 2009. Statistical methods in spatial genetics. Mol. Ecol., 4734–4756.
- Hammer, O. Harper, O. Y Ryan, D. 2001. Past : Paleontological statistics Software package for education and data analysis. Paleontol. electron. vol 4 issue 1art 4: 9 pp.
- Hamner R, F Pichler, D Heimeier, R Constantine and C S Baker. 2012. Genetic differentiation and limited gene flow among fragmented populations of New Zealand endemic Hector's and Maui's dolphins. Cons. Genet. 13(4): 987-1002.
- Harlin, A. Wursig, B. Baker, C. Markowitz, T. 1999. Skin swabbing for genetic analysis: application to dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). Mar. Mamm. Sci. 15:409–425.
- Harlin-Cognato, A. Markowitz, T. Wursig, B. Honeycut, R. 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 Evol Biol 7:1–17.
- Harpending, R. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Hum Biol 66:591–600.
- Hein, A. Hulton, N. Dunai, T. Sugden, D. Kaplan, M. Xu, S. 2010. The chronology of the Last Glacial Maximum and deglacial events in central Argentine Patagonia. Quat Sci Rev, 9:1212–1227.
- Heusser, C. 1998. Deglacial paleoclimate of the American sector of the Southern Ocean: Late Glacial–Holocene records from the latitude of Canal Beagle (55°S), Argentine Tierra del Fuego. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol, 141:277–301.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405: 907–913.
- Hewitt, G. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. Biol J Linn Soc 58: 247–276.
- Hewitt, G. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. Biol. J. Linn. Soc, 68: 87–112
- Ho, S. Phillips, A. Cooper, A. Y Drummond, A. 2005. Time Dependency of Molecular Rate Estimates and Systematic Overestimation of Recent Divergence Times. Mol. Biol. Evol. 22(7):1561–1568.

- Hulton, N. Purves, R. McCulloch, R. Sugden, D. Bentley, M. 2002. The Last Glacial maximum and deglaciation in southern South America. *Quat Sci Rev* 21:233–241.
- Knowles, L. 2001. Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of explicit refugial models in montane grasshoppers. *Mol Ecol*, 10, 691-701.
- Krutzen, M. Barre, L. Moller, L. Heithaus, M. Simms, R. Sherwin, C. 2002: A biopsy system for small cetaceans: darting success and wound healing in *Tursiops* sp. *Mar. Mamm. Sci.* 18: 863-878.
- LeDuc, R. 2002. Biogeography. En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), *Encyclopedia of Marine Mammals*. pp 99-102. Academic Press, San Diego.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinforma.* 25: 1451-1452.
- Lowell, T. Heusser, C. Andersen, C. Moreno, P. Hauser, A. Heusser, P. Schluchter, C. Marchant, D. Denton, G. 1995. Interhemispheric correlation of late Pleistocene glacial events. *Science* 269: 1541–9.
- McCulloch, R. Fogwill, C. Sugden, D. Bentley, M. Kubik, P. 2005. Chronology of the last glaciation in Central Strait of Magellan and Bahía Inútil, Southernmost South America. *Geogr Ann* 2005, 87:1–24.
- Möller, L. Valdez, L. Allen, F. Bilgmann, S. Corrigan, K. Y Beheregaray, L. 2011. Fine-scale genetic structure in short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) along the East Australian Current. *Mar. Biol.* 158 (1). pp. 113-126.
- Moreno Y Leon. 2003. Abrupt vegetation changes during the last glacial to Holocene transition in mid-latitude South America. *J. Quater. Sci.* 18(8): 787-800
- Natoli, A. Cañadas, A. Peddemors, V. Aguilar, A. Vaquero, C. Fernández-Piqueras; Y. Y Hoelzel. 2006. Phylogeography and alpha taxonomy of the common dolphin (*Delphinus* sp.). *J. Evol. Biol* 19: 943-954.
- O’Corry-Crowe, G. Suydam, R. Rosenberg, A. Forst J. Y Dizon E. 1997. Phylogeography, population structure and dispersal pattern of the beluga whale, *Delphinapterus leucas*, in the western nearctic revealed by mitochondrial DNA. *Mol Ecol* 6, 955-970.
- Pérez-Alvarez, MJ, Alvarez, E. Aguayo-Lobo, A Y Olavarría, C. 2007. Occurrence and distribution of Chilean dolphin, *Cephalorhynchus eutropia*, in coastal waters of central Chile. *New N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 41: 405-409.
- Petit, R.J. 2010. PERMUT version 2.0 Readme [Documentation file]. Available with the program’s installation files at <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/PermutCpSSR/index.html>.
- Pichler, F. Baker, C. 2000. Loss of genetic diversity in the endemic Hector’s dolphin due to fisheries-related mortality. *Proc R Soc Lond B* 267:97–102.
- Pichler, F. Robineau, D. Goodall, N. Meyer, N. Olavarría, C. Y Baker, S. 2001. Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). *Mol Ecol* 10, 2215-2223.

- Pimper, L Baker, C. Goodall, N. Olavarría, Y Remis, M. 2010. Mitochondrial DNA variation and population structure of Commerson's dolphins (*Cephalorhynchus commersonii*) in their southernmost distribution. *Cons. Genet.* 11(6):2157-2168.
- Posada D .2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.*, 25, 1253-1256.
- Provan, J. Bennett, K. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends Ecol Evol*, 23:564–571.
- Pyenson, N. Lindberg, D. 2011. What Happened to Gray Whales during the Pleistocene? The Ecological Impact of Sea-Level Change on Benthic Feeding Areas in the North Pacific Ocean. *PLoS ONE* 6(7): e21295. doi:10.1371/journal.pone.0021295.
- Rabassa, J, Y Clapperton, C. 1990. Quaternary glaciations of the Southern Andes. *Quat. Sci.Rev.* 9: 153-174.
- Rabassa, J. Y Coronato, A. 2009. Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego during the Ensenadan Stage/Age (Early Pleistocene–earliest Middle Pleistocene). *Quat. Int.* 210 (1-2): 18-36.
- Rabassa, J. Coronato, A, Y Salemme, M. 2005. Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *J. S. Am. Earth Sci.* 20: 81-103.
- Rambaut, A. Drummond, A. 2010. TreeAnnotator v.1.6.1. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/TreeAnnotator>.
- Rogers. Y Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552–569.
- Röhl A. 2002. Network, netw3111.exe downloaded in the web site: [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com).
- Ross, H. Lento, G. Balebout, M. Goode, M. Ewing, G. McLaren, P. Rodrigo, S. Lavery, S. Y Baker, C. 2003. DNA Surveillance: Web-Based Molecular Identification of Whales, Dolphins, and Porpoises *J. Hered.* 94(2):111–114.
- Rosel P, M Haygood y W Perrin. 1995. Phylogenetic Relationship among True Porpoises (Cetacea: Phocoenidae). *Mol. Phyl. Evol.* 4 (4): 463-474.
- Rosel, P. Y Rojas-Bracho, L. 1999. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita, *Phocoena sinus*. *Mar. Mamm. Sci.* 15(4): 990-1003.
- Rosel, P. Hansen, L. Hohn, A. 2009. Restricted dispersal in a continuously distributed marine species: common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in coastal waters of the western North Atlantic. *Mol Ecol* 18:5030–5045.
- Rozas, J. Sánchez-DelBarrio; C. Y Rozas, M. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analices by the coalescent and other methods. *Bioinformat.* 19: 2496-2497.

- Sánchez, R. Sepúlveda, R. Brante, R. Cárdenas, L. 2011. Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: Mollusca). *Mar Ecol Prog Ser* , 434:121–131.
- Schneider, S. Y Excoffier, L. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genet.* 152:1079–1089.
- Sellas, A. Wells, Y Rosel N. 2005. Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal fine scale geographic structure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Gulf of Mexico. *Cons. Genet.* 6 : 715-728.
- Slaymaker O.2011. Criteria to distinguish between periglacial, proglacial and paraglacial environments. *Quaest. Geo.* 30(1): 85–94.
- Slatkin, M. Hudson, R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genet.* 129:555–562.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genet.* 123:597–601.
- Vianna, J. Medina-Vogel, G. Chehebar, C. Sielfeld, W. Olavarria, C. Faugeron, S.. 2011. Phylogeography of the Patagonian otter *Lontra provocax*: adaptive divergence to marine habitat or signature of southern glacial refugia? *BMC Evol. Biol.* 2011, 11:53.
- Weir, C. Stockin K. Pierce, G. 2007. Spatial and temporal trends in the distribution of harbour porpoises, white-beaked dolphins and minke whales off Aberdeenshire UK, north-western NorthSea. *J Mar Biol* 87:327–338.
- Yañez, P 1948. Vertebrados marinos chilenos. I. Mamíferos. *Rev. biol. mar. oceanogr. Valparaíso* 1(2): 103–123.
- Zemlak, T. Habit, E. Walde, S. Carrea, C. Ruzzante, D. 2010. Surviving historical Patagonian landscapes and climate: molecular insights from *Galaxias maculatus*. *BMC Evol Biol*, 10:67.

## DISCUSIÓN GENERAL

El presente estudio da cuenta de la variación geográfica latitudinal en caracteres morfológicos y moleculares, así como de la estructuración genética de una especie altamente móvil, en un ambiente que no presenta barreras geográficas evidentes como es el ambiente marino a lo largo de la costa de Chile entre Valparaíso y Punta Arenas. Adicionalmente analiza la contribución de los ciclos glaciales, particularmente el Último Máximo Glacial sobre los patrones de distribución, estructura poblacional y diversidad genética de la especie.

### *Identificación unidades poblacionales Norte y Sur con caracteres moleculares y morfológicos*

Mediante análisis de marcadores moleculares (microsatélites y ADN mitocondrial) se identifican dos unidades genéticas poblacionales para la especie (Norte y Sur), las cuales presentan índices de estructuración poblacional altos y significativos, indicando que ambas poblaciones tendrían un limitado o inexistente flujo génico. Las poblaciones Norte y Sur de delfín chileno se condicen con dos zonas biogeográficas marinas descritas para la zona, las cuales presentan diferencias topográficas, oceanográficas y biológicas. Estas unidades corresponden al área ubicada entre los 30° S to 42° S, denominada Zona Intermedia o Central y al área de Fiordos Australes ubicada entre los 42° S to 56° S (Camus 2001, Escribano *et al.* 2003). El mismo patrón de agrupaciones (Norte y Sur) a nivel latitudinal, se obtuvo en base a caracteres de morfometría craneal, en el cual variables craneométricas funcionales relacionadas con ancho parietal, largo del rostro, altura de la cresta supraoccipital, ancho del premaxilar y presencia de fosas ventrales anexas al canal óptico, diferenciaron significativamente las dos agrupaciones Norte y Sur. En este sentido se registran mayores valores en las estructuras relacionadas con el desarrollo de ecolocalización y especialización trófica hacia presas de mayor tamaño en los individuos provenientes de las



Zona Norte, y un mayor desarrollo de las fosas ventrales y órbita ocular en los individuos provenientes de la Zona Sur. Lo anterior es concordante con la preferencia de la especie por hábitats estuarinos de menor visibilidad, en conjunto con ítems presa de mayor tamaño descritos para la especie en la Zona Norte en relación a la Zona Sur. En base a lo anterior, se propone que este patrón de diferenciación geográfica podría ser producto de adaptaciones a los diferentes ambientes.

De manera similar, un fuerte patrón de estructuración con diferencias a nivel genético y morfométrico ha sido reportado para el congener endémico de Nueva Zelanda, *Cephalorhynchus hectori*, entre las Islas Norte y Sur. En este caso, dos subespecies (*C. hectori maui* para la Isla del Norte y *C. hectori hectori* para la Isla del Sur) han sido reconocidas (Baker *et al.* 2002). El estudio morfológico en *C. hectori* se realizó sobre las unidades poblacionales ya diferenciadas a nivel genético y las medidas craneométricas que más contribuyeron a la diferenciación de la población de la Isla del Norte v/s la Isla del Sur concuerdan con las identificadas como importantes para la diferenciación Norte/Sur del delfín chileno en el presente estudio. En este contexto, y de acuerdo con Westage (2007) se plantea que dada la compleja interdependencia entre la función y anatomía del cráneo, variaciones craneales ocurrirían solo en presencia de una presión selectiva diferencial y aislamiento reproductivo.

#### *Variación geográfica a escala reducida. Caracteres moleculares, morfológicos y ecología trófica*

Por otra parte, en un análisis de variación a escala geográfica más reducida los resultados de estructuración poblacional a nivel mitocondrial (AMOVA) sugieren un significativo nivel de diferenciación intra-poblacional (entre localidades dentro de la Zona Norte y entre localidades dentro de la Zona Sur; FSC: 0,14 p= 0,007 y FSC: 0,12 p= 0,007), lo que concuerda con el patrón de ordenación de los individuos por localidad obtenidos de análisis craneométricos reportados en el plano factorial de Componentes Principales 1 y 2 (Figura 6, Capítulo 2), y con

los resultados preliminares de aproximación dietaria (isótopos estables) realizados a individuos de distintas localidades que sugieren que no habría una superposición trófica entre localidades. Así, los resultados (moleculares, morfométricos y aproximación trófica) sugieren una tendencia a la diferenciación y estructuración a escala geográfica reducida de los individuos, ilustrando rasgos de desplazamientos reducidos y conductas filopátricas de la especie, tal como ha sido descrito para las distintas especies del género *Cephalorhynchus* (Dawson *et al.* 2002).

#### *Asociación variables morfométricas y ambientales*

En relación a la asociación entre variables craneométricas y variables ambientales y geográficas como la Temperatura y la Latitud, se obtiene que considerando las medidas EXNR, RL y PW como proxy de tamaño corporal, el patrón con gradiente latitudinal es contrario a lo propuesto por la regla de Bergman (similar a otros estudios de odontocetos, Ramos *et al.* 2002, Molina-Schiller 2006 y carnívoros, Meiri *et al.* 2007), puesto que medidas asociadas a tamaño estarían disminuyendo con la Latitud y a medida que la Temperatura decrece. Sin embargo estaría potencialmente acorde a lo a la Hipótesis de Productividad propuesta por Rosenzweig (1968) dado que el patrón craneométrico en gradiente latitudinal encontrado para las medidas EXNRT-RL-PW en *C. eutropia* presentaron mayores valores en zonas de mayor productividad, destacando las zonas de surgencia de la costa central de Chile y los principales sitios de desembarques pesqueros asociados a localidades en latitudes intermedias (ver Discusión Capítulo 2). Esta asociación positiva sugiere el importante rol de la productividad primaria en el tamaño corporal (tal como ha sido encontrado en otros estudios Yom-Tov *et al.* 2003, Meiri *et al.* 2007, Blois *et al.* 2008, Sepúlveda *et al.* 2013) indicando que la temperatura no es el único factor involucrado (Yom-Tov *et al.* 2003).

### *Contribución ciclos glaciales con distribución actual, estructura poblacional y diversidad genética*

La señal genética proveniente de ADN mitocondrial (región control) da cuenta de una menor diversidad (haplotípica y nucleotídica) para la Zona Austral que para la Zona Boreal. Lo anterior sumado a que la genealogía haplotípica de la Zona Austral se caracteriza por la presencia de un haplotipo dominante del cual emergen haplotipos de baja frecuencia y a que la distribución de diferencias entre pares de secuencias se ajusta al modelo de expansión poblacional (Rogers & Harpending, 1992), sugiere una expansión poblacional reciente para esta zona estimada hace aproximadamente 11.000-16.000 años. Lo anterior es consecuente con la información cronológica de datación de ciclos glaciales reportada para estas latitudes, particularmente durante el Último Máximo Glacial (ver Discusión Capítulo 3). Por tanto, se propone que la distribución actual del delfín chileno se ajusta al modelo biogeográfico de Expansión-Contracción y que las poblaciones ubicadas al sur de su rango de distribución se habrían originado de manera posterior al retiro de los hielos, probablemente como resultado de un proceso de recolonización postglacial proveniente de las poblaciones ubicadas al norte, caracterizado por efectos fundadores y una rápida expansión poblacional.

De manera similar se ha visto en otros estudios que las variaciones climáticas asociadas a los ciclos glaciales del Pleistoceno han influido directamente en los patrones de distribución, diversidad y estructura genética de diferentes taxa (McCarty 2001, Marshall *et al.* 2008) y reconstrucciones demográficas basadas en información molecular han demostrado que estas fluctuaciones se relacionan con episodios de expansión-contracción poblacional (Marko *et al.* 2010, Hewitt *et al.* 2004, Provan y Bennett 2008, Lessa *et al.* 2003, Maggs *et al.* 2008). Modelos de genética tradicional de refugios glaciales y rutas de recolonización consideran como predicción, una baja diversidad genética en áreas cubiertas por el hielo (lo que concuerda con los resultados del presente estudio), con un bajo número de haplotipos dominantes, y mayor diversidad en refugios glaciales (Hewitt 2000, Provan & Bennett 2008, Maggs *et al.* 2008).

### *Implicancias en conservación*

En base a los resultados, se propone el establecimiento de dos Unidades de Manejo (Mortiz 1994) para el delfín chileno *Cephalorhynchus eutropia* que corresponden a las unidades poblacionales Norte y Sur identificadas. Estas unidades tienen un fin operacional y han sido definidas para poblaciones que si bien, no corresponden a grupos monofiléticos, están conectadas por un limitado flujo génico que les permite ser funcionalmente independientes. Aun cuando estas dos agrupaciones presentan una marcada diferenciación y estructura filogeográfica en los caracteres analizados, es necesario desarrollar futuros estudios que incrementen el tamaño muestral, integren las herramientas moleculares, morfológicas y de ecología trófica, y permitan analizar con un mayor grado de resolución el nivel de diferenciación y adaptación a los diferentes ambientes que presenten

La determinación taxonómica a nivel de subespecie en el congéner *Cephalorhynchus eutropia*, endémico de Nueva Zelanda, *C. hectori* (*C. hectori hectori* para la Isla del Norte y *C. hectori maui* para la Isla del Sur), se realizó en base a patrones de diferenciación molecular y morfológico (Baker *et al* 2002). En este caso, y a diferencia de la situación en el delfín chileno, la presencia de una barrera geográfica (Estrecho de Cook), favorecería el proceso de diferenciación en alopatria. En el caso de *C. eutropia* estaríamos potencialmente frente a un proceso de diferenciación parapátrica, donde los caracteres conductuales, biológicos y de adaptación a distintos ambientes cumplirían un papel fundamental. La marcada diferenciación encontrada entre las dos poblaciones de *C. eutropia*, avalan la propuesta de Unidades de Manejo diferentes con estrategias de conservación independientes, de similar manera a como se ha realizado para *C. hectori hectori* y *C. hectori maui*.

La principal contribución de este estudio radica en el aporte de información relacionada con procesos de estructuración y diferenciación poblacional en especies móviles, en ambientes aparente homogéneos y sin evidentes barreras geográficas. Por ello se ha realizado en un

modelo de estudio de distribución continua a lo largo de dos regiones biogeográficas marinas que presentan diferencias topográficas, ecológicas y ambientales. Cabe destacar el logro alcanzado en trabajar con una especie de muy difícil acceso como es del delfín chileno, siendo uno de las especies de la familia Delphinidae menos conocida a nivel mundial (Jefferson *et al.* 1993), siendo catalogada como "Data Deficient; Datos Insuficientes" (DD; IUCN 2006) y que actualmente se encuentra en la categoría de "Near Threatened; Casi Amenazada (NT; IUCN 2013) dado el reducido tamaño poblacional estimado y la escasa información existente. Sin duda, es necesario y prioridad contar con mayor información de la especie, destacando la necesidad de realizar estimaciones de abundancia poblacional a lo largo de todo su rango de distribución, aumentar el muestreo genético, sobre todo en el área limítrofe entre ambas poblaciones identificadas, así como también ampliar el estudio integrado con herramientas moleculares, morfométricas y de ecología trófica. Adicionalmente es necesario dentro del foco de estrategias de conservación, identificar las amenazas actuales existentes para la especie así como generar protocolos de mitigación de impactos.

#### *Hipótesis de Trabajo-Predicciones*

Por tanto, en base a los resultados obtenidos en el presente estudio no existiría evidencia para rechazar las Hipótesis de trabajo planteadas inicialmente, así como sus respectivas predicciones. Las Hipótesis planteadas dicen relación con (1) la presencia de variación geográfica del delfín chileno a lo largo de su distribución, tanto en caracteres moleculares como morfométricos y (2) el aporte de las variaciones climáticas, en particular del Último Máximo Glacial en el patrón de distribución actual, estructura poblacional y diversidad genética de la especie.

## BIBLIOGRAFÍA

- Baker, A. Smith, A. Pichler, F. 2002. Geographical variation in Hector's dolphin: recognition of new subspecies of *Cephalorhynchus hectori*. J. R. Soc. N. Z. 32 (4): 713-727.
- Blois, J.L. Feranec, R.S. Hadly, E.A. 2008. Environmental influences on spatial and temporal patterns of body-size variation in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). J. Biogeogr. 35: 602-613.
- Camus, P.A. 2001. Biogeografía marina de Chile continental. Rev. Chil. Hist. Nat. 74: 587-617.
- Dawson, S. 2002. *Cephalorhynchus dolphins*. En W.F. Perrin B. Würsig y J.G.M. Thewissen (eds), Encyclopedia of Marine Mammals. pp 200-203. Academic Press, San Diego.
- Escribano, R. Fernández, M. Aranís, A. 2003. Physical-chemical processes and patterns of diversity of the Chilean eastern boundary pelagic and benthic marine ecosystem: An overview. Gayana 67: 190-205.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405: 907-913.
- Hewitt, G. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 359: 183-195.
- Jefferson, T. Leatherwood, S. Webber, M. 1993. FAO species identification guide. Marine mammals of the world. 320pp. FAO, Rome.
- Lessa, E. Cook, J. Patton, J. 2003. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late Quaternary. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100: 10331-10334.
- Maggs, C. Castihlo, R. Foltz, D. Henzler, C. Jolly, M. Kelly, J. Olsen, J. Perez, K. Stam, W. Vainöla, R. Viard, F. Wares, J. 2008. Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. Ecology 89: S108-S122.
- Marko, P. Hoffman, J. Emme, S. McGovern, T. Keever, C. Cox, N. 2010. The "Expansion-Contraction" model of Pleistocene biogeography: rocky shores suffer a sea change?. Mol. Ecol. 19: 146-169.
- Marshall, J. Blair, J. Peters, D. Okin, G. Rango, A. Williams, M. 2008. Predicting and understanding ecosystem responses to climate change at continental scales. Front. Ecol. Environ. 6: 273-280.
- McCarty, J. 2001. Ecological consequences of recent climate change. Conserv. Biol. 15: 320-331.
- Meiri, S. Yom-Tov, Y. Geffen, E. 2007. What determines conformity to Bergmann's rule?. Glob. Ecol. Biogeogr. 16: 788-794.

Molina-Schiller, D. 2006. Variacao Geografica do boto de Burmeister, *Phocoena spinipinni*, (Burmeister 1865) (Cetacea: Phocoenoide) nas costa Atlantica e Pacifica da America do Sul. Universidade Federale do Rio Grande do Sul. 223pp.

Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. Trends Ecol. Evol. 9: 373-375.)

Provan, J. Bennett, K. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. Trends Ecol. Evol. 23: 564-571.

Ramos, R. Beneditto, A. Siciliano, S. Santos, M. Zerbini, A. Bertozzi, C. Vicente, A. Zampirolli, E. Alvarenga, F. Lima, N. 2002. Morphology of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) off Southeastern Brazil: Sexual Dimorphism, Growth and Geographic Variation. Lajam 1 (1): 129-144.

Rosenzweig, M.L. 1968. The strategy of body size in mammalian carnivores. Am. Midl. Nat. 80: 299-315.

Sepúlveda, M. Oliva, D. Duran, R. Urra, A. Pedraza, S. Majluf, P. Goodall, N. Crespo, E. 2013. Testing Bergmann's rule and the Rosenzweig hypothesis with craniometric studies of the South American sea lion. Oecología 171 (4): 809-17.

Westgate, A. 2007. Geographic Variation in Cranial Morphology of Short-beaked Common Dolphins (*Delphinus delphis*) from the North Atlantic. J. Mammal. 88 (3): 678-688.

Yom-Tov, Y. Yom-Tov, S. Baagoe, H. 2003. Increase of skull size in the red fox (*Vulpes vulpes*) and Eurasian badger (*Meles meles*) in Denmark during the twentieth century: an effect of improved diet?. Evol. Ecol. Res. 5: 1037-1048.