

Universidad de Murcia

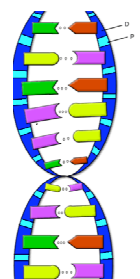
Facultad de Veterinaria
Departamento de Zoología y Antropología física
Área de Biología animal

Bienio 2004-2006
Programa de doctorado
“BIODIVERSIDAD Y GESTIÓN AMBIENTAL”
Coordinador: profesor José Galián Albaladejo

MEMORIA DE SUFICIENCIA INVESTIGADORA

presentada el día 24 de julio del 2006 en la Universidad de Murcia por

Vincent Bourret
alumno de doctorado de la Universidad de Murcia
Tutor: profesor José Galián Albaladejo



Tercera parte

Periodo de investigación: curso académico 2005-2006

Estructura genética de las poblaciones de delfines listados en el Mediterráneo occidental y el Atlántico norte: análisis de microsatélites

INTRODUCCIÓN

El delfín listado

El delfín listado *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833; figura 1) es un cetáceo que mide alrededor de dos metros de longitud cuando es adulto, y cuyo peso puede superar los 100 kg. Puede ser identificado morfológicamente por un motivo claro “en bufanda” que sube hacia la aleta dorsal, y por una “lista” negra que empieza detrás del ojo.

La posición taxonómica del delfín listado es la siguiente (según Berta et al., 2006):

clase: Mammalia, infra-clase: Eutheria, orden: Cetacea, infra-orden: Odontoceti, familia: Delphinidæ, género: *Stenella*, especie: *S. coeruleoalba*.

El delfín listado es un animal esencialmente pelágico, y se suele encontrar en las aguas productivas en biomasa situadas en mar abierto, más allá de la plataforma continental (Aguilar, 2000). El delfín listado es cosmopolita en una gran parte de los mares tropicales y templados del planeta, como se observa en la figura 2.



Figura 1. *El delfín listado Stenella coeruleoalba (Meyen 1833).*

Fotografía: A. Gannier.

Abundancia y conservación del delfín listado

El delfín listado es considerado generalmente como una especie relativamente abundante (Reeves et al., 2003; Archer II & Perrin, 1999). Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), la especie está en “riesgo menor” de extinción, pero “dependiente de las medidas de conservación” (Cetacean Specialist Group, 1996).

En el Mediterráneo occidental, el delfín listado es el cetáceo más abundante según estimaciones basadas en transectos; según Forcada et al. (1994), el intervalo de confianza al 95 % de la estimación es de 68 379 a 214 800 individuos. Sin embargo, la población del Mediterráneo ha sufrido recientemente varias amenazas cuyos efectos son difíciles de cuantificar. Se pueden mencionar, por ejemplo, una epizootia de morbillivirus, el aumento de la contaminación ambiental, o interacciones con diversos artes de pesca (Aguilar, 2000).

De forma general, una alta *variabilidad* genética de las poblaciones está relacionada con su mayor *viabilidad* a largo plazo (Beebee & Rowe, 2004). El sur oeste de Europa es una zona con alta densidad de población humana, lo cual tiene un impacto notable sobre el medio marino. En semejante área, conocer la estructura y diversidad genética de las

poblaciones de delfines listados ayudará a diseñar adecuadas políticas de conservación.

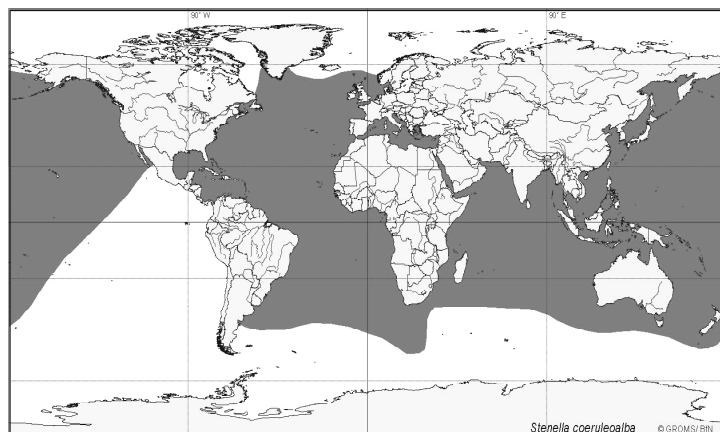


Figura 2. Distribución del delfín listado.

Global Register Of Migratory Species, http://131.220.109.5/groms/Species_HTMLs/Scoerule.html).

Estudios anteriores, y objetivo de nuestro trabajo

En un estudio de polimorfismo de restricción de ADN mitocondrial (ADNmt), García Martínez et al. (1999) encontraron que de 27 haplotipos de restricción, ninguno era compartido entre el Mediterráneo (n = 76 muestras) y el Atlántico (n = 22 muestras). Sin embargo, debido al modo de herencia maternal del ADNmt, es también útil estudiar marcadores nucleares, especialmente cuando las especies tienen un comportamiento social complejo. Estudios previos en cetáceos (Bérubé et al., 1998) han sugerido que podía ocurrir un flujo de genes nucleares mientras que el ADNmt revelaba una estructuración geográfica fuerte entre las poblaciones.

Un estudio con marcadores nucleares polimorfos (Valsecchi et al., 2004) reveló una diferenciación significativa entre delfines listados del Mediterráneo (n = 98) y del Mar del Norte (n = 6). En el presente estudio, vamos a **comparar muestras de delfines listado del Mediterráneo occidental con muestras del Atlántico** más numerosas y que vienen de zonas más cercanas al estrecho de Gibraltar, usando varios **marcadores genéticos nucleares polimorfos**.

MATERIAL Y METODOS

Muestras

Las muestras consisten de músculo, piel y grasa, hígado, o riñón de 130 individuos varados muertos. Fueron colectadas por varios organismos y personas en el Mediterráneo occidental y el Atlántico norte entre 1989 y 2006 (ver figura 3).

Se añadieron muestras de 14 individuos del Pacífico norte (sur de Alaska y norte de Hawaïi) como grupo externo. Las muestras se guardaron congeladas a -20 °C, o alternativamente en etanol absoluto a +4 °C.

Análisis molecular

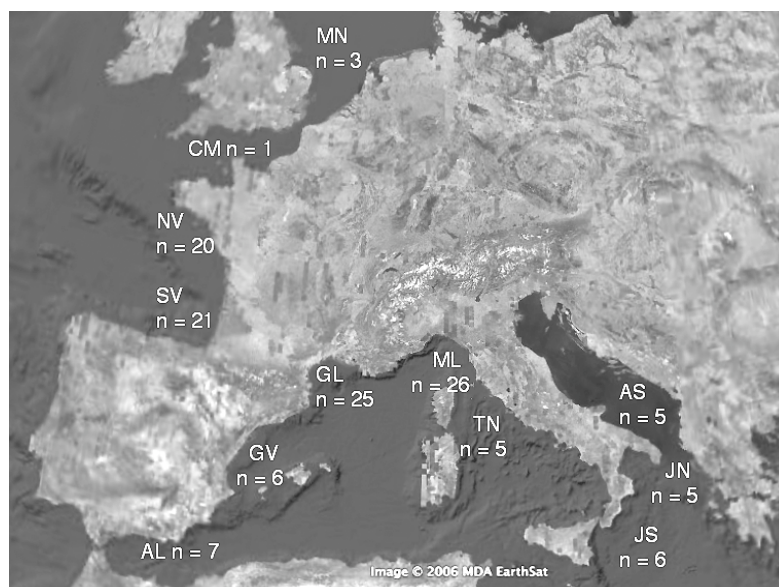
La extracción de ADN se realizó mediante métodos estándar con fenol:cloroformo (Sambrook y Russell, 2000), o alternativamente con el DNeasy Tissue Kit 250 (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania).

Los individuos fueron genotipados para cinco microsatélites. Tres son repeticiones de di-nucleótidos: MK6 y MK9 (aislados en el delfín mular *Tursiops truncatus* por Krützen et al., 2001), EV92Mn (aislado en la ballena jorobada *Megaptera novæangliæ* por Valsecchi and Amos, 1996). Dos son repeticiones de tetra-nucleótidos: GATA053 y GATA098 (aislados en *Megaptera novæangliæ* por Palsbøll et al., 1997). Se realizaron reacciones en cadena de la

polimerasa (PCR; Mullis y Faloona, 1987) en volúmenes de 20 μ L. Cada tubo contenía *Taq* polimerasa y su solución reguladora, cloruro de magnesio, nucleótidos libres, albumina de suero bovino, cebadores hasta una concentración final de 0,2 a 0,5 μ L, y agua purificada hasta completar el volumen. Se usaron 2 μ L de una solución de ADN molde a 10 ng/ μ L. Un cebador de cada par (Proligo, Boulder, CO, EE.UU.) se marcó con un fluorocromo. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler Personal (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) del siguiente modo: 15 min a 95 °C, seguidas por 34 ciclos de 30 s a 94 °C, 90 s a 51 °C, y 90 s 72 °C. Se añadió una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C.

Las electroforesis fueron realizadas con un secuenciador automático de ABIprism con un marcador de tamaño Genescan TAMRA. Los perfiles de intensidades de fluorescencia se analizaron con los programas ABI GENESCAN y GENOTYPER (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU) (figura 4).

Figura 3. Zonas de muestreo de los individuos varados del Mediterráneo y del Atlántico



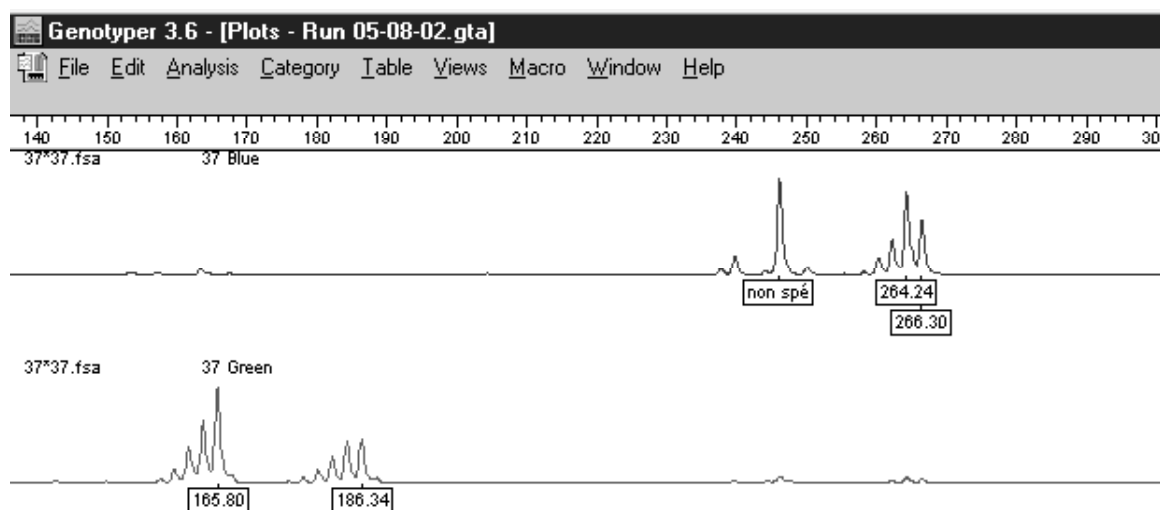
Las muestras mediterráneas (n = 85) proceden de las costas de Almería (AL), el Golfo de Valencia (GV), el Golfo de León (GL), el Mar Ligure (ML), el Tirreno norte (TN), el Jónico sur (JS), el Jónico norte (JN), el Adriático sur (AS). Las muestras “atlánticas” (n = 45) proceden del sur del Golfo de Vizcaya (SV), del norte del Golfo de Vizcaya (NV), del Canal de la Mancha (CM), y del Mar del Norte. n: número de individuos muestreados en cada zona.

Análisis estadísticos

Las heterocigosidades esperadas (H_e) y las distancias genéticas (D) se estimaron según Nei (1978). Se evaluó la significación de las diferencias entre las heterocigosidades de los distintos mares usando el test t de Student por pares. El test exacto del equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó según Guo y Thompson (1992). La estructura de las poblaciones se analizó con los estadísticos F de Wright (1969), calculados según el método de Weir y Cockerham (1984). La diferenciación entre las poblaciones se evaluó mediante F_{ST} , mientras que la desviación con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluó mediante F_{IS} . Los valores de R_{ST} , que tienen en cuenta el tamaño de los alelos y no sólo su identidad, se calcularon según Michalakis y Excoffier (1996). La significación de las diferencias, con respecto a cero, de los valores de la distancia genética de Nei (1978) y de los estadísticos F de Wright (1969) se evaluó mediante pruebas de permutación. Los cálculos se realizaron con los programas GENETIX (Belkhir et al., 1996-2004) y GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995). La frecuencia de alelos nulos se estimó con el programa MICROCHECKER (Van

Oosterhout et al., 2004).

Figura 4. Imagen obtenida con el programa ABI GENOTYPER.



La línea de arriba corresponde al marcador EV92Mn. La línea de abajo corresponde al marcador MK6. Los números en las cajitas indican el tamaño del alelo, mientras que la indicación “non spé” señala una amplificación no específica.

RESULTADOS

Desequilibrio de ligamiento

No se detecta ningún desequilibrio de ligamiento significativo cuando se analizan juntas todas las muestras. Sin embargo, cuando se separan las muestras por cuenca, se detecta un desequilibrio de ligamiento significativo sólo en el Mediterráneo, entre los loci MK9 y GATA053 ($p = 0,033$).

Diversidad genética

El número de alelos diferentes por locus y por población varía desde siete (GATA053 en el Mediterráneo) hasta 21 (MK6 en el Atlántico) (tabla 1). La heterocigosidad esperada (H_e) por locus y por población varía desde 0,50 (GATA053 en el Mediterráneo) hasta 0,93 (MK6 en el Pacífico). La heterocigosidad observada (H_o) por locus y por población varía desde 0,32 (GATA053 en el Mediterráneo) hasta 1,00 (MK6 en el Pacífico).

El número medio de alelos por locus en cada población varía desde 9,6 en el Pacífico hasta 13,4 en el Atlántico (tabla 1). La H_e media "multilocus" es significativamente más alta en el Atlántico ($H_e = 0,83$) y el Pacífico ($H_e = 0,85$) que en el Mediterráneo ($H_e = 0,76$) ($p < 0,05$). La diferencia entre los valores medios de H_e del Atlántico y del Pacífico no es significativa ($p = 0,24$). El valor medio multilocus de H_o es más bajo en el Mediterráneo ($H_o = 0,68$) que en el Atlántico ($H_o = 0,74$) y el Pacífico ($H_o = 0,79$), pero las diferencias de H_o entre los pares de cuencas no son significativas ($p > 0,098$).

Tabla 1. Variación genética de cinco microsatélites en *Stenella coeruleoalba*.

Locus / parámetro	Mediterráneo	Atlántico	Pacífico	Total
GATA098				
n	80	42	14	136
N_A	11	11	10	11
H_e	0,84	0,87	0,90	0,86

Ho	0,81	0,83	0,86	0,82
MK9				
n	72	42	14	128
N _A	11	13	9	16
He	0,78	0,88	0,87	0,84
Ho	0,75	0,79	0,86	0,77
GATA053				
n	69	41	14	124
N _A	7	9	6	10
He	0,50	0,62	0,67	0,56
Ho	0,32	0,61	0,71	0,46
MK6				
n	72	40	12	124
N _A	20	21	15	25
He	0,86	0,91	0,93	0,90
Ho	0,90	0,93	1,000	0,92
EV92Mn				
n	62	38	10	110
N _A	11	13	8	16
He	0,85	0,85	0,86	0,87
Ho	0,61	0,53	0,50	0,57
Media (±SD)				
n	71,0 (±6,48)	40,6 (±1,67)	12,8 (±1,79)	
N _A	12,0 (±4,80)	13,4 (±4,56)	9,6 (±3,36)	
He	0,76 (±0,15)	0,83 (±0,12)	0,85 (±0,10)	
Ho	0,68 (±0,23)	0,74 (±0,16)	0,79 (±0,19)	

n, número de individuos genotipados; N_A, número de alelos distintos detectados; He, heterocigosidad esperada según Nei (1978); Ho, heterocigosidad observada; SD, error estándar.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

En ninguna de las 15 combinaciones locus/cuenca se observa un exceso significativo de heterocigotos. El defecto de heterocigotos es significativo para cinco combinaciones locus/cuenca (indicadas por asteriscos en la tabla 2). El cálculo multilocus de F_{IS} y la prueba exacta del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) enseñan un defecto global de heterocigotos significativo en el Mediterráneo y el Atlántico.

Se sospecha que EV92Mn tiene alelos nulos en las tres cuencas. La frecuencia estimada de alelos nulos es de 0,12 en el Mediterráneo, 0,19 en el Atlántico, y 0,19 en el Pacífico. La mayoría de los resultados sobre la diversidad genética y el EHW siguen siendo similares cuando se descarta EV92Mn de los cálculos multilocus (datos no presentados). La única diferencia es que la desviación del EHW ya no es significativa en el Atlántico (p = 0,142, F_{IS} = 0,0413).

Locus/parametro	Mediterráneo	Atlántico	Pacífico
GATA098			
F _{IS}	0,028	0,0437	0,0459
EHW	0,362	0,4984	0,8816
MK9			
F _{IS}	-0,042	0,1105*	0,0127
EHW	0,181	0,0230	0,9177

GATA053

F_{IS}	0,367***	0,0182	-0,0700
EHW	0,0000	0,6532	0,1915

MK6

F_{IS}	-0,0549	-0,0119	-0,0776
EHW	0,516	0,8143	0,8428

EV92Mn

F_{IS}	0,278***	0,3823***	0,4340***
EHW	0,0000	0,0000	0,0213

Todos los locus

F_{IS}	0,112***	0,1115*	0,0746
EHW	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	0,3007

Tabla 2. Valores de F_{IS} y resultados de la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg.

La línea "EHW" indica el valor de la "p-value" de la prueba exacta del EHW. Los asteriscos indican que el valor de F_{IS} es significativamente diferente de cero; (*, $p \leq 0,05$; ***, $p \leq 0,001$).

Diferenciación genética entre las tres cuencas

El F_{ST} global multilocus (considerando la identidad de los alelos) es 0,0225 cuando se toman en cuenta todos los locus, y 0,0205 cuando se excluye EV92Mn. El R_{ST} global multilocus (considerando el tamaño de los alelos) es 0,0113 cuando se toman en cuenta todos los loci, y 0,0050 si se excluye EV92Mn.

Todos los análisis genéticos indican que la mayor diferenciación genética ocurre entre las poblaciones del Mediterráneo y del Pacífico (tabla 3). Los cálculos multilocus de la distancia genética de Nei (1978) y del F_{ST} de Wright (1969) entre pares de poblaciones indica una diferenciación genética leve pero altamente significativa entre las poblaciones del Mediterráneo y del Atlántico (tabla 3, a) y b)). La mayoría de los análisis indican una diferenciación mayor o más significativa entre el Mediterráneo y el Atlántico que entre el Atlántico y el Pacífico.

Tabla 3. Índices multilocus de diferenciación genética entre tres cuencas.

D	Med	Atl	Pac	F_{ST}	Med	Atl	Pac	R_{ST}	Med	Atl	Pac
Med		0,061***	0,094***	Med		0,020***	0,031***	Med		0,002	0,032
Atl	0,078***		0,045**	Atl	0,021***		0,009	Atl	0,014		-0,009
Pac	0,154***	0,092***		Pac	0,038***	0,015*		Pac	0,027	-0,010	

a)

b)

c)

Los valores situados debajo de las diagonales se calcularon con los datos de los cinco locus, mientras que los valores situados arriba de la diagonal se calcularon sin los datos del locus EV92Mn. Para los valores de D y F_{ST} , los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a cero (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$). a), distancia genética de Nei (1978); b) F_{ST} de Wright; c) R_{ST} ; Med, Mediterráneo; Atl, Atlántico; Pac, Pacífico.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN*La diversidad genética es baja en el Mediterráneo*

Los valores de N_A , H_e y H_o dentro de cada cuenca sugieren una diversidad genética mayor en la población atlántica con respecto a la población mediterránea. Este resultado es consistente con un resultado previo de Valsecchi et al. (2004), quienes encontraron que H_o era de 0,70 en una muestra del Mediterráneo ($n = 98$), y 0,90 en una muestra del Mar del Norte ($n = 6$). En cuanto al ADN mitocondrial (ADNmt), García Martínez et al. (1999) encontraron que la diversidad nucleotídica, π , era de 0,0022 en una muestra del Mediterráneo ($n = 76$) y 0,0032 en una muestra del Atlántico ($n = 22$). Aquí notamos la misma tendencia en cuanto a la diversidad genética nuclear. La población mediterránea, en

su conjunto, es menos variable que la población atlántica, tanto en lo referente al ADN nuclear como al ADN mitocondrial.

La mayor diversidad genética de la población atlántica podría ser debida a un origen más antiguo (García Martínez et al., 1999). Otra hipótesis es que la población atlántica muestreada tiene un tamaño poblacional efectivo mayor, debido por ejemplo a contactos reproductivos con otras poblaciones atlánticas. La diversidad genética de la muestra pacífica parece más o menos similar a la de la muestra atlántica, o incluso un poco mayor. Sin embargo, un muestreo mayor en el Pacífico permitirá investigar de forma precisa la diversidad genética de esta población.

La población mediterránea es parcialmente aislada en cuanto a marcadores genéticos nucleares

El hecho de que la mayor diferenciación genética ocurra entre el Mediterráneo y el Pacífico es consistente con el antiguo aislamiento geográfico entre esas dos cuencas.

Los cálculos de la distancia genética de Nei (1978) y del F_{ST} de Wright (1969) indican que la diferenciación genética entre el Mediterráneo y el Atlántico es leve pero significativa. Cuando se asume un modelo “en islas” (Wright, 1969), Nm se puede calcular a partir de F_{ST} , donde N es el tamaño efectivo de la población, y m la proporción de la población reemplazada cada año por migrantes. Nuestro muestreo no permite una cuantificación exacta del flujo génico entre ambas cuencas. Sin embargo, el cálculo de Nm da una estimación aproximada de 11,7 si se tienen en cuenta todos los loci, y de 12,1 si se excluye EV92Mn. Debido a las características del muestreo y a las hipótesis de las que dependen los modelos, esta estima no refleja un número real de migrantes. Sin embargo, parece que este valor es muy diferente a la estimación de Nm (ADNmt) de 0,98 de García Martínez et al. (1999), donde N es, en este caso, el número efectivo de hembras (Slatkin, 1989). La comparación de esas dos estimaciones puede sugerir que el flujo génico mediado por los machos podría ser mayor que el flujo génico mediado por las hembras, pero una cuantificación exacta aún no se ha realizado.

La mayoría de los índices de diversidad genética indican que la diferenciación genética entre el Mediterráneo y el Atlántico es mayor que la diferenciación entre las poblaciones atlántica y pacífica. El delfín listado es más bien una especie tropical y de aguas templadas, y no se suele encontrar ni en las aguas del sur de Argentina o Chile, ni en el archipiélago canadiense. Entonces, la diferenciación genética baja entre el Atlántico y el Pacífico probablemente no es debida a un flujo génico actual significativo entre esos dos océanos. Quizás, el aislamiento recíproco definitivo entre ambas poblaciones sólo data del relativamente reciente cierre de la vía marítima de Panamá (final del Plioceno, hace entre tres y cuatro millones de años; Coates et al., 2004), lo cual explicaría una diferenciación genética tan baja. Sin embargo, serán necesarias más muestras del Pacífico para investigar de forma precisa las relaciones entre esas dos poblaciones.

Estructura genética de la población mediterránea

La población mediterránea tiene un defecto significativo de heterocigotos, con respecto a las proporciones de Hardy-Weinberg. Este resultado podría explicarse por una endogamia significativa dentro de la población; sin embargo, el “efecto Wahlund”, que es debido al muestreo de dos o más poblaciones distintas reproductivamente, puede también explicar este exceso global de heterocigotos. Además, la existencia de un desequilibrio de ligamiento significativo dentro del Mediterráneo puede ser la consecuencia de tal muestreo. De hecho, Macé et al. (enviado), con datos de secuencia de ADNmt, encontraron en el Mediterráneo dos linajes de delfines listados divergentes entre si, con poco contacto reproductivo entre ambos. Entonces, la población mediterránea de delfines listados estaría a su vez subdividida. Sin embargo, dentro del Mediterráneo, con pruebas de asignación, Valsecchi et al. (2004) no

encontraron una diferenciación genética clara según la distancia geográfica entre regiones de muestreo (p. ej. Golfo de Valencia, Mar Ligure...). Si coexisten dos linajes, deben de vivir más o menos en simpatria, o bien podrían corresponder a distintos ecotipos. De hecho, dentro del Mediterráneo, Gaspari (2004) encontró una diferenciación genética significativa entre grupos de delfines listados costeros y otros de mar abierto. Más investigación permitirá conocer de forma más precisa las relaciones exactas entre estos posibles linajes mediterráneos diferentes.

Conclusión: conservación de las poblaciones de delfines listados del Mediterráneo

Aunque no parezca estar en peligro inmediato de extinción, la población mediterránea de delfines listados vive en un entorno altamente modificado por el hombre, y está sometida a varias amenazas cuyos efectos son difíciles de cuantificar. Aquí mostramos que, en cuanto a marcadores nucleares, la población mediterránea en su conjunto es genéticamente menos variable que las poblaciones atlántica y pacífica, y es parcialmente aislada reproductivamente. Dadas esas características genéticas, la población mediterránea de delfines listados debería beneficiarse de un esfuerzo de conservación adecuado. Este esfuerzo tendrá que inscribirse dentro de una política global de gestión de la cuenca del Mediterráneo, cuyas situación geográfica privilegiada e historia geológica destacada le hacen un gran “punto caliente” del Mundo en términos de biodiversidad (Myers et al., 2000).

CRÉDITOS

Le agradecemos a Willy Dabin, Alexandre Dewez, Frank Dhermain, Jean-Louis Fabre, Brandy Jakobsen, Bernard Lafitte, Anne-Sophie Lemaire, Matthias Macé, Promar-Programa de Recuperación de Fauna Marina de Almería y Elena Valsecchi habernos facilitado muestras.

Le agradecemos a Maxime Bonhomme, Matthias Macé, Frédéric Magné, Anna Rozzi, M^a Ángeles Sánchez y Obdulia Sánchez habernos ayudado en las tareas de laboratorio.

Finalmente, le agradecemos a Brigitte Crouau-Roy, Pilar De la Rúa, José Galián, Matthias Macé, Antonio Ortiz y José Serrano habernos aconsejado y apoyado en varias etapas del proyecto.

REFERENCIAS

- Aguilar, A., 2000. Population biology, conservation threats and status of Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Journal of Cetacean Research and Management*, **2**, 17-26.
- Archer II, F.I. & Perrin, W.F., 1999. *Stenella coeruleoalba*. *Mammalian Species*, **603**, 1-9.
- Beebe, T. & Rowe, G., 2004. *An introduction to molecular ecology*. New York: Oxford University Press.
- 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)*.
- Berta A., Sumich J.L. & Kovacs K.M., 2006. *Marine mammals: evolutionary biology*. Burlington y San Diego: Academic Press. 51-88.
- Bérubé, M., Aguilar, A., Dendanto, D., Larsen, F., Di Sciara, G.N., Sears, R., Sigurjónsson, J., Urbán-R, J. & Palsbøll, P.J., 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. *Molecular Ecology*, **7**, 585-599.
- Cetacean Specialist Group, 1996. *Stenella coeruleoalba*. In *2004 IUCN Red list of threatened species*. www.redlist.org descargado el 24 de junio del 2005.

- Coates A.G., Collins L.S., Aubry M.P. & Berggren W.A., 2004. The geology of the Darien, Panama, and the late Miocene-Pliocene collision of the Panama arc with northwestern south America. *Geological Society of America Bulletin*, **116**, 1327-1344.
- Forcada, J., Aguilar, A., Hammond, P.S., Pastor, X. & Aguilar, R., 1994. Distribution and numbers of striped dolphins in the western Mediterranean Sea after the 1990 epizootic outbreak. *Marine Mammal Science*, **10**, 137-150.
- García Martínez, J., Moya, A., Raga, J.A. & Latorre, A., 1999. Genetic differentiation in the striped dolphin *Stenella caeruleoalba* from European waters according to mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis. *Molecular Ecology*, **8**, 1069-1073.
- Gaspari, S., 2004. *Social and population structure of striped and Risso's dolphins in the Mediterranean Sea*. Tesis de doctorado, Universidad de Durham, Reino Unido.
- Guo, S.W. & Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361-372.
- Krützen, M., Valsecchi, E., Connor, R.C. & Sherwin, W.B., 2001. Characterization of microsatellite loci in *Tursiops aduncus*. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 170-172.
- Macé, M.R.J.M., Bourret, V.J.R. & Crouau-Roy, B. Polyphyly in the Mediterranean Striped dolphin (*Stenella caeruleoalba*) and the Messinian Salinity Crisis. Manuscrito enviado a *Molecular Ecology*.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L., 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special interest to microsatellite loci. *Genetics*, **142**, 1061-1064.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**, 335-350.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A. & Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, , **403**, 853-858.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
- Palsbøll, P.J., Bérubé, M., Larsen, A.H. & Jørgensen, H., 1997. Primers for the amplification of tri- and tetramer microsatellite loci in baleen whales. *Molecular Ecology*, **6**, 893-895.
- Raymond, M. & Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Reeves, R.R., Smith, B.D., Crespo, E.A. & Di Sciara, G.N., 2003. *Dolphins, whales and porpoises: 2002-2010 conservation action plan for the World's cetaceans*. Gland y Cambridge: IUCN.
- Sambrook, J. & Russell, D.W., 2000. Preparation of genomic DNA from mouse tails and other small samples. In *Molecular Cloning - A Laboratory Manual on The Web*. Capítulo 6, protocolo 5. http://www.molecularcloning.com/members/protocol_print.jsp?protocol=4038 descargado el 10 de noviembre del 2005.
- Slatkin, M., 1989. Population structure and evolutionary progress. *Genome*, **31**, 196-202.
- Valsecchi, E. & Amos, W. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology*, **5**, 151-156.
- Valsecchi, E., Amos, W., Raga, J.A., Podestà, M. & Sherwin, W., 2004. The effects of inbreeding on mortality during a morbillivirus outbreak in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella caeruleoalba*). *Animal Conservation*, **7**, 139-146.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.
- Weir B.S. & Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Wright, S., 1969. *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 2: the theory of gene frequencies. Chicago: University of Chicago Press.