

COMISIÓN INTERAMERICANA DEL ATÚN TROPICAL

COMITÉ CIENTÍFICO ASESOR

17ª REUNIÓN

La Jolla, California (EE. UU.)

08-12 de junio de 2026

DOCUMENTO SAC-17 INF-S

INFORME DEL PROYECTO: MARCADO Y RECAPTURA POR PARIENTES CERCANOS (CKMR) PARA EVALUAR LA ABUNDANCIA DE LAS POBLACIONES DE DELFINES DEL POT: FASE I — VIABILIDAD DEL MUESTREO

John Swenson¹, Andrea Bernard¹, Mahmood Shivji¹, Heidi Pearson², Joana Castro³, Andre Cid³, Dan Ovando⁴, Dan Crear⁴ y Alexandre Aires-da-Silva⁴

¹Save Our Seas Foundation Shark Research Center, Halmos College of Arts & Sciences, Nova Southeastern University, Dania, Florida, USA

²University of Alaska Southeast, Juneau, AK, USA ³Save Our Seas

³AIMM – Associação para a Investigação do Meio Marinho, Lisboa, Portugal

⁴Comisión Interamericana del Atún Tropical

RESUMEN

Tras el [2º Taller sobre métodos para dar seguimiento a la condición de las poblaciones de delfines en el Océano Pacífico oriental tropical](#), se llevó a cabo un estudio piloto para evaluar el potencial del uso de métodos de marcado y recaptura por parientes cercanos (CKMR, por sus siglas en inglés) para evaluar la abundancia de las poblaciones de dos especies de delfines en el Pacífico oriental tropical (POT). La meta principal del estudio piloto, también denominado “Fase I” del proyecto, era determinar si el ADN de los delfines, obtenido de muestras de piel recolectadas con estropajos, podía utilizarse para el genotipado individual y la asignación de parentesco, que son requisitos previos para el CKMR. Se evaluó la cantidad y la calidad del ADN obtenido de muestras de piel de delfines y se determinó el genotipo de todos los delfines muestreados (n = 20) en ocho loci de microsatélites, con el fin de detectar cualquier contaminación intra e interespecífica que pudiera dificultar los esfuerzos de genotipado individual. Los resultados muestran que se pueden recuperar grandes cantidades de ADN específico por especie y no contaminado a partir de los estropajos, lo que demuestra que se pueden obtener genotipos individuales a partir de muestras de piel utilizando métodos basados en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP; por ejemplo, genotipado de microsatélites), que permiten la identificación de pares de padres y crías. Sin embargo, la calidad del ADN de las muestras de piel fue variable y sustancialmente inferior a la del ADN obtenido de biopsias. Aún no se sabe con certeza si la calidad del ADN es suficiente para enfoques genómicos basados en polimorfismo de nucleótido único (PNU) que permitan la identificación de pares de medios hermanos, pero realizar pruebas para ello es una prioridad para la Fase II del proyecto. En general, nos sentimos alentados por los resultados de la Fase I y recomendamos proceder con cautela a la Fase II.

ANTECEDENTES

La CIAT proporcionó un total de 120 muestras de tejido obtenidas de 20 mortalidades de delfines del Pacífico oriental tropical (POT) en operaciones de pesquerías atuneras de cerco: 14 delfines tornillo (*Stenella longirostris*) y seis delfines manchados pantropicales (*Stenella attenuata*). Se recolectaron cinco muestras de tejido de cada mortalidad de delfines para el análisis de ADN (n = 100 en total): una biopsia profunda (normal) como control y cuatro muestras de piel obtenidas utilizando estropajos. La biopsia y las tres muestras de piel se tomaron del cuerpo de cada delfín mientras se encontraba en la cubierta del buque. La cuarta muestra se tomó mientras el cadáver del delfín aún se encontraba en el agua, siguiendo un protocolo que se asemeja mucho al protocolo de muestreo en el agua que se utilizará en el futuro para recolectar muestras para las evaluaciones de marcado y recaptura por parientes cercanos (CKMR). Además, se recolectaron dientes de cada delfín para contribuir al posible desarrollo de un reloj epigenético durante la Fase II (n = 20 en total). Los métodos y resultados de los análisis genéticos se detallan a continuación.

MÉTODOS

Las muestras de piel y las biopsias almacenadas en etanol al 95% llegaron a la Universidad Nova Southeastern en buen estado. Se registró si había o no tejido visible en el estropajo para un subconjunto de las muestras (n = 46); de estos, el 74% (n = 34) presentaba tejido claramente visible (Figura 1), mientras que el 26% (n = 12) no presentaba tejido visible. En el caso de las muestras sin tejido visible, se supuso que las áreas del estropajo con una ligera decoloración o una depresión circular (indicativa de que se había adherido al extremo de una lanza) correspondían a la zona de contacto con la piel del delfín, y fue en esa sección del estropajo donde se intentó la extracción de ADN.

Se extrajo el ADN de las 20 biopsias utilizando un kit DNEasy Blood & Tissue (Qiagen, Inc.). Sin embargo, ese mismo kit de extracción produjo cantidades muy bajas de ADN a partir de las muestras de piel, por lo que se desarrolló y utilizó un protocolo diferente para las 80 muestras, que consistió en la lisis del tejido con un Investigator Lyse & Spin Basket marca Qiagen, seguida de la extracción de ADN con un kit QIAamp DNA Micro marca Qiagen. Tras la extracción del ADN, se midió la concentración de ADN (ng/μl) utilizando un fluorímetro Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific) y se calculó la cantidad total de ADN en cada muestra multiplicando la concentración de ADN por el volumen total de elución (40 μl para las muestras de piel, 150 μl para las biopsias). La calidad del ADN (es decir, el tamaño y la integridad del ADN) se evaluó utilizando Agilent TapeStation (Agilent Technologies).

Para evaluar los niveles de contaminación provocados por el posible contacto entre individuos de delfines, se utilizaron cebadores de ADN¹⁻⁴ publicados anteriormente para amplificar (mediante la reacción en cadena de la polimerasa) ocho loci de microsatélites altamente variables en cada delfín de ambas especies. Se confirmó que los cebadores seleccionados amplificaban en ambas especies, lo que permitió detectar contaminación tanto intra como interespecífica entre delfines. Se compararon los datos de genotipo de microsatélites obtenidos de biopsias y muestras de piel tomadas en el agua de cada delfín y se buscó cualquier locus amplificado que mostrara más de dos alelos, lo que indicaría contaminación de otro delfín. Los datos de genotipo se generaron con el analizador genético Applied Biosystems 3730 y se analizaron utilizando el software bioinformático Geneious Prime (<https://www.geneious.com/>).



FIGURE 1: Scouring pad swab sample showing visible dolphin tissue.

FIGURA 1: Muestra obtenida con un estropajo que muestra tejido visible de delfín.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cantidad de ADN

Se evaluó la cantidad y la calidad del ADN extraído de biopsias ($n = 20$) y de muestras tomadas con estropajos ($n = 80$). En general, las muestras de piel produjeron grandes cantidades de ADN total con nuestro protocolo de extracción modificado (Tabla 1, Figura 2), lo que confirma que los estropajos capturaron tejido que contenía ADN. Una de las metas de esta evaluación era determinar si podríamos utilizar el ADN de las muestras de piel para la determinación epigenética de la edad, lo que requeriría cantidades de ADN total > 10 ng por muestra. De las 100 extracciones de ADN, solo cuatro muestras tuvieron < 100 ng de ADN total, y solo una muestra quedó por debajo del umbral de 10 ng; esta muestra fue la primera extraída antes de la modificación del protocolo. En general, las muestras de piel produjeron cantidades de ADN suficientes para el genotipado posterior mediante diversos métodos y, potencialmente, para la determinación epigenética de la edad.

TABLE 1: Summary statistics of total DNA quantity and DNA concentration obtained from different sample types. Note that biopsy DNA was eluted in 150 μ l of buffer, while skin swab DNA was eluted in 40 μ l. This is why the mean DNA concentrations are similar but total DNA varies across sample types.

TABLA 1: Estadísticas resumidas de la cantidad de ADN total y la concentración de ADN obtenidas a partir de diferentes tipos de muestras. Cabe señalar que el ADN de las biopsias se eluyó en 150 μ l de tampón, mientras que el ADN de las muestras de piel se eluyó en 40 μ l. Por este motivo, las concentraciones promedio de ADN son similares, pero la cantidad de ADN total varía según el tipo de muestra.

Tipo de muestra	Cantidad promedio de ADN total (ng)	Concentración promedio de ADN (ng/ μ l)
Biopsia (n=20)	8,001	65.6
Muestra tomada en el agua (n=20)	3,052	73.7
Muestra tomada de la cabeza (n=20)	2,686	63.4
Muestra tomada del lado izquierdo (n=20)	3,186	76.6
Muestra tomada del lado derecho (n=20)	2,998	72.2

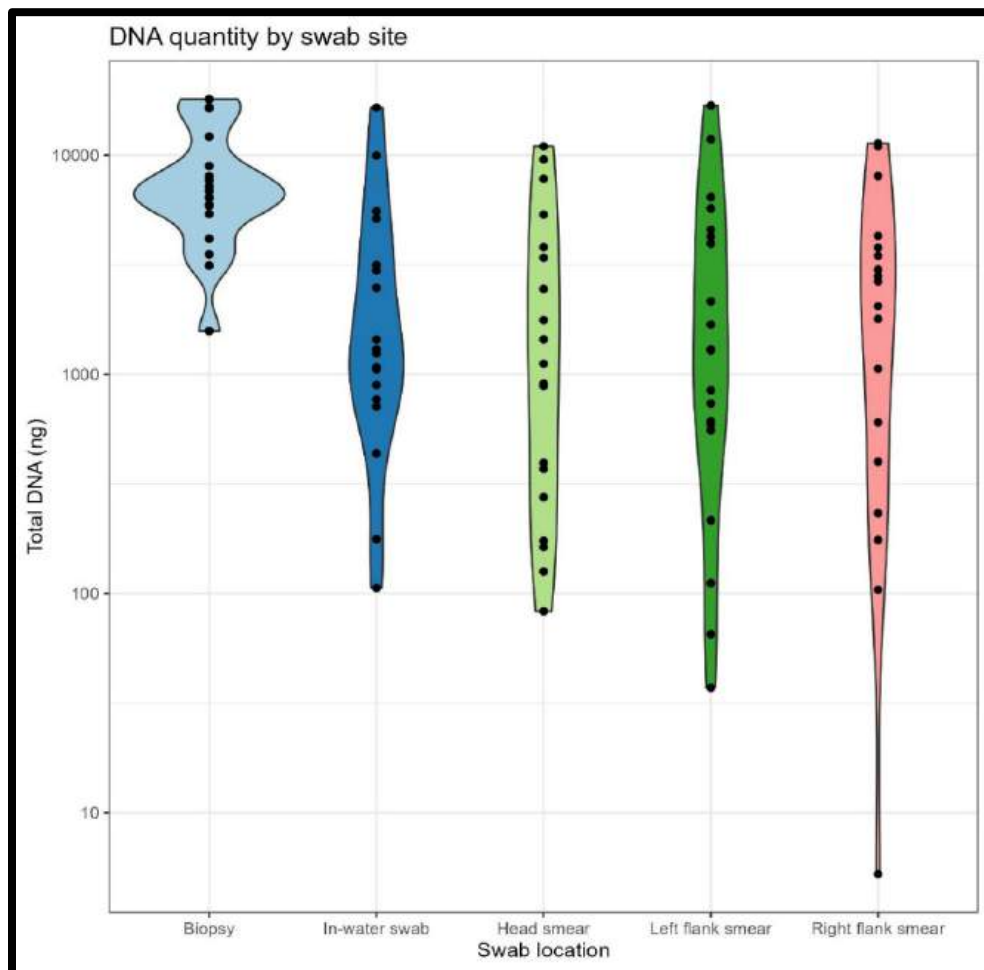


FIGURE 2: Comparative DNA quantity obtained from dolphin biopsies and different skin swab locations with a log-10 transformed Y axis.

FIGURA 2: Cantidad comparativa de ADN obtenida de biopsias de delfines y de diferentes puntos de toma de muestras de piel; el eje 'y' está transformado en log-10.

Calidad del ADN

El ADN de alta calidad contiene una proporción elevada de ADN de alto peso molecular, lo que indica una degradación mínima. Esto es importante para el CKMR, ya que los métodos de genotipado que permiten identificar a parientes de segundo grado (por ejemplo, medios hermanos) requieren ADN de alta calidad, mientras que los métodos que permiten identificar a parientes de primer grado (por ejemplo, padres y crías) son menos exigentes respecto a la calidad del ADN. Por lo tanto, evaluar la calidad del ADN a partir de muestras de piel puede ayudar a calibrar las expectativas sobre las categorías de parentesco que estarán disponibles para el modelado posterior (es decir, ¿se podrán identificar tanto los pares de padres y crías como los medios hermanos, o solo a los primeros?).

Se utilizó Agilent TapeStation para evaluar la calidad del ADN. Esta herramienta asigna una métrica denominada Número de Integridad del ADN (DIN, por sus siglas en inglés), que varía de 1 a 10, donde 1 corresponde a ADN muy degradado y 10 a ADN de alta calidad (es decir, de alto peso molecular). Entre las muestras, las biopsias produjeron ADN de alta calidad de forma consistente, mientras que las muestras de piel produjeron ADN de menor calidad (Figura 3). Aunque los DIN eran bajos, la mayoría de las muestras de piel aún contenían al menos un poco de ADN de alto peso molecular que podría hacer que las muestras fueran adecuadas para enfoques genómicos que permitan la identificación de medios hermanos y parientes de segundo grado (ver la Figura 4 para tres ejemplos contrastantes de calidad del ADN de muestras de delfines). En general, los resultados indican que las muestras de piel producen una calidad de ADN variable que no es ni alarmantemente baja ni alentadoramente alta. Es posible que esto limite las opciones para el genotipado posterior (ver la sección de recomendaciones más abajo).

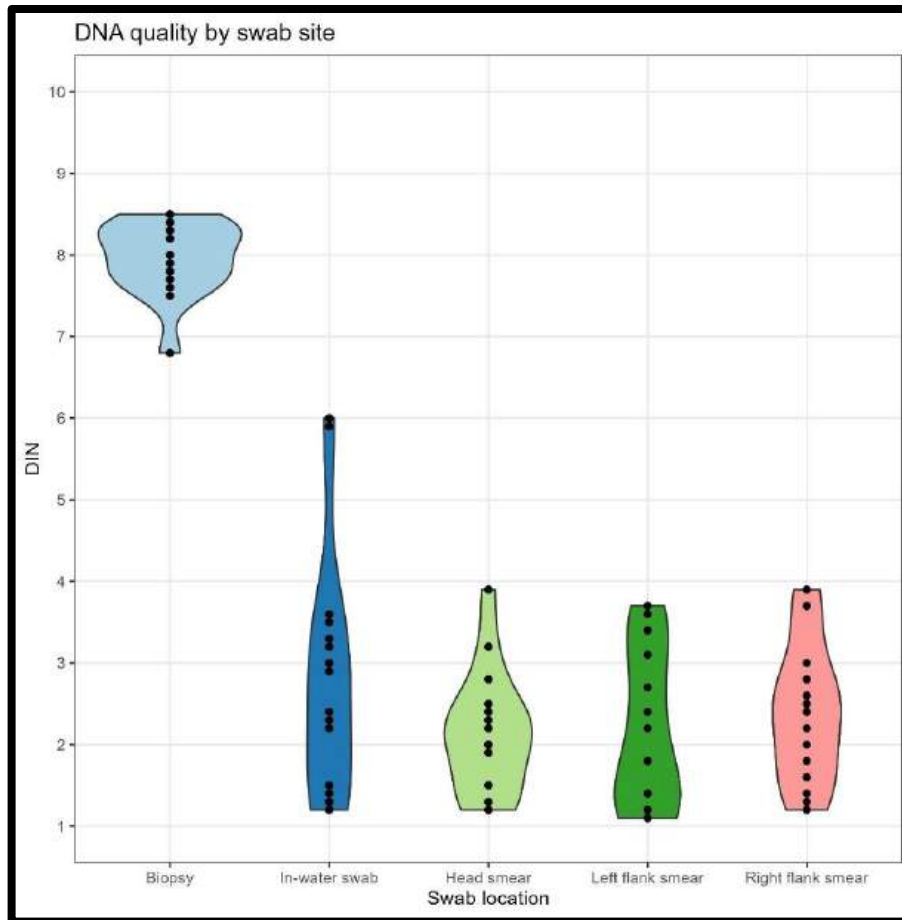


FIGURE 3: Comparative DNA quality (DIN) by tissue sample type and location.
FIGURA 3: Comparación de la calidad del ADN (DIN) según el tipo de muestra de tejido y la ubicación.

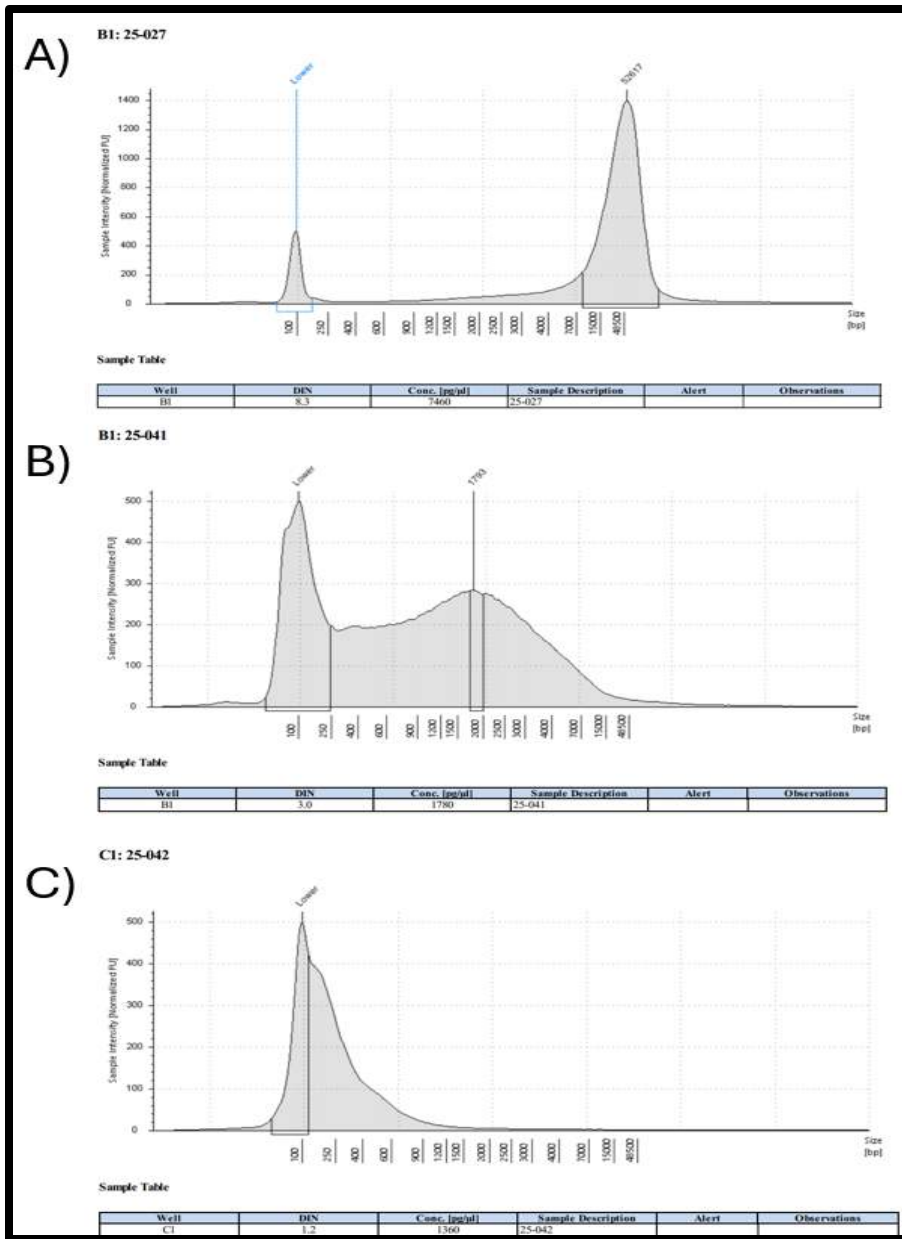


FIGURE 4: Three example dolphin DNA quality distribution traces showing high (A), moderate (B), and low (C) quality DNA. The majority of biopsy DNA resembled A, while the majority of swab DNA looked similar to B, with a handful that appeared similar to C. The X axis is DNA fragment length (in base pairs) and the Y axis is fluorescence (a proxy for fragment number). Notice that high quality DNA shows a peak above 15,000 base pairs while low quality DNA is primarily < 1,000 base pairs, while moderate quality DNA is somewhere between the two.

FIGURA 4: Tres ejemplos que muestran la distribución de la calidad del ADN de delfines: alta (A), moderada (B) y baja (C). La mayor parte del ADN de las biopsias se asemejaba a A, mientras que la mayor parte del ADN de las muestras de piel se parecía a B, con unas pocas que se asemejaban a C. El eje 'x' representa la longitud de los fragmentos de ADN (en pares de bases) y el eje 'y', la fluorescencia (un sustituto del número de fragmentos). Cabe destacar que el ADN de alta calidad presenta un pico por encima de los 15,000 pares de bases, mientras que el de baja calidad se sitúa principalmente < 1,000 pares de bases, y el de calidad moderada se encuentra en algún punto intermedio entre ambos.

Contaminación intra e interespecífica

Se genotiparon ocho loci de microsatélites a partir de biopsias y muestras de piel emparejadas de cada individuo muestreado, utilizando solo muestras de piel tomadas en el agua, ya que son las que más se asemejan a las muestras que se recolectarán en el futuro (n = 20 de cada tipo de tejido). Para cada delfín individual, los genotipos de microsatélites de las biopsias y las muestras de piel fueron los mismos, y ninguna combinación de locus/muestra presentó > 2 alelos (ver Figura 5 para ejemplos). La consistencia de los resultados, junto con el número (ocho) de loci de microsatélites variables genotipados, proporciona pruebas sólidas de que las muestras de piel contienen ADN solo del delfín del que se tomó la muestra. Por lo tanto, siempre que los protocolos de muestreo de campo sean consistentes, es poco probable que la contaminación de otros delfines sea motivo de preocupación para este proyecto.

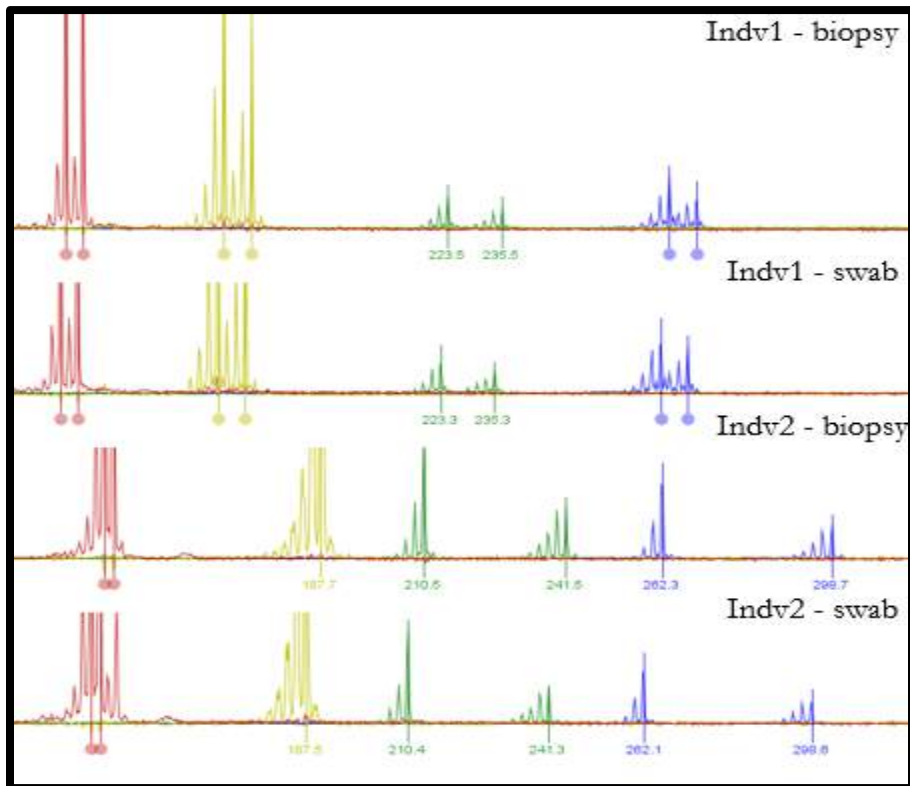


FIGURE 5: Example microsatellite traces of 4 loci from two individual pantropical spotted dolphins. Each color represents a different microsatellite locus. Homozygous individuals show one allele at a locus (e.g. one major yellow peak in Indv2), and heterozygous individuals would have, at most, two alleles (e.g., 2 clearly different purple peaks of different sizes in Indv2). Called alleles are denoted by a number with the fragment size or, if peaks were close together, a circle with a line. All peaks were assigned sizes - the lack of a labeled size in the image is a function of software visualization constraints. The smaller peaks preceding the called alleles are called “stutter” and are expected in microsatellite genotyping data. Note that the biopsies and swabs from each individual show the same genotype for each locus, and note also the size variability in loci between individuals, which suggests that we should be able to detect DNA contamination between dolphin individuals, if it was present.

FIGURA 5: Ejemplos de microsatélites de 4 loci de dos delfines manchados pantropicales. Cada color representa un locus de microsatélites diferente. Los individuos homocigotos muestran un alelo en un locus (por ejemplo, un pico amarillo principal en Indv2), mientras que los individuos heterocigotos tendrían, como máximo, dos alelos (por ejemplo, dos picos morados claramente diferenciados y de

distintos tamaños en Indv2). Los alelos identificados se indican mediante un número con el tamaño del fragmento o, si los picos están muy juntos, un círculo con una línea. A todos los picos se les asignaron tamaños; la ausencia de etiquetas con el tamaño en la imagen se debe a limitaciones de visualización del software. Los picos más pequeños que preceden a los alelos identificados se denominan “*stutter*” y son esperados en los datos de genotipado de microsatélites. Nótese que las biopsias y las muestras de cada individuo muestran el mismo genotipo para cada locus, y nótese también la variabilidad de tamaño en los loci entre individuos, lo que sugiere que deberíamos ser capaces de detectar la contaminación de ADN entre delfines, si la hubiera.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA LA FASE II DEL PROYECTO

Los resultados genéticos obtenidos sugieren que se puede proceder con cautela a la Fase II del proyecto de marcado y recaptura por parientes cercanos (CKMR) de delfines. Las principales cuestiones moleculares pendientes son si se puede optimizar el protocolo de extracción de ADN para permitir un procesamiento de muestras de alto rendimiento y si la calidad del ADN de las muestras de piel es suficiente para los métodos de genotipado que permitirían identificar a parientes de segundo grado (por ejemplo, pares de medios hermanos). Con respecto a lo primero, el protocolo actual de extracción de ADN produce grandes cantidades de ADN, pero es muy laborioso y será difícil ampliarlo para procesar miles de muestras; por lo tanto, como parte de la Fase II, se explorarán estrategias para automatizar aspectos del protocolo de extracción de ADN. Si el protocolo simplemente no puede simplificarse más, los planes para el proyecto completo deberán tener en cuenta que la extracción de ADN es muy laboriosa. Una forma posible de hacerlo podría ser procesar las muestras de piel en pequeñas tandas en paralelo con la recolección de muestras. En cualquier caso, no esperamos que la cantidad de trabajo sea prohibitiva.

La identificación de pares de medios hermanos requiere un mínimo de 1,500-3,000 variantes genéticas informativas, que normalmente solo pueden obtenerse mediante métodos de secuenciación del genoma completo. La secuenciación del genoma completo requiere ADN de alta calidad; sin embargo, los paneles que se centran en amplicones que contienen variantes informativas (por ejemplo, polimorfismo de nucleótido único [PNU]) tienen requisitos de calidad menos estrictos. Si se consigue desarrollar un panel de amplicones de alto rendimiento dirigido a 1,500-3,000 PNU y aplicarlo a las muestras de piel, es posible que se puedan eludir las limitaciones asociadas a la calidad del ADN y, en última instancia, utilizar el ADN de las muestras de piel para identificar a medios hermanos.

Los planes para la Fase II incluyen la secuenciación genómica del ADN de biopsias (que se ha demostrado que produce ADN de alta calidad, ver Figura 3) y el desarrollo de un panel de amplicones PNU a partir de esos datos. Posteriormente, se probará el panel con ADN derivado de muestras de piel para confirmar su utilidad con ADN de calidad baja-moderada. Si el enfoque funciona, entonces la aplicación a gran escala del CKMR podrá incluir parientes de primer y segundo orden; si el panel de amplicones no produce datos suficientes a partir del ADN de las muestras de piel, aún se podrán utilizar microsatélites (el método utilizado aquí para evaluar la contaminación) para identificar pares de padres y crías.

En general, los resultados justifican el avance hacia la Fase II del proyecto y proporcionan una hoja de ruta para la optimización y las pruebas que garanticen el perfeccionamiento de los detalles metodológicos clave antes de la implementación del proyecto completo.

AGRADECIMIENTOS

La Fase 1 del proyecto CKMR de delfines del POT fue financiada mediante un Memorando de Entendimiento (MdE) entre la Comisión Interamericana del Atún Tropical y la Alianza del Pacífico por el Atún Sustentable. Se agradece a Omar Santana, Salvador Siu y Gabriel Aldana, de la CIAT, por su apoyo en la obtención de permisos para la recolección de muestras y su transporte. Asimismo, agradecemos a

Geoffrey Walker por facilitar el trabajo de laboratorio en el Save Our Seas Foundation Shark Research Center.

REFERENCIAS

1. Valsecchi, E., and Amos, W. (1996). Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology* 5, 151–156.
2. Courbis, S.S. (2011). Population Structure of Island-Associated Pantropical Spotted Dolphins (*Stenella attenuata*) in Hawaiian Waters. Portland State University
3. Galver, L.M. (2002). The Molecular Ecology of Spinner Dolphins, *Stenella longirostris*: Genetic Diversity and Population Structure. University of California, San Diego.
4. Faria, D.M., Da Silva, J.M., Pires Costa, L., Rezende Paiva, S., Marino, C.L., Rollo, M.M., Baker, C.S., and Cazerta Farro, A.P. (2020). Low mtDNA diversity in a highly differentiated population of spinner dolphins (*Stenella longirostris*) from the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *PLoS ONE* 15, e0230660.