



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Identificación de la especie y
sexo en dos zifios mediante
estudios anatómicos,
radiológicos y genéticos

Karla Penichet Zehni

Grado en Veterinaria

Año 2025

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece Karla Penichet Zehni y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.





RESUMEN

Los zifios son cetáceos odontocetos de los que se tiene muy poca información ya que habitan aguas profundas y presentan un comportamiento esquivo, por lo que gran parte de lo que se sabe sobre ellos proviene del estudio de cadáveres que aparecen en las costas. Además, muchas veces la identificación de la especie en zifios varados supone un desafío debido a que presentan rasgos morfológicos similares y el único criterio para diferenciar la especie es el lugar en el que hace erupción un único par de dientes en la mandíbula de los zifios adultos macho. El objetivo de este trabajo fue confirmar la especie y el sexo de dos animales identificados inicialmente, pero sin certeza absoluta, como zifios de Sowerby (*Mesoplodon bidens*). Para ello se realizaron estudios anatómicos (disección y biometrías), tomografía computarizada (TC) y análisis genéticos moleculares (PCR y secuenciación). Los resultados de los estudios de TC de la cabeza mostraron que ambos ejemplares exhibían en huesos y tejidos blandos características morfológicas compatibles con *M. bidens*. En la disección de los tejidos blandos se observaron dos surcos paralelos en el suelo de la cavidad espiracular, hallazgo que permitió identificar a los dos individuos como zifios de Sowerby, ya que es la única especie de zifio que presenta esta peculiaridad morfológica en el sistema de sacos nasales. El estudio genético consistió en la amplificación y secuenciación de la región control del ADN mitocondrial en los tres zifios; las secuencias resultantes se contrastaron con las bases de datos nBLAST (NCBI) y DNA Surveillance, identificándolos inequívocamente como zifios de Sowerby. En paralelo, la amplificación de los intrones *Zfx* y *Zfy* de los cromosomas sexuales reveló un cariotipo XY, identificando a ambos individuos como machos. Estos hallazgos demuestran que se pueden emplear distintas metodologías para la identificación de la especie en zifios varados, pero la genética molecular es la herramienta más fiable, por lo que se recomienda su inclusión en los protocolos de la Red de Varamientos en Galicia para asegurar la identificación de especie en casos dudosos.

Palabras clave: zifio de Sowerby, *Mesoplodon bidens*, cetáceo, odontoceto, cabeza, tomografía computarizada, disección, biometrías, genética molecular.



ABSTRACT

Ziphiids are odontocete cetaceans about which very little is known, as they inhabit deep waters and exhibit elusive behavior; consequently, much of our knowledge comes from the study of carcasses stranded on shore. Moreover, species identification in stranded ziphiids is often challenging due to overlapping morphological traits, and the only diagnostic character in adult males is the eruption site of the single pair of mandibular teeth. The objective of this work was to confirm species and sex of two specimens initially, but not definitively, identified as Sowerby's beaked whale (*Mesoplodon bidens*). To this end, we carried out anatomical studies (dissection and morphometric measurements), computed tomography (CT), and molecular-genetic analyses (PCR and sequencing). CT studies of the head revealed morphological features in bones and soft tissues consistent with *M. bidens*. In the dissection of the soft tissues, two parallel grooves in the floor of the spiracular cavity were observed, a finding that allowed us to identify the two individuals as Sowerby's beaked whales, since it is the only species of beaked whale that presents this morphological peculiarity in the nasal sac system. The genetic analysis consisted of amplifying and sequencing the mitochondrial control region in all three specimens; the resulting sequences were compared against the NCBI nBLAST and DNA Surveillance databases, unequivocally confirming them as *M. bidens*. Simultaneously, amplification of the *Zfx* and *Zfy* introns from the sex chromosomes revealed an XY karyotype, identifying both individuals as males. These findings demonstrate that, although multiple methodologies can be employed for species identification in stranded ziphiids, molecular genetics is the most reliable approach, and its inclusion in the Galicia Stranding Network protocols is therefore recommended to ensure accurate species assignment in ambiguous cases.

Keywords: Sowerby's beaked whale, *Mesoplodon bidens*, cetacean, odontocete, computed tomography, morphometrics, molecular genetics.



RESUMO

Os cifios son cetáceos odontocetos dos que se dispón de moi pouca información, xa que habitan augas profundas e presentan un comportamento esquivo; por iso, gran parte do que se sabe provén do estudo dos cadáveres que aparecen na costa. Ademais, a identificación da especie en cifios varados supón con frecuencia un desafío debido ó solapamento de caracteres morfolóxicos, e o único criterio diagnóstico en machos adultos é o punto de erupción do único par de dentes mandibulares. O obxectivo deste traballo foi confirmar a especie e o sexo de dous exemplares inicialmente, pero non de xeito definitivo, identificados como cifios de Sowerby (*Mesoplodon bidens*). Para iso realizáronse estudos anatómicos (disección e biometrías), tomografía computarizada (TC) e análises xenético-moleculares (PCR e secuenciación). Os resultados dos estudos de TC da cabeza mostraron que os dous exemplares exhibían en ósos e tecidos brandos características morfolóxicas compatibles con *M. bidens*. Na disección dos tecidos brandos observáronse dous sucos paralelos no chan da cavidade espiracular, achado que permitiu identificar aos dous individuos como cifios de Sowerby, xa que é a única especie de cifio que presenta esta peculiaridade morfolóxica no sistema de sacos nasais. O estudo molecular consistiu na amplificación e secuenciación da rexión de control do ADN mitocondrial en todos os exemplares; as secuencias obtidas comparáronse coas bases de datos nBLAST (NCBI) e DNA Surveillance, confirmándoos sen ambigüidade como *M. bidens*. En paralelo, a amplificación dos intróns *Zfx* e *Zfy* dos cromosomas sexuais revelou un cariotipo XY, identificando ambos exemplares como machos. Estes achados demostran que, aínda que se poden empregar diversas metodoloxías para a identificación da especie en cifios varados, a xenética molecular é a ferramenta máis fiable, polo que se recomenda a súa inclusión nos protocolos da Rede de Varamientos de Galicia para garantir a asignación correcta da especie en casos dubidosos.

Palabras chave: cifio de Sowerby, *Mesoplodon bidens*, cetáceo, odontoceto, tomografía computarizada, disección, biometrías, xenética molecular.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cetáceos	2
1.2. Zifios	3
1.3. Zifio de Sowerby	7
1.3.1. Características morfológicas	7
1.3.2. Distribución y hábitat.....	8
1.3.3. Ecología y biología	8
1.3.4. Comportamiento y dinámica social.....	9
1.4. Estado de conservación y principales amenazas en zifios	10
1.5. Análisis genético molecular en zifios	10
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1. Animales	11
3.2. Tomografía computarizada	12
3.3. Estudio anatómico	13
3.3.1. Disección.....	13
3.3.2. Biometrías	13
3.4. Estudio de genética molecular	15
3.4.1. Extracción de ADN	15
3.4.2. Cuantificación y preparación de alícuotas para PCR.....	16
3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	16
3.4.4. Protocolo de secuenciación para la identificación de la especie.....	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Tomografía computarizada	18
4.2. Disección	23
4.2.1. Zifio sin datos (MBI-SD)	23
4.2.2. Zifio varado en Xove (MBI-XO)	25
4.3. Biometrías	27
4.3.1. Biometrías del cráneo.....	27
4.3.2. Biometrías de la mandíbula.....	28
4.4. Estudios de genética molecular	30
4.4.1. Resultados de la identificación del sexo	30
4.4.2. Resultados de la identificación de la especie	31
5. DISCUSIÓN	33
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38



ABREVIACIONES

- **BLAST:** siglas en inglés de “Basic Local Alignment Search Tool”.
- **BLASTn:** siglas en inglés de “Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides”.
- **CEMMA:** Coordinadora para o Estudo dos Mamíferos Mariños.
- **dNTP:** Dinucleótido trifosfato.
- **LCB:** Longitud cóndilobasal (longitud total de la cabeza).
- **LM:** Longitud mandibular (longitud total de la mandíbula).
- **MBI – AC:** *Mesoplodon bidens* – A Coruña.
- **MBI – SD:** *Mesoplodon bidens* – Sin Datos.
- **MBI – XO:** *Mesoplodon bidens* – Xove.
- **MLDB:** siglas en inglés de “Monkey Lips/Dorsal Bursae”.
- **ONG:** Organización No Gubernamental.
- **PCR:** siglas en inglés de “Polymerase Chain Reaction”.
- **SDS:** siglas en inglés de “Sodium Dodecyl Sulfate”.
- **TBE:** siglas en inglés de “Tris-Borate-EDTA”.
- **TC:** Tomografía Computarizada.
- **TE:** Tris-EDTA
- **UICN:** Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.
- **WL:** siglas en inglés de “Window Level”.
- **WW:** siglas en inglés de “Window Widt”.



1. INTRODUCCIÓN

En las aguas que bañan las costas de Galicia se han documentado 24 especies de cetáceos: la mayoría de especies son residentes, puesto que se las puede avistar todo el año, otras son transeúntes y solo se observan en determinadas épocas del año pasando cerca de nuestras costas en sus movimientos migratorios, y unas pocas son infrecuentes porque solo se tiene constancia de su presencia por la aparición de animales varados vivos o muertos de forma esporádica (P. Covelo, CEMMA, comunicación personal, 3 de junio de 2025). Esta gran abundancia y diversidad explica el elevado número de varamientos de cetáceos que se registran todos los años y que muestra una tendencia claramente en aumento: 250 cetáceos varados en 2022, 592 en 2023 y 614 en 2024 (REVARGAL, 2022 y 2023; P. Covelo, CEMMA, comunicación personal, 3 de junio de 2025). La Red de Varamientos de Galicia (sostenida por la ONG Coordinadora para el Estudio de los Mamíferos Mariños, CEMMA) es la responsable de la asistencia a los varamientos de animales marinos en la costa gallega, ya sean animales vivos o cadáveres, pero también se encarga de elaborar estudios poblacionales para saber el estado de las distintas especies presentes en estas aguas y analizar sus tendencias y, de ser necesario, ayudar en la elaboración de planes de conservación, recuperación y gestión adaptativa de las poblaciones (CEMMA, 2025).

Uno de los requisitos indispensables para obtener datos de confianza sobre los que trabajar es realizar una identificación correcta de las especies implicadas en los varamientos. Esto es especialmente complicado cuando se encuentran cadáveres que no permiten diferenciar de forma inequívoca a qué especie pertenecen, ya sea por cambios en su coloración ante una putrefacción moderada, por mostrar múltiples cambios morfológicos debido a un estado avanzado de putrefacción, o porque tan solo llegan a la costa restos parciales del individuo. Si además la especie implicada vara esporádicamente por no ser habitual, o hay varias especies muy similares en su morfología externa, la identificación es mucho más compleja o imposible (Jefferson *et al.*, 1993 y 2015). En estos casos el personal de la red de varamientos tiene que llevar a cabo una recogida de muestras que permita hacer estudios adicionales para llegar al diagnóstico de especie; estos estudios pueden ser sencillos como radiológicos o anatómicos, o más complejos como los genéticos (Geraci & Lounsbury, 2005; Jauniaux *et al.* 2019; Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2022). Aun así, es preciso tener en cuenta que hay especies de cetáceos para las que todavía no hay suficientes estudios realizados, especialmente si se trata de los zifios, unos cetáceos odontocetos de los que se tiene muy poca información. En los zifios muchas veces las especies se diferencian, y solo cuando se trata de machos adultos, por el lugar donde hace erupción en la mandíbula su único par de dientes (MacLeod, 2018).



En este trabajo se han empleado estudios de anatomía (disección y biometrías), diagnóstico por imagen (tomografía computarizada) y genéticos (PCR y secuenciación) sobre tres ejemplares de zifios para identificar de forma inequívoca a qué especie pertenecían. El primero de ellos era un macho adulto joven que mostraba características morfológicas propias de un zifio de Sowerby (*Mesoplodon bidens*) y su varamiento supuso el cuarto registro de esta especie en Galicia desde que en 1995 se estableció la Red de Varamientos de Galicia. El segundo ejemplar era un zifio macho juvenil que por su aspecto externo parecía un zifio de Sowerby, pero no encajaba completamente en los estándares morfológicos de la especie. Y el tercer ejemplar correspondía a una cabeza de un zifio almacenada en congelación como mínimo desde 2013 e identificada como zifio de Sowerby de la que no constaba ningún dato de edad, sexo o lugar de varamiento.

1.1. Cetáceos

Los cetáceos pertenecen al infraorden Cetacea que se integra dentro del orden Artiodactyla (Committee on Taxonomy, 2024). Evolucionaron hace aproximadamente 50 millones de años, durante el Eoceno, a partir de mamíferos terrestres: su origen concreto se halla en los artiodáctilos, un grupo de mamíferos con pezuñas que incluye a animales como hipopótamos y ciervos, agrupándose por ello en la misma rama evolutiva (Fordyce, 2018; Genomics & Mancina, 2018; Thewissen *et al.*, 2009). El registro fósil documenta en detalle la transición de los cetáceos de la tierra al agua. Los primeros cetáceos, como *Pakicetus* y *Ambulocetus*, eran anfibios que necesitaban completar su ciclo vital en tierra, pero a lo largo del tiempo desarrollaron adaptaciones especializadas para un estilo de vida completamente acuático. Estos fósiles en su mayoría fueron descubiertos en Pakistán e India y documentan la evolución gradual hacia los cetáceos completamente acuáticos que vemos en la actualidad (Thewissen *et al.*, 2007 y 2009). Taxonómicamente, los cetáceos incluyen más de 90 especies reconocidas según la Society for Marine Mammalogy y se dividen en dos parvódenes: Odontoceti (cetáceos dentados, como delfines y orcas) y Mysticeti (cetáceos con barbas, como las ballenas jorobadas y azules) (Committee on Taxonomy, 2024). Los odontocetos poseen dientes, un único orificio nasal denominado espiráculo y además han desarrollado la capacidad de ecolocalizar; los mysticetos carecen de dientes ya que obtienen el alimento filtrando el agua mediante unas placas córneas (barbas) y presentan dos espiráculos (Berta *et al.*, 2015).

En cuanto a la morfología, los cetáceos han desarrollado cuerpos completamente adaptados a la vida acuática. Presentan una forma hidrodinámica, con extremidades anteriores modificadas para adquirir forma de aletas pectorales y una cola potente que finaliza en una aleta compuesta por dos lóbulos horizontales. Aunque carecen de extremidades posteriores visibles, aún conservan vestigios de ellas en forma de pequeños huesos embebidos en la musculatura. Otras características esenciales de su adaptación al medio acuático es la pérdida de pelo de cobertura y la adquisición



de una gruesa hipodermis compuesta de grasa que se denomina en inglés “blubber”: esta capa de grasa les permite mantener la temperatura corporal en el agua (Berta *et al.*, 2015; Reidenberg, 2007).

1.2. Zifios

Los zifios, conocidos también como ballenatos de hocico o ballenas picudas (del inglés *beaked whales*), constituyen uno de los grupos de mamíferos marinos más esquivos y menos conocidos. Aunque su estudio comenzó a tomar relevancia en la segunda mitad del XIX, la escasa información disponible sobre su biología proviene del análisis de ejemplares varados, en su mayoría cadáveres o restos óseos (Mead, 2009; Smith *et al.*, 2021). Esto se debe a las características propias de este grupo de odontocetos: viven en aguas profundas, suelen formar grupos de pocos individuos, presentan una coloración gris, carecen de aleta dorsal prominente, son muy discretos en sus actividades en superficie y tienden a evitar activamente los buques de investigación (MacLeod, 2018; Smith *et al.*, 2021).

A nivel taxonómico, son cetáceos odontocetos que pertenecen a la familia Ziphiidae, la cual se divide en dos subfamilias principales: Ziphiinae e Hyperoodontinae. Actualmente se reconocen 23 especies distribuidas en cinco géneros, todas adaptadas a un estilo de vida pelágico en aguas profundas, donde se alimentan de calamares y peces (Mead, 2009; Smith *et al.*, 2021).

Estos mamíferos marinos son de tamaño mediano a grande, con individuos adultos que miden entre 3 y 13 m desde el extremo del hocico hasta el borde de la aleta caudal. Presentan aletas pectorales relativamente pequeñas que se adaptan a unas depresiones del tórax para mejorar su perfil hidrodinámico. La aleta dorsal es pequeña, triangular y se ubica en el tercio posterior del cuerpo. La aleta caudal es grande y ambos lóbulos no están separados por una hendidura como en el resto de cetáceos (MacLeod, 2018) (**Figura 1**).



Figura 1: Ilustración de un ejemplar de zifio de True (Mesoplodon mirus). Se pueden observar las principales características morfológicas externas de los zifios: hocico pronunciado, aletas pectorales pequeñas, aleta dorsal pequeña y triangular ubicada en el tercio posterior, y aleta caudal grande sin hendidura en su borde caudal. Fuente: Sergio H. Bello (Carrillo & Tejedor, 2007).



En la región de la cabeza se localizan muchos detalles morfológicos que son exclusivos de este grupo de odontocetos. Se caracterizan por tener un rostro u hocico alargado y presentar una reducción notable de la dentición: la mayor parte de las especies de zifios conservan un solo par de dientes funcionales en la mandíbula que sobresalen de las encías únicamente en los machos adultos, mientras que en las hembras y en los juveniles permanecen ocultos. Este dimorfismo sexual parece estar asociado al comportamiento social y no a la forma de adquirir el alimento, ya que es frecuente observar, al igual que en otros cetáceos, marcas de dientes por el cuerpo debido a interacciones con otros ejemplares de la misma especie (Carrillo & Tejedor, 2007; MacLeod & Herman, 2004).

Los zifios se alimentan por succión y, para ello, presentan un complejo hiolingual (aparato hioideo y musculatura asociada a estos huesos y a la lengua) tremendamente desarrollado: la movilización brusca en dirección caudal de este complejo genera una elevada presión negativa en la cavidad oral que atrae a las presas situadas inmediatamente delante de su hocico. Para aumentar la capacidad de la cavidad oral, su suelo se deprime gracias a la presencia de dos surcos profundos en la piel del espacio intermandibular, con forma de “V” y con el vértice apuntando hacia rostral (Berta *et al.*, 2015; Heyning & Mead, 1996).

Por otro lado, el cráneo de los zifios (**Figura 2**) posee una gran depresión facial dorsal como los delfinidos, pero su margen posterior se encuentra mucho más elevado y finaliza dorsalmente en un vértice muy prominente; el arco cigomático está reducido a una frágil varilla ósea y no se puede observar en una vista dorsal; el rostro está integrado por los huesos incisivo (o premaxilar), maxilar y vómer muy alargados; el hueso palatino es convexo; y los huesos pterigoides son gruesos, robustos y carecen de lámina lateral (Rommel *et al.*, 2006).



Figura 2: Esqueleto de la cabeza de zifio de Cuvier (*Ziphius cavirostris*). Izquierda: vista lateral izquierda del cráneo de una hembra adulta. Se puede apreciar el perfil convexo típico de los zifios, con un margen posterior elevado que finaliza dorsalmente en un vértice prominente (flecha negra), un arco cigomático pequeño (flecha verde). Derecha: vista dorsal de un cráneo de un macho adulto. Se puede apreciar el vértice (flecha negra) y la marcada asimetría facial, con el lado derecho (flecha roja) más desarrollado que el izquierdo. Fuente: modificado de Miján (2011).



Como en el resto de los odontocetos, el vestíbulo nasal (parte de la cavidad nasal que queda fuera de la calavera) es un pasaje o tracto nasal único, pero muy modificado porque forma dilataciones pares, el sistema de sacos nasales, y una constricción doble en la que se regula el paso de aire, los labios fónicos, estructuras que generan las vocalizaciones. El sistema de sacos nasales de los zifios muestra una marcada reducción y asimetría: el saco nasofrontal derecho está más desarrollado que el izquierdo, careciendo en gran medida de sacos accesorios que en otros odontocetos comunican las porciones superior e inferior del tracto nasal. Los sacos vestibulares están disminuidos o fusionados en una única cámara vestibular, resultado de la elongación secundaria del tracto nasal (**Figura 3**) (Schenkkan, 1973).

Los labios fónicos de los zifios son muy grandes y casi verticales. Este diseño facilita un cierre hermético del tracto nasal previo a la emisión sonora y, durante la fonación, el aire presurizado pasa a través de la comisura, haciendo vibrar los tejidos adyacentes e iniciando la señal acústica. Inmediatamente por debajo de los labios fónicos se sitúan dos pequeñas bolsas grasas (anterior y posterior) embebidas en la pared del tracto nasal. En los zifios las bolsas dorsales son especialmente prominentes en el lado derecho y, junto con un cartílago interpuesto, forman el complejo MLDB (*Monkey Lips/Dorsal Bursae*), identificado como el motor anatómico del biosonar o de la ecolocalización (Cranford *et al.*, 1996; Schenkkan, 1973).

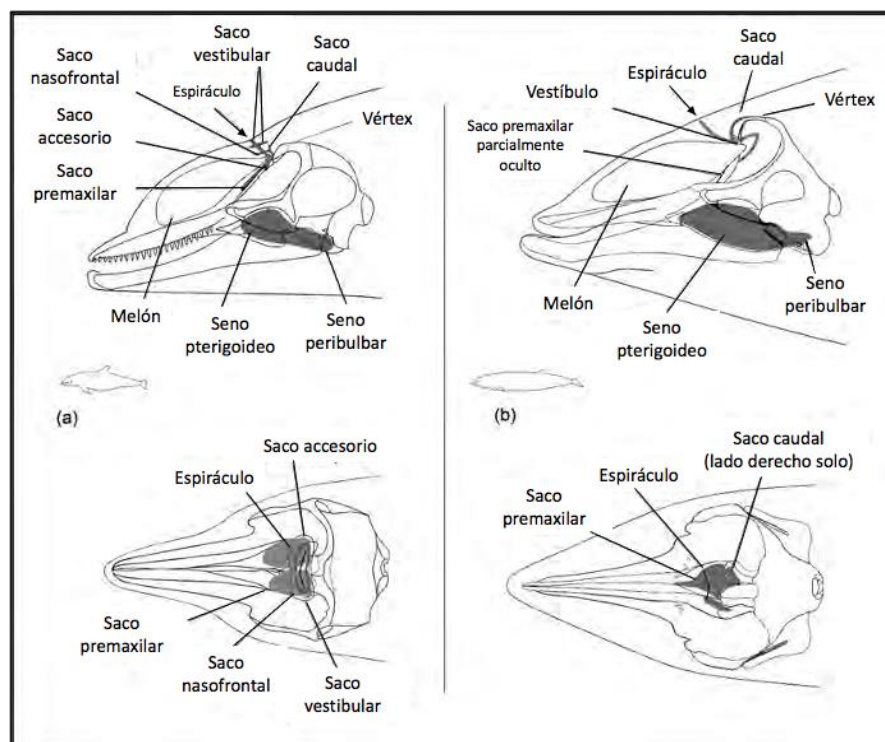


Figura 3: Vista lateral izquierda (arriba) y dorsal (abajo) de los senos extracraneales de *Tursiops* (a) y *Ziphius* (b). Las flechas señalan el espiráculo que es paralelo al vestíbulo. Los sacos aéreos y los senos asociados a la vocalización y ecolocalización están más desarrollados en los delfinidos que en los zifios. Fuente: modificado de Rommel *et al.* (2006).



En la gran concavidad dorsal al esqueleto de la cara se localizan dos masas de tejido graso especializadas en la conducción de los sonidos generados en el tracto nasal hacia el medio, el melón y el órgano *espermaceti*. El melón es una masa estratificada de tejido graso, rodeada por una capa conectiva denominada teca; el melón actúa en la ecolocalización como lente acústica para enfocar los *clicks* generados por el complejo MLDB hacia el medio (**Figura 4**). Por su parte, el órgano *espermaceti*, una estructura también grasa situada entre las porciones caudales del saco premaxilar, podría modular la impedancia y afinar la sintonía del sistema de fonación, aunque su función exacta en los zifios aún no se conoce (Cranford *et al.*, 1996; McKenna *et al.*, 2012).

Todas estas estructuras cooperan en la generación y emisión de sonidos: primero, la musculatura y el ligamento del espiráculo sellan el tracto nasal, permitiendo acumular alta presión interna sin fugas. Posteriormente, el aire presurizado hace vibrar los labios fónicos, transmitiendo las oscilaciones a las bolsas grasas (complejo MLDB) y dando lugar al pulso acústico. Finalmente, las ondas sonoras se reflejan en los sacos nasales y el cráneo, y salen del animal a través del órgano *espermaceti* y el melón en un haz estrecho y direccional (**Figura 4**) (Schenkkan, 1973; McKenna *et al.*, 2012).

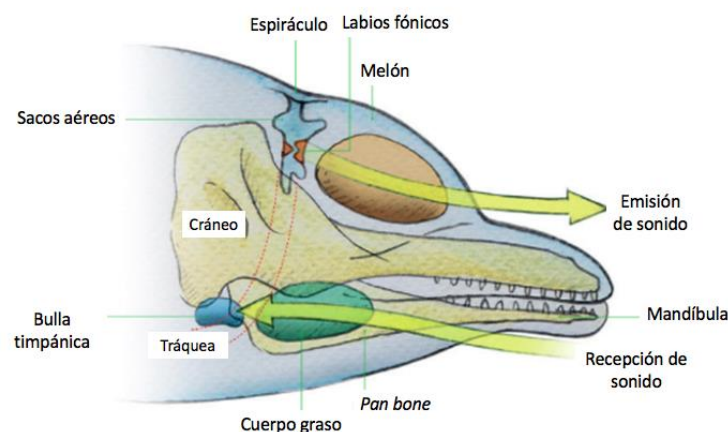


Figura 4: Estructuras implicadas en la generación y emisión de sonidos. Fuente: modificado de Berta *et al.* (2015).

La mandíbula de los zifios consta de dos hemimandíbulas unidas por una sínfisis rostral. En su tercio caudal, la pared ósea lateral se adelgaza hasta formar una lámina casi translúcida denominada *pan bone* que funciona como ventana acústica para las ondas sonoras. Medial a esta lámina se encuentra el cuerpo graso mandibular, que continúa hasta la bulla timpánica, estableciendo la vía principal de llegada del sonido desde el agua hasta el oído medio (**Figura 4**) (Cozzi *et al.*, 2016).

Puesto que este trabajo se centra en el zifio de Sowerby, se considera preciso abordar en profundidad diversos aspectos relacionados con esta especie.



1.3. Zifio de Sowerby

El zifio de Sowerby (*Mesoplodon bidens*) fue el primer zifio mesoplodonte descrito por James Sowerby en 1804, el cual lo describió a partir de un único ejemplar macho que varó en el estuario de Moray, Escocia, y lo nombró “bidens” debido a la presencia de solo dos dientes en la mandíbula (Carwardine, 2019).

1.3.1. Características morfológicas

En esta especie la longitud total llega a ser de 5 m en el caso de las hembras y 5,5 m en los machos, llegando a alcanzar un peso de 1000 y 1300 kg, respectivamente (Mead, 1989; Reidenberg & Laitman 2009).

La cabeza es afilada y cónica, con un pequeño y prominente melón que finaliza de forma suave para continuar la cara en un pico bastante largo y definido. La línea de la boca es larga y algo arqueada en su parte caudal. Las aletas pectorales son pequeñas y emplazadas hacia ventral. La aleta dorsal es triangular y con el margen posterior ligeramente cóncavo, mientras que la aleta caudal es ancha y sin muesca media entre ambos lóbulos. El dorso es de color oscuro que se va aclarando progresivamente hacia el vientre, pudiendo llegar a alcanzar tonos beige o blancos (**Figura 5**) (Jefferson *et al.*, 2015). Los machos y las hembras son dimórficos: los machos que han alcanzado la madurez sexual muestran un par de colmillos en la mitad de la mandíbula (**Figura 5**), quedando situados en el tercio posterior de la línea de la boca. Las hembras presentan este par de dientes de menor tamaño y no llegan a hacer erupción (MacLeod & Herman, 2004). Como se mencionó en el apartado anterior, la colocación de los dientes es una característica distintiva entre los zifios y una herramienta de diagnóstico para diferenciar a los zifios de Sowerby de otros zifios mesoplodontes del Atlántico Norte (Smith *et al.*, 2021).



Figura 5: Zifio de Sowerby macho (*Mesoplodon bidens*). En la imagen se detallan y se señalan con flechas las características de la especie. Fuente: modificada de Jefferson *et al.* (2015).



1.3.2. Distribución y hábitat

El zifio de Sowerby habita las aguas templadas-frías del Atlántico Norte, desde Noruega hasta las Islas Canarias en el este y desde Terranova hasta el noreste de EE. UU., aunque se han recolectado especímenes tan al sur de los EE. UU. como Florida y Georgia (**Figura 6**). La profundidad de las aguas en que han tenido lugar los avistamientos oscila entre los 200 y los 1500 m (Carwardine, 2019; Martín *et al.*, 2011).

Existen zonas donde su distribución se solapa con la de otras especies del género *Mesoplodon*, como los zifios de True (*Mesoplodon mirus*), Gervais (*Mesoplodon europaeus*) y Blainville (*Mesoplodon densirostris*) (Reeves *et al.*, 2005).

Se trata de la especie más frecuente en los varamientos en las costas del norte de Europa y del mar del Norte. También se han registrado avistamientos frente a la costa occidental de Irlanda, lo que sugiere una distribución más amplia. A pesar de ser la especie más frecuente, los varamientos son ocasionales, por lo que sigue siendo poco conocida. Suele encontrarse en zonas con una topografía compleja del lecho marino, lo que indica una preferencia por aguas profundas, más allá del borde de la plataforma continental (Jefferson *et al.*, 2015).



Figura 6: Distribución del zifio de Sowerby. El sombreado gris indica el ámbito de distribución habitual de la especie. Las interrogaciones indican un ámbito distributivo posible. Fuente: modificado de <https://uk.whales.org/whales-dolphins/species-guide/sowerbys-beaked-whale/>.

1.3.3. Ecología y biología

El desarrollo de la ecolocalización y de las capacidades de buceo en apnea ha permitido la distribución de los odontocetos en una amplia gama de nichos acuáticos, incluidas las profundidades marinas, donde acceden a una fauna estable, diversa y abundante (Visser *et al.*, 2022).



La dieta de los zifios de Sowerby se caracteriza principalmente por un consumo predominante de peces mesopelágicos y, en menor medida, de cefalópodos. En el estudio de Pereira *et al.* (2011) se identificaron otolitos de peces pertenecientes a 15 familias diferentes y mandíbulas de cefalópodos de tres familias, con una representación total de 22 taxones, mostrando que estos zifios presentan flexibilidad dietética, pudiendo ajustar sus patrones de alimentación en función de la disponibilidad de estas presas en su entorno.

La información sobre la reproducción de estos animales es aún muy escasa, y se desconoce tanto la edad exacta de madurez sexual como la época de apareamiento. En hembras el único método definitivo para confirmar la madurez es la detección de cuerpos lúteos o folículos dominantes en los ovarios mediante necropsia e histología. Para los machos la madurez sexual se evalúa examinando el tamaño de los testículos (el umbral funcional mínimo es de 0,3-0,7 kg por testículo) y comprobando la presencia de espermatozoides maduros en los túbulos seminíferos mediante histología. Además, la erupción completa de los colmillos y la aparición de cicatrices en el dorso son indicadores de participación en combates reproductivos, lo que coincide con la madurez (Würsig & Orbach, 2023).

En estudios de campo se han registrado dos hembras con longitudes de 4,83 y 5,05 m habían alcanzado la madurez sexual, mientras que no fue así para otra hembra de 4,62 m. Respecto a los machos, los ejemplares de menos de 5 m suelen considerarse inmaduros, ya que las características sexuales secundarias tienden a manifestarse alrededor de una longitud de 4,72 m (Ledwell *et al.*, 2005; Lien & Barry, 1990); sin embargo, un estudio indicó que en el Atlántico oriental los machos de 4,7 m tenían atributos de madurez sexual (MacLeod & Herman, 2004), por lo que las variaciones en el desarrollo podrían estar sujetas a la distribución geográfica.

Se estima que los zifios de Sowerby presentan un periodo de gestación de aproximadamente 12 meses. En cuanto al tamaño al nacimiento, se han documentado fetos de hasta 1,57 m, y crías de 2,45 m, lo que estima una longitud al nacer de 2,4–2,7 m (Mead 1984; O'Callaghan *et al.*, 2022; Reidenberg & Laitman, 2009). Estos datos constituyen algunos de los primeros indicadores sobre la biología reproductiva y el crecimiento temprano de la especie, aunque todavía se carece de información detallada sobre su fenología reproductiva y los intervalos entre partos.

1.3.4. Comportamiento y dinámica social

A pesar de los pocos datos disponibles debido a su naturaleza esquiva, se sabe que forman grupos de 3-10 individuos entre los que pueden aparecer varias parejas de madres-crías y hasta cuatro machos adultos en el mismo grupo (Jefferson *et al.* 2015).

Todas las especies de zifios realizan inmersiones profundas en busca de alimento, intercalándolas con inmersiones más superficiales en las que se elimina el nitrógeno acumulado para evitar la enfermedad por descompresión. Se cree que esta estrategia de buceo ayuda a realizar inmersiones extremadamente largas y profundas. El patrón de inmersión de esta especie es desconocido, pero



se sabe que realizan inmersiones de 12 a 28 minutos (Hooker & Baird, 1999). Además, se conoce que comienzan a hacer chasquidos de ecolocalización cuando ya han alcanzado la mayor profundidad de la inmersión y hacen su primer intento de captura de presas (Visser *et al.*, 2022).

1.4. Estado de conservación y principales amenazas en zifios

Según las categorías y los criterios establecidos en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2020) la mayoría de los zifios se consideran como especies de preocupación menor (LC: “Least concern”) o con datos insuficientes (DD: “Data deficient”). Sin embargo, algunas especies como *Mesoplodon perrini* y *Mesoplodon stejnegeri* están categorizadas como especie amenazada (EN: “Endangered”) y especie casi amenazada (NT: “Near Threatened”), respectivamente. En el caso del zifio de Sowerby (*Mesoplodon bidens*), se encuentra dentro de la categoría de preocupación menor (Pitman & Brownell, 2020).

Las principales amenazas para los zifios son las colisiones con embarcaciones, el ruido submarino y los desechos a la deriva. El aumento del tráfico marítimo ha incrementado los impactos contra los cetáceos, cuyos ejemplares a menudo aparecen varados con profundos cortes e incluso seccionados. Además, el empleo de sonares militares de baja frecuencia y gran alcance induce embolias gaseosas y lipídicas que resultan letales. Por último, la proliferación de plásticos y otros residuos flotantes, procedentes tanto de vertidos urbanos como de la pesca, lleva a la ingestión accidental de fragmentos durante la caza o el juego, estos materiales no biodegradables pueden causar obstrucciones intestinales fatales (Carrillo & Tejedor, 2007).

1.5. Análisis genético molecular en zifios

Como se mencionó anteriormente, la identificación de la especie en los zifios se basa principalmente en características de la morfología externa que, para algunas especies, son diagnósticas solo en animales maduros; además muchas especies son muy similares en apariencia haciendo que frecuentemente se identifiquen erróneamente (Dalebout *et al.*, 2004).

Con el desarrollo de la caracterización genética, a partir de tejidos de zifios varados es posible obtener su ADN y compararlo con una colección de referencia para determinar la especie. Esta herramienta molecular ha simplificado la recopilación de datos con fines taxonómicos a partir de cadáveres que anteriormente requerían la preparación o disección del cráneo y de la mandíbula de todos los especímenes. La utilidad de esta metodología es innegable para el avance del conocimientos sobre los zifios ya que recientemente se ha podido descubrir una nueva especie de mesoplodonte, *Mesoplodon perrini*, sobre la base de su perfil genético único (Dalebout *et al.*, 1998; Waller, 2014).



Sobre el zifio de Sowerby en concreto hay poca información genética disponible. Como dato llamativo se ha sugerido que esta especie podría ser el miembro más basal del género *Mesoplodon* en base a los resultados obtenidos de los análisis mitocondriales y nucleares (Einfeldt *et al.*, 2019).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo fue realizar la identificación inequívoca de la especie y del sexo en dos ejemplares de zifios empleando un tercer individuo como referencia, ya que este último se había identificado con anterioridad como un macho adulto joven de zifio de Sowerby (*Mesoplodon bidens*) por sus características morfológicas externas y posteriores estudios anatómicos y de diagnóstico por imagen (Román López, 2024). Los dos ejemplares sin identificar habían sido clasificados de forma provisional tras su varamiento como zifios de Sowerby, por lo que esa era la **hipótesis de partida**. Para validar dicha hipótesis se plantearon una serie de **objetivos específicos**:

- Realizar estudios anatómicos mediante la disección de la cabeza y la obtención de biometrías de cráneo y mandíbula en los dos zifios problema. Comparar estos resultados con los del macho adulto joven de zifio de Sowerby y con los publicados para un macho adulto (Martín *et al.*, 2011).
- Realizar estudios radiológicos de tomografía computarizada (TC) de la cabeza e interpretar las imágenes para los dos zifios problema. Comparar estos resultados con los obtenidos previamente en el macho adulto joven de zifio de Sowerby.
- Realizar estudios genéticos de los tres zifios mediante amplificación de material genético por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación para identificar/confirmar especie y sexo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales

Los estudios se llevaron a cabo en tres ejemplares de zifios:

- **MBI-AC (*Mesoplodon bidens* – A Coruña)**: un macho adulto joven de 412 cm de longitud total varado en el Puerto de Oza (A Coruña) el 18 de mayo de 2021. El personal de la Red de Varamientos de Galicia lo identificó como zifio de Sowerby porque su morfología externa encajaba con las características propias de la especie (forma de la cabeza y lugar de erupción de los dientes); como macho por las hendiduras propias del sexo en la parte ventral (hendidura genital y ano), por la presencia del par de dientes visibles en la mandíbula y, en la necropsia, por la presencia de pene y testículos; y como joven adulto por la longitud total (los machos



adultos superan los 5 m) y porque los dientes ya habían hecho erupción completamente. Este ejemplar fue posteriormente confirmado como zifio de Sowerby (*Mesoplodon bidens*) tras disección y análisis osteológico de la cabeza y estudio TC craneal (Román López, 2024).

- **MBI-XO (*Mesoplodon bidens* – Xove):** macho juvenil de 449 cm de longitud total varado en la Playa de Lago (Xove, Lugo) el 20 de octubre de 2022. El personal de la Red de Varamientos de Galicia lo identificó como posible zifio de Sowerby porque, aunque su morfología externa encajaba con las características propias de la especie (forma de la cabeza y lugar de erupción de los dientes), por su longitud total ya deberían haber hecho erupción los dientes y, sin embargo, todavía estaban embebidos en las encías; como macho por las hendiduras propias del sexo en la parte ventral (hendidura genital y ano) y, en la necropsia, por la presencia de pene; y como juvenil por la longitud total (los machos adultos superan los 5 m) y los dientes todavía no habían hecho erupción.
- **MBI-SD (*Mesoplodon bidens* – Sin Datos):** en este caso se trataba de la cabeza de un zifio joven almacenada en congelación como mínimo desde 2013 e identificado sin certeza como zifio de Sowerby; de este individuo no se tenía ningún dato (longitud total, sexo, lugar de varamiento...). Por el tamaño de la cabeza se trataba de un animal joven y, además, los dientes todavía no habían hecho erupción, aunque se palpaban embebidos en las encías.

Las cabezas de los tres ejemplares junto con las primeras vértebras cervicales fueron trasladadas a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) y almacenadas en congelación a -20 °C hasta su procesamiento.

3.2. Tomografía computarizada

Las pruebas de diagnóstico por imagen se realizaron el 30 de noviembre del 2022 en el Servicio de Diagnóstico por Imagen del Hospital Veterinario Universitario Rof Codina. Se empleó el equipo de Tomografía Computarizada (TC) Hitachi Eclis 16 multicorte, con la siguiente configuración: 120 kVp, 150 mA, 1,5 seg/rotación, y una matriz de 16 cortes x 0,625 mm. El grosor de corte varió en función del filtro empleado: 1,25 mm para las series realizadas con filtro hueso y 2,5 mm para las de tejido blando.

Tras la realización del estudio de TC, las imágenes se guardaron en formato DICOM y más tarde se importaron al programa Horos 3.0 en un ordenador MacBook Air (13-inch, 2017), con el que se reconstruyeron las cabezas en diferentes planos de corte (sección sagital, dorsal y transversal) y también se realizaron reconstrucciones tridimensionales. En el procesamiento de las imágenes para la visualización de estructuras óseas, se aplicó un nivel de ventana o “window level” (WL)= 300 UH y ancho de ventana o “window width” (WW)= 1500 UH. Para evaluar los tejidos blandos se utilizó un WL= 40 UH y WW= 350 UH. De este modo, el uso combinado de las dos configuraciones de ventana permitió una caracterización detallada de la anatomía craneal.



3.3. Estudio anatómico

Se realizaron disecciones de las cabezas de MBI-XO y MBI-SD en la sala de disección de Anatomía y Embriología Veterinaria de la Facultad de Veterinaria de la USC. La disección de cada cabeza duró aproximadamente 10 horas repartidas en dos días consecutivos. Las cabezas se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta cuatro días antes de su disección. El material empleado fue: bisturí (mango nº4, hojas nº 22), tijeras y pinzas con y sin dientes de ratón. Todo el proceso fue documentado mediante fotografías y vídeos realizados con una cámara Canon PowerShot G9 X.

Antes de comenzar la disección se tomaron muestras de piel, grasa y músculo de la región cervical para la realización de pruebas de genética molecular. Estas muestras se conservaron en congelación a -20 °C hasta su análisis.

3.3.1. Disección

Las cabezas de MBI-XO y MBI-SD se sometieron a disección siguiendo el siguiente protocolo. En primer lugar se realizó una inspección externa completa, anotando lesiones y alteraciones cutáneas en ojos, boca y espiráculo, y se midió la longitud del espiráculo, de los surcos ventrales y el diámetro ocular. A continuación, se eliminó toda la piel dorsal dejando únicamente intacta la zona próxima al espiráculo; después se retiraron los tejidos grasos y musculares más caudales para exponer la parte dorsal del cráneo con el vértice; rostralmente al espiráculo se retiró la teca para dejar expuesto el melón, cuyo tejido se diseccionó hasta dejar al descubierto el órgano *espermaceti* situado más caudalmente.

El espiráculo se retiró de su inserción caudal en el vértice y, mediante disección minuciosa, se extrajo el sistema de sacos nasales completo, conservando lo más intacta posible su estructura para el posterior análisis.

Se accedió a la cavidad oral ventralmente retirando los tejidos blandos del espacio intermandibular; a continuación se exteriorizó la lengua para facilitar la retirada en bloque de faringe, laringe, aparato hioideo e inicio de tráquea y esófago.

Finalmente se separó el cráneo de la mandíbula y se procedió a eliminar manualmente los tejidos blandos remanentes, dejando los huesos lo más limpios posible para facilitar su posterior preparación.

3.3.2. Biometrías

Los cráneos y las mandíbulas de los dos ejemplares diseccionados, ya limpios de la mayor parte de tejidos blandos, se colocaron en un habitáculo estanco que contiene una colonia de escarabajos derméstidos. Las larvas de estos insectos se alimentan de tejidos blandos putrefactos hasta que los huesos quedan lo suficientemente limpios para continuar su preparación; en este caso tardaron aproximadamente dos meses porque era invierno y la colonia no mostraba una gran actividad.



Una vez limpios, los huesos pasaron por congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h para eliminar larvas y huevos de derméstidos, después se lavaron con agua, se sumergieron en una solución de agua oxigenada al 3 % y se volvieron a lavar con agua. Una vez completado el proceso, los huesos se dejaron secar a temperatura ambiente.

Se realizaron biometrías craneales y mandibulares en los tres ejemplares: MBI-AC, MBI-XO y MBI-SD. Las medidas se tomaron con un pie de rey digital de 150 mm y se realizaron fotografías en vistas dorsal, ventral y lateral de los cráneos y las mandíbulas con una cámara Canon PowerShot G9 X.

La selección y el procesamiento de las variables métricas siguieron los protocolos descritos en el estudio de Kobayashi *et al.* (2021); como referencia para comparar las biometrías de los tres ejemplares se emplearon las medidas del zifio de Sowerby macho adulto del estudio de Martín *et al.* (2011) (MBI-control). Las medidas seleccionadas se muestran de forma gráfica en las **Figuras 7 y 8**.

Por último, con el objetivo de caracterizar la dispersión interna de la muestra ($n = 4$), para cada una de las medidas se calculó la media aritmética (\bar{x}), la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV%) en Microsoft Excel 2019 empleando las funciones “=PROMEDIO(muestra)”, “=DESVESTPA(muestra)” y “=(DESVESTPA(muestra)/PROMEDIO(muestra)*100)” respectivamente.

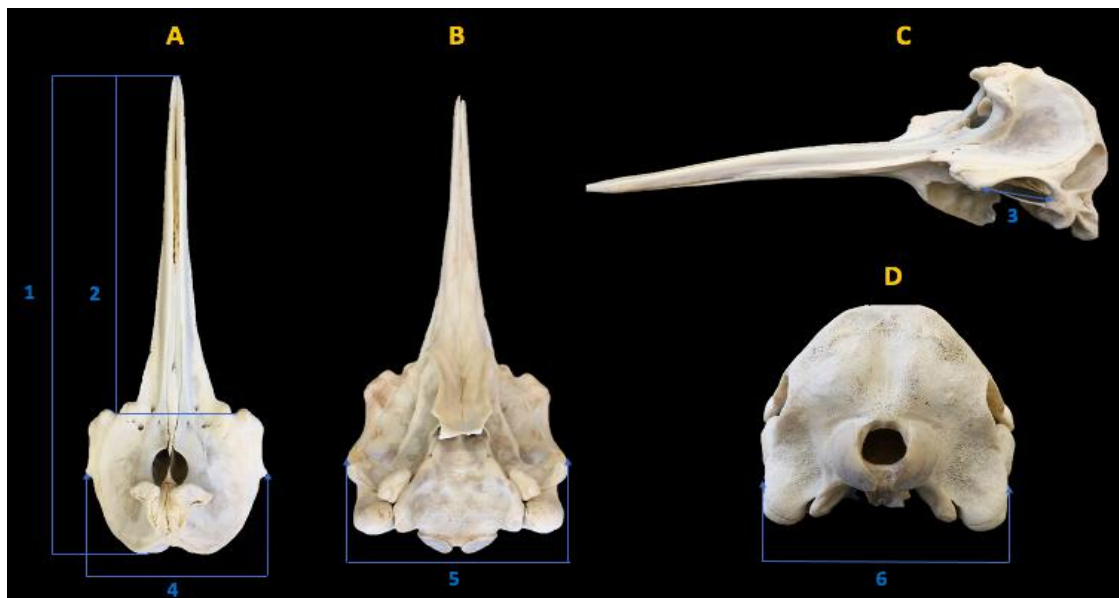


Figura 7: Medidas craneales sobre el ejemplar MBI-AC. (A) vista dorsal. (B) vista ventral. (C) vista lateral izquierda. (D) vista caudal. (1) longitud cóndilobasal (LCB), (2) longitud rostro, (3) longitud órbita (izquierda/derecha), (4) anchura del cráneo a nivel postorbital, (5) anchura del cráneo a nivel cigomático y (6) anchura del cráneo en exoccipitales. Fuente: elaboración propia.

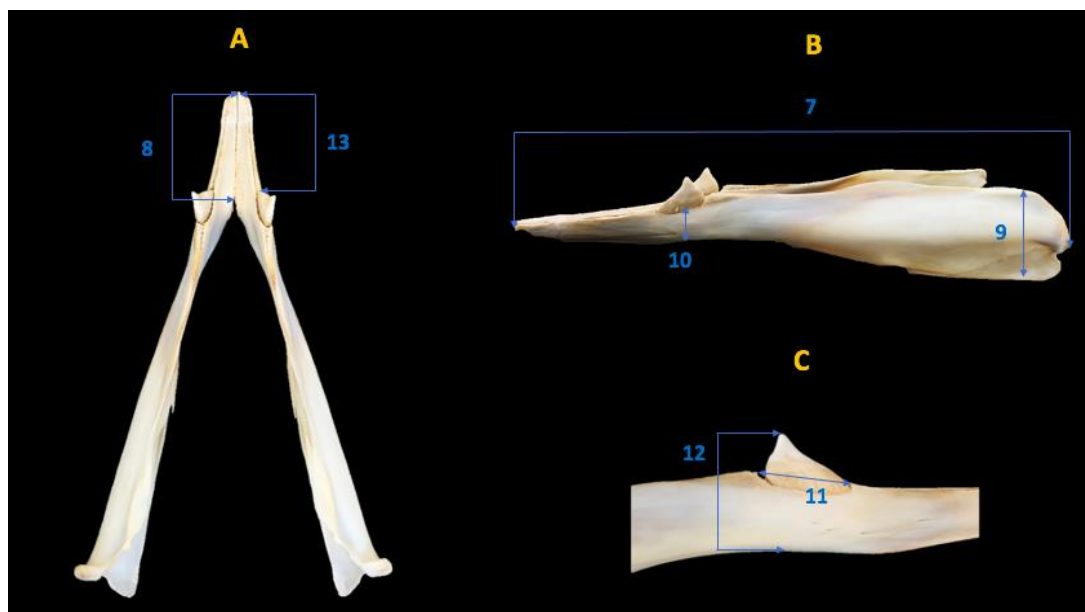


Figura 8: Medidas de la mandíbula sobre el ejemplar MBI-AC. (A) vista dorsal. (B) vista lateral izquierda. (C) vista lateral derecha. (7) longitud total de la mandíbula (LM), (8) longitud de la sínfisis (región fusionada), (9) altura de la mandíbula en el proceso coronoides, (10) altura externa de la mandíbula a nivel de alveolo, (11) longitud del alveolo, (12) longitud vertical del diente, (13) longitud pico-margen anterior alveolo. Fuente: elaboración propia.

3.4. Estudio de genética molecular

Para la identificación de la especie y del sexo se llevó a cabo una amplificación del material genético mediante PCR y una secuenciación. Estos procedimientos se realizaron en la Plataforma de Secuenciación e Xenómica Funcional de la USC.

3.4.1. Extracción de ADN

Como material de partida se empleó tejido muscular de los tres ejemplares obtenido de músculos profundos de la región de la cabeza. Las muestras se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ envueltas en papel de aluminio y en sobre de plástico herméticamente sellado e identificado con el código del ejemplar. La mezcla de lisis se preparó en tubos de 2 mL con tapón de rosca añadiendo 300 μL de tampón SSTNE (*sucrose-salt-Tris-NP-40-EDTA*) (pH 9,5), 30 μL de SDS 10X y 5 μL de Proteinasa K recombinante (20 mg/mL). A continuación, se incorporaron los trozos de 1-2 mm de tejido y se incubaron en rotación a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Tras una centrifugación breve (2 s) para eliminar restos adheridos al tapón y las paredes, las muestras se sometieron a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min y posteriormente se trataron con 3 μL de RNAsa (10 mg/mL) en rotación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1-2 h.

La precipitación salina se llevó a cabo añadiendo 240 μL de NaCl 5 M, invirtiendo seis veces, incubando 10 min en hielo y centrifugando 15 min a 13000 rpm. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se añadió 1 mL de etanol absoluto frío (previamente refrigerado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$),



invirtiendo hasta la aparición de hebras de ADN. Tras centrifugar 1 min a 13000 rpm y decantar el sobrenadante, el *pellet* se lavó con 500 μ L de etanol al 70% durante 90 min, se aspiró el etanol residual y se secó 5 min a 60 °C con la tapa abierta. Finalmente, el ADN se rehidrató en 60 μ L de tampón TE 0,25X a 60 °C durante 1 h con la tapa cerrada, y se almacenó a 4 °C agitando diariamente durante 3-4 días para asegurar completa hidratación.

3.4.2. Cuantificación y preparación de alícuotas para PCR

La concentración de ADN se midió por espectrofotometría (NanoDrop) usando 2 μ L de muestra. Todas las alícuotas se ajustaron a 30 ng/ μ L con agua Milli-Q (MQ). Cada reacción de PCR (volumen final 25 μ L) se compuso según el kit AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Gold Buffer & MgCl₂: 2 μ L de tampón, MgCl₂ y Taq Polimerasa; 0,5 μ L de mezcla de dNTP; agua MQ hasta el volumen final; 1 μ L de ADN (30 ng) y 0,5 μ M de cada cebador (Sigma-Aldrich). Para la **identificación de especie**, se emplearon los siguientes cebadores de la región control del ADN mitocondrial de acuerdo con el estudio de Dalebout *et al.* (2004):

- *Forward*: M13-Dlp1.5-L (500 pb):
5'-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-TCA-CCC-AAA-GCT-GRG-RTT-CTA-3'
- *Reverse*: Dlp5-H (424 pb):
5'-CCA-TCG-WGA-TGT-CTT-ATT-TAA-GRG-GAA-3'

Para la **identificación del sexo** se emplearon los siguientes cebadores de acuerdo con el estudio de Shaw *et al.* (2003):

- *Forward*: LGL331:
5'-CAA-ATC-ATG-CAA-GGA-TAG-AC-3'
- *Reverse*: LGL335:
5'-AGA-CCT-GAT-TCC-AGA-CAG-TAC-CA-3'

Estos cebadores permiten la amplificación de un intrón de los genes *Zfx* (zinc-finger protein X-linked) y *Zfy* (zinc-finger protein, Y-linked) presentes en los cromosomas sexuales. La variación de tamaño entre los intrones *Zfx* y *Zfy* permite diferenciar en el gel de agarosa hembras (una sola banda) de machos (dos bandas).

Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems 2720, se realizaron con temperatura de anillamiento para especie de 62 °C, y las de sexo a 58 °C.

3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los productos amplificados se preparó un gel de agarosa al 1,8% con tampón TBE 0,5X (35 mL), 0,63 g de agarosa y 1,75 μ L de SYBR Safe. A cada muestra (7 μ L de PCR) se añadió 1 μ L de Track DNA Loading Dye; además, se incluyó como marcador de peso molecular 1 μ L de GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Las muestras se cargaron y la electroforesis se ejecutó



a 30-50 V durante 90 min. Las bandas se visualizaron en un transiluminador Safe Imager (Invitrogen) y se registraron con el *software* Kodak Digital Science 1D.

3.4.4. Protocolo de secuenciación para la identificación de la especie

Tras la visualización de las bandas en el gel de agarosa se procedió a la purificación enzimática de cada reacción de PCR: por cada muestra (10 μ L de PCR) se añadieron 0,3 μ L de Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), 0,03 μ L de Exonucleasa I, 1,67 μ L de agua MQ, obteniendo un volumen final de 12 μ L. La mezcla se llevó a un termociclador a 37 °C durante 60 min y, a continuación, a 85 °C durante 15 min.

A continuación, se dispensaron 8 μ L de la siguiente mezcla en cada pocillo de una placa MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plante 0,1 mL, destinando un pocillo al cebador “forward” y el otro al cebador “reverse”:

- 1 μ L de cebador (3,2 mM)
- 2 μ L de buffer de secuenciación
- 0,5 μ L BDT (Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit)
- 4,5 μ L agua MQ

Finalmente se añadieron 2 μ L de producto de PCR purificado de cada muestra obteniendo un volumen total de 10 μ L en cada pocillo.

La placa se sometió a un programa en termociclador FAST (BigDye™ Terminator Cycling Protocol) con las siguientes etapas: desnaturalización inicial a 96 °C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 10 s a 96 °C, 5 s a 50 °C y 75 s a 60 °C. Los productos de secuenciación se purificaron por precipitación con etanol, donde a cada pocillo se le añadió:

- 10 μ L de agua MQ
- 5 μ L EDTA 125 mM
- 60 μ L de etanol absoluto frío

La placa se incubó a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 15 min. Seguidamente, se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min a 20 °C. Tras eliminar el sobrenadante, la placa se colocó boca abajo sobre papel de filtro y se centrifugó a 180xg durante 1 min a 20 °C para eliminar el líquido residual.

A continuación, la centrífuga se enfrió a 4 °C y se añadieron 60 μ L de etanol 70 % a cada pocillo. La placa se centrifugó a 1650xg durante 15 min a 4 °C. Después de desechar el sobrenadante, se repitió la centrifugación a 180xg durante 1 min a 20 °C con la placa invertida sobre papel de filtro. Finalmente, los *pellets* de ADN se resuspendieron en 10 μ L de formamida (Hi-Di Formamide Applied Biosystems), se desnaturalizaron a 95 °C durante 3 min y se llevaron al secuenciador 3500 XL Genetic Analyzer para su electroforesis.

Las secuencias consenso resultantes se sometieron a búsquedas de similitud en BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides) a través de la plataforma NCBI



(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra la base de datos “core_nt” y se emplearon los parámetros por defecto de *megablast*. La determinación de la especie se basó en la mejor coincidencia taxonómica reportada por BLAST, comprobando además la congruencia de los resultados contra la base de datos “Witness for the Whales” de DNA Surveillance (<https://new-dna-surveillance.auckland.ac.nz/page/whales/title>).

4. RESULTADOS

4.1. Tomografía computarizada

Las imágenes se analizaron en distintos niveles de la cabeza, siguiendo un orden caudo-rostral, con el fin de identificar estructuras óseas, tejidos blandos y cavidades de mayor relevancia para el estudio.

En todos los ejemplares se observó un cráneo alargado con rostro conformado por los huesos premaxilar, maxilar y vómer. Además, se evidenció asimetría craneofacial con un desarrollo más marcado en el lado derecho (**Figuras 9-11**) y fue especialmente evidente en las estructuras óseas mencionadas, en tejidos blandos como el órgano *espermaceti* (**Figura 11**) y en el seno pterigoideo (**Figura 10**).

En los cortes transversales a nivel del oído, MBI-SD mostró un neurocráneo de contorno más redondeado, mientras que los de MBI-XO y MBI-AC presentaron una forma más angular (**Figura 9**). Por otro lado, se observaron suturas craneales (articulaciones entre huesos) bien definidas en MBI-XO y MBI-SD, particularmente en maxilar, premaxilar, palatino y pterigoides, mientras que en MBI-AC eran menos evidentes (**Figuras 10 y 11**).

En la región caudal de la mandíbula, en los tres ejemplares se identificó una fina lámina ósea correspondiente al *pan bone* y, medial a esta, la masa de grasa mandibular (**Figuras 10 y 11**). A nivel de los dientes, MBI-AC presentó ambos colmillos completamente erupcionados; en cambio, en MBI-XO y MBI-SD permanecían en su mayor parte ocultos en el alveolo dentario, solo el vértice de la corona sobresalía sobre el margen superior del hueso mandibular. Asimismo, la cavidad pulpar era claramente visible en MBI-SD, todavía era visible en MBI-XO, pero en MBI-AC estaba ocluida (**Figura 12**). A este nivel de corte y en los siguientes más rostrales se observó el cartílago mesorrostral (en la línea media entre los huesos premaxilares y sobre el hueso vómer): este cartílago aparecía sin osificar en MBI-XO y MBI-SD, y osificado solo caudalmente en MBI-AC (**Figuras 11 y 12**).

Por último, en MBI-SD destacó la presencia de pequeños dientes vestigiales embebidos en las encías de ambas hemimandíbulas (**Figura 13**).

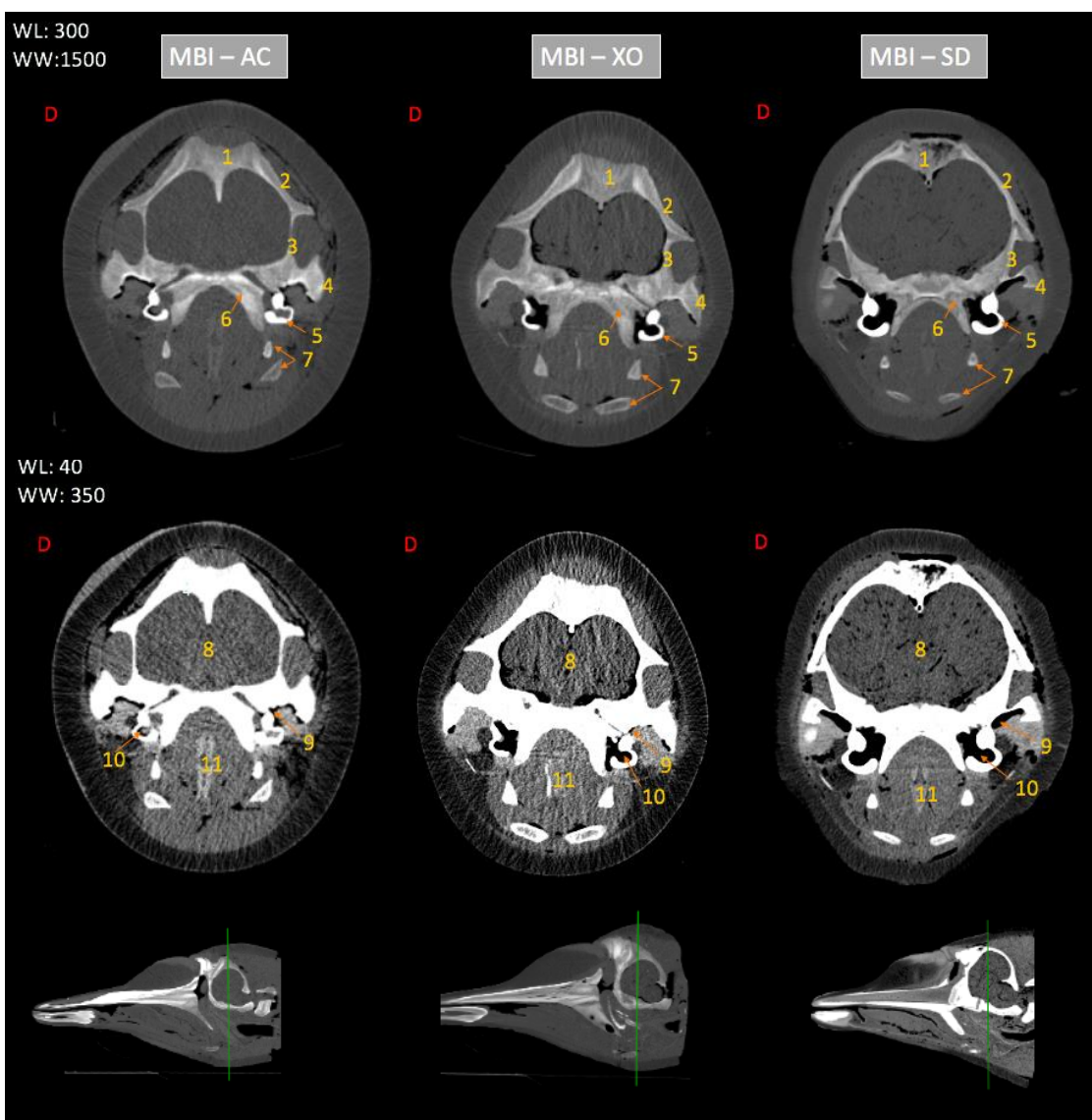


Figura 9: Tomografía computarizada de la cabeza de los tres ejemplares a nivel del oído. Las dos filas superiores muestran el corte transversal y la inferior el nivel de corte sobre un corte sagital. El lado derecho se marca con una letra D en rojo y en la esquina superior izquierda se muestran los parámetros WL y WW que se emplearon para visualizar hueso y tejidos blandos. En la primera fila se señalan las estructuras óseas: (1) frontal, (2) maxilar, (3) parietal, (4) temporal, (5) timpánico, (6) basioccipital, (7) aparato hioideo. En la segunda fila se señalan tejidos blandos: (8) cerebro, (9) senos peribulbares, (10) cavidad timpánica, (11) laringe.

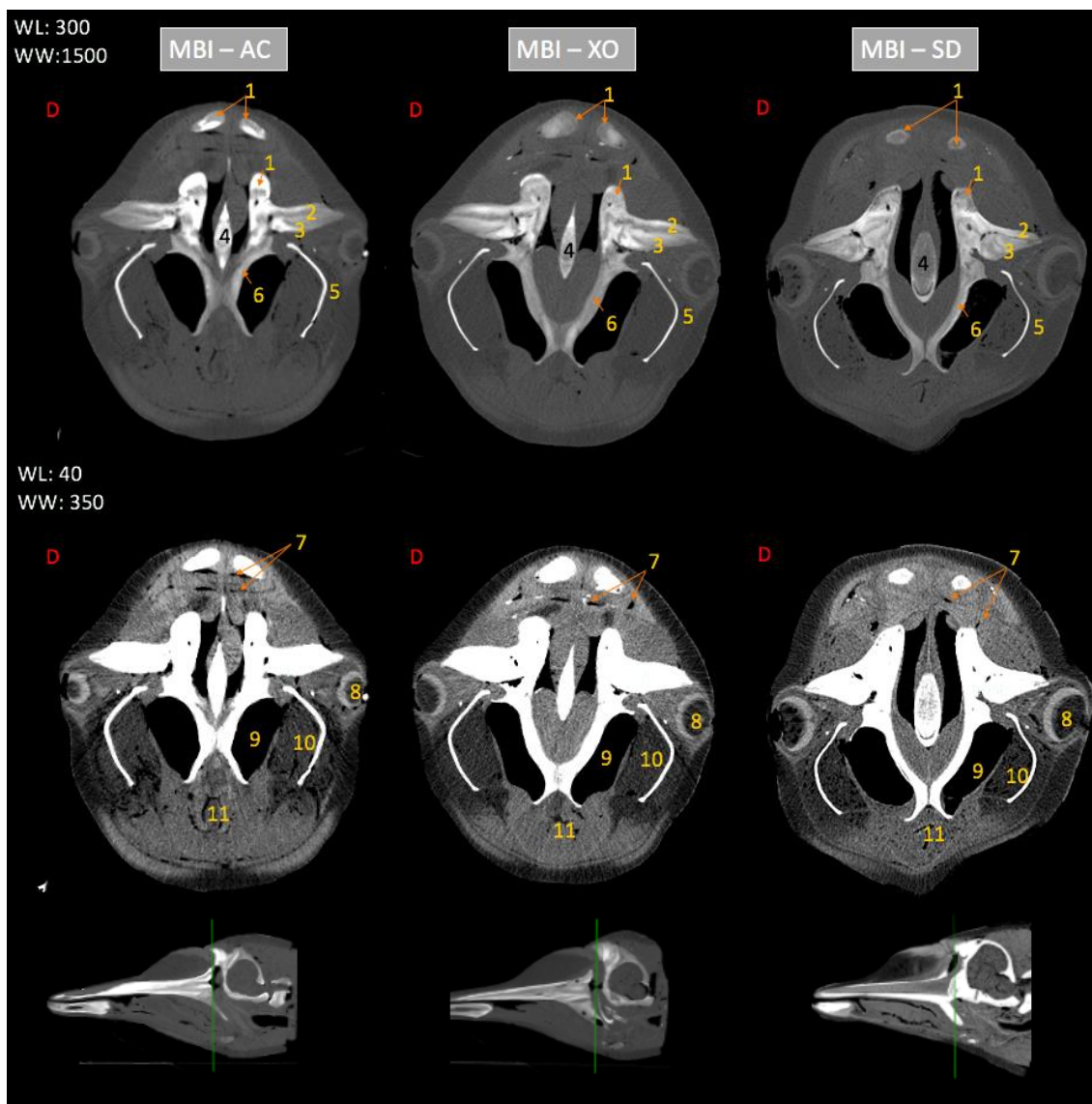


Figura 10: Tomografía computarizada de la cabeza de los tres ejemplares a nivel de espiráculo y sistema de sacos nasales. Las dos filas superiores muestran el corte transversal y la inferior el nivel de corte sobre un corte sagital. El lado derecho se marca con una letra D en rojo y en la esquina superior izquierda se muestran los parámetros WL y WW que se emplearon para visualizar hueso y tejidos blandos. En la primera fila se señalan las estructuras óseas: (1) premaxilar, (2) maxilar, (3) frontal, (4) etmoides, (5) pan bone mandibular, (6) pterigoides. En la segunda fila se señalan tejidos blandos: (7) sistema de sacos nasales, (8) globo ocular, (9) seno pterigoideo, (10) masa de grasa mandibular medial, (11) orofaringe.

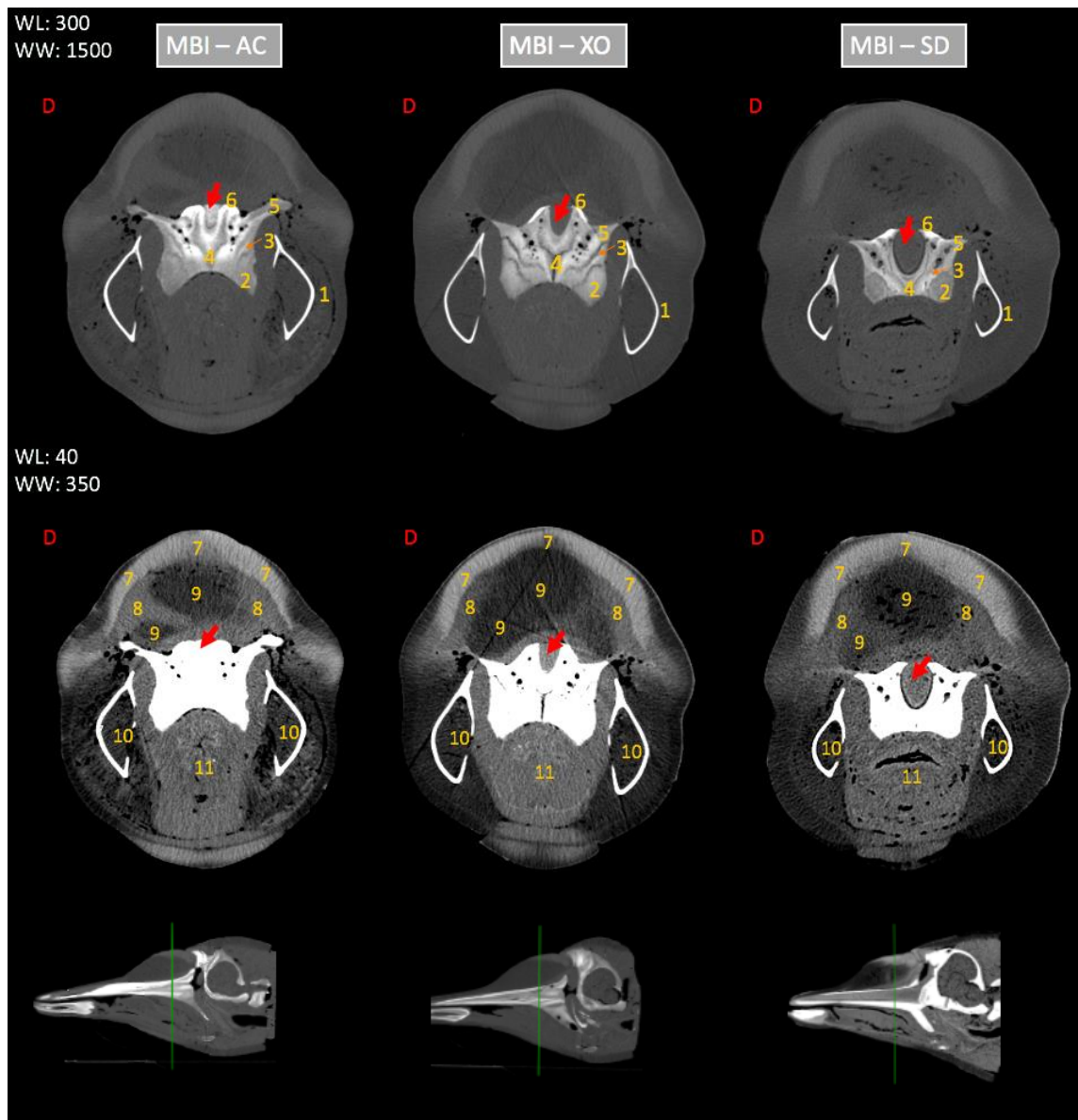


Figura 11: Tomografía computarizada de la cabeza de los tres ejemplares a nivel de melón. Las dos filas superiores muestran el corte transversal y la inferior el nivel de corte sobre un corte sagital. El lado derecho se marca con una letra D en rojo y en la esquina superior izquierda se muestran los parámetros WL y WW que se emplearon para visualizar hueso y tejidos blandos. En la primera fila se señalan las estructuras óseas: (1) pan bone mandibular, (2) pterigoides, (3) palatino, (4) vómer, (5) maxilar, (6) premaxilar. En la segunda fila se señalan tejidos blandos: (7) teca, (8) melón, (9) órgano espermaceti, (10) masa de grasa mandibular medial, (11) parte caudal de la lengua. En las dos filas superiores se señala con una flecha roja el cartílago mesorrostral; osificado en MBI-AC y sin osificar en MBI-XO y MBI-SD.

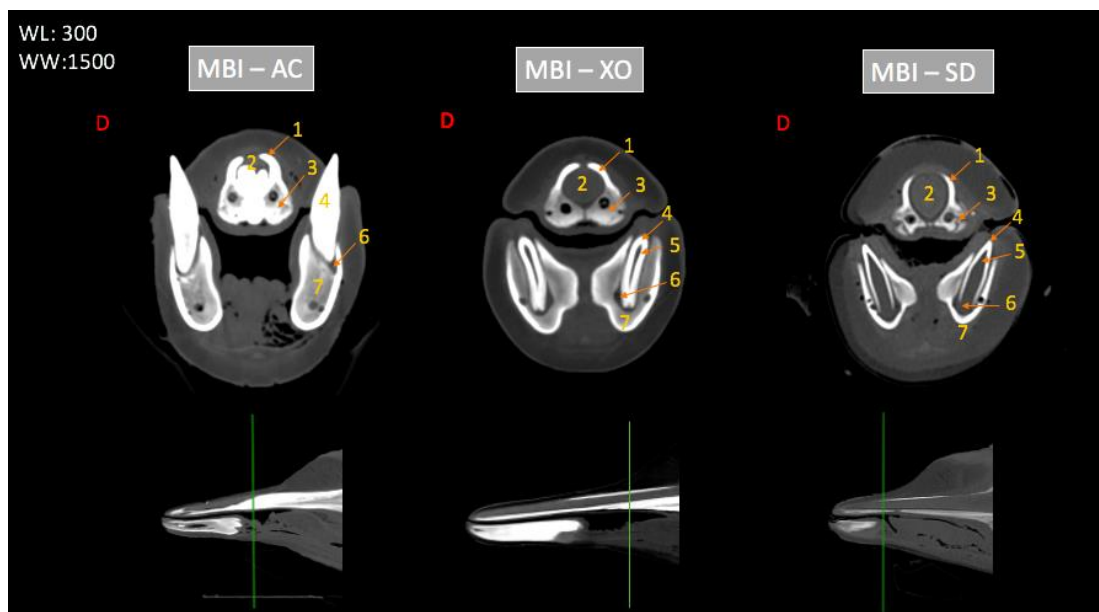


Figura 12: Tomografía computarizada de la cabeza de los tres ejemplares a la altura de los dientes. La fila superior muestra el corte transversal y la inferior el nivel de corte sobre un corte sagital. El lado derecho se marca con una letra D en rojo y en la esquina superior izquierda se muestran los parámetros WL y WW que se emplearon para visualizar hueso. Se señalan las estructuras: (1) premaxilar, (2) cartilago mesorrostral, (3) maxilar, (4) diente, (5) cavidad pulpar, (6) alveolo dentario, (7) hemimandibula izquierda.

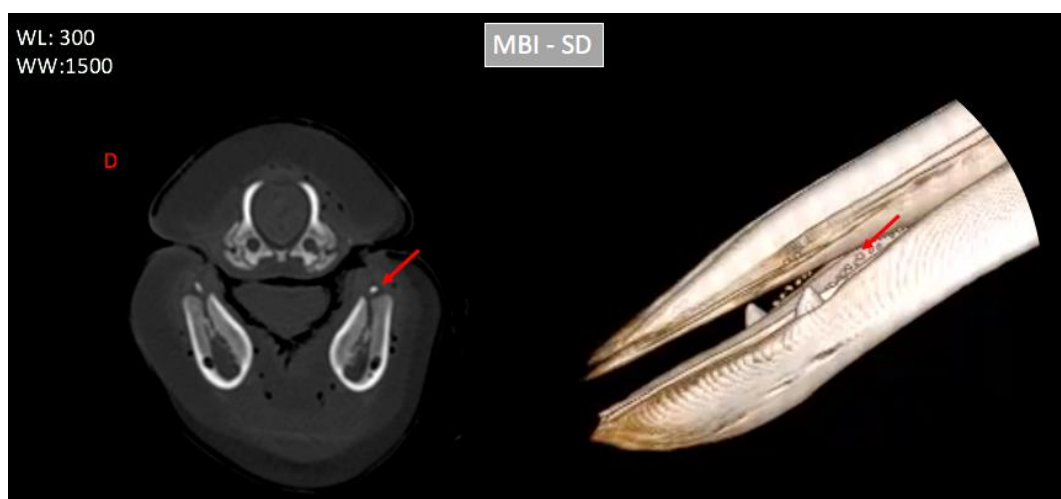


Figura 13: Tomografía computarizada de la cabeza del zifio MBI – SD a nivel del pico. A la izquierda el corte transversal y a la derecha una reconstrucción 3D de la misma región. El lado derecho se marca con una letra D en rojo y en la esquina superior izquierda se muestran los parámetros WL y WW que se emplearon para visualizar hueso. Los dientes vestigiales se observan tanto en la hemimandíbula izquierda (flechas rojas) como en la derecha.



4.2. Disección

4.2.1. Zifio sin datos (MBI-SD)

La cabeza presentaba un estado de conservación intermedio, con la piel visiblemente alterada por el proceso de congelación prolongado y posterior descongelación. Su morfología era esencialmente cónica, sin llegar a ser excesivamente afilada, y la parte posterior mostraba una superficie irregular con múltiples laceraciones epidérmicas.

En la región dorsal la pigmentación era gris uniforme, pero en la región ventral exhibía una coloración heterogénea, con matices que iban del gris al beige y al marrón. Toda la superficie de la cabeza estaba surcada por numerosas abrasiones y arañazos (**Figura 14**) posiblemente debidos al arrastre en el momento del varamiento.

Antes de la disección fueron identificables los siguientes rasgos: la zona ventral presentaba dos surcos longitudinales que convergían hacia rostral y, en la región dorsal al rostro, un melón pequeño pero prominente e inmediatamente caudal a él el espiráculo, cuya comisura derecha se encontraba ligeramente más rostral, propio de la asimetría de los zifios (**Figura 14**).

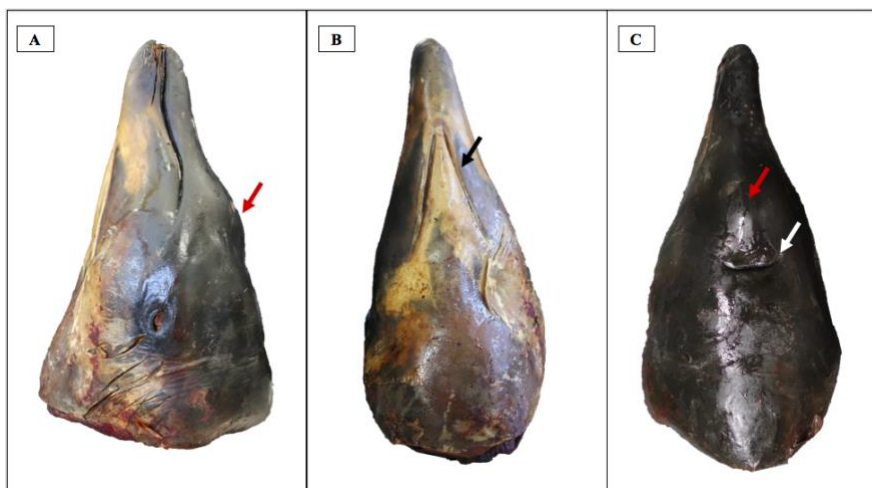


Figura 14: Características morfológicas externas de la cabeza del zifio MBI-SD. Se observa la cabeza con un aspecto cónico, con un pequeño melón prominente (flechas rojas en A y C), ventralmente dos surcos que convergen hacia rostral (flecha negra en B) y la comisura derecha del espiráculo más proyectada hacia rostral (flecha blanca en C). (A) vista lateral izquierda. (B) vista ventral. (C) vista dorsal.

Al iniciar la disección y retirar la piel, se identificó la gruesa capa de grasa subcutánea (hipodermis) característica de todos los cetáceos. Bajo esta en la región facial sobre el melón se halló una cápsula de tejido conectivo denso, la teca. Al retirarla se visualizó por completo el melón y las fibras musculares asociadas. Debajo de estas estructuras y rostral al espiráculo se hallaba el órgano *espermaceti*, caudal al melón y con un mayor desarrollo en el lado derecho; aunque el melón y órgano *espermaceti* son órganos grasos, la consistencia de este último es mucho mayor que la del melón (**Figura 15**). Por otra parte, los músculos faciales estaban



especialmente desarrollados en el lado derecho de la región del melón y del tracto nasal, asociados con todos los componentes del sistema de ecolocalización (sacos nasales, labios fónicos, órgano espermaceti y melón).

Al diseccionar el espiráculo se encontró bajo él una gran cavidad que se corresponde con el saco nasal más dorsal: saco vestibular o cavidad espiracular, de mayor tamaño el del lado derecho que además tenía dos surcos oblicuos en el suelo. En la región caudal de este vestíbulo se localizaban los dos pares de labios fónicos, siendo también de mayor tamaño el derecho (**Figura 15B**, vista rostral). Tras atravesar los labios fónicos, caudolateralmente se identificaban los dos sacos nasofrontales, de los cuales el derecho era ligeramente más voluminoso y se proyectaba con mayor alcance hacia rostral que el izquierdo. Por debajo de los sacos nasofrontales, sobre la calavera e inmediatamente rostral a la entrada a la cavidad nasal ósea, se hallaban los sacos premaxilares, prácticamente simétricos en ambos lados (**Figura 15**, vista ventral).

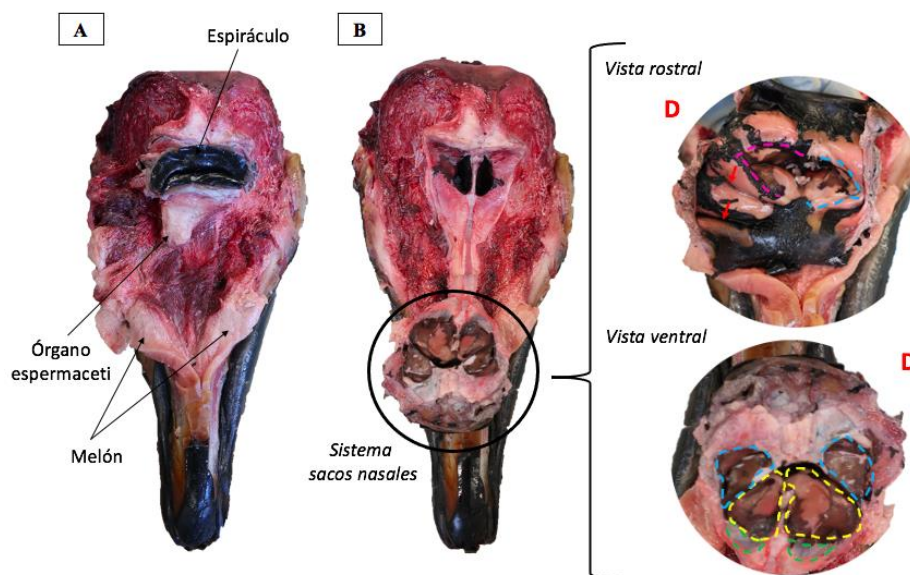


Figura 15: Disección del melón, espiráculo y sistema de sacos nasales en el zifio MBI-SD. (A) Vista dorsal de la cabeza tras la disección del melón (seccionado sagitalmente en dos mitades). (B) Vista dorsal mostrando el sistema de sacos nasales reclinado hacia rostral una vez se ha separado de la cavidad nasal ósea y del vértice del cráneo. Vista rostral: los labios fónicos derechos (contorno rosa) superan en tamaño a los izquierdos (contorno azul). Las flechas rojas señalan los surcos paralelos entre sí. Vista ventral: el tapón nasal derecho (contorno amarillo) y el saco nasofrontal derecho (contorno azul) muestran un desarrollo mayor que sus homólogos izquierdos, mientras que los sacos premaxilares (contorno verde) mantienen simetría bilateral. Se indica el lado derecho de cada vista con una letra “D” en rojo.

Dentro de la cavidad oral se encontraba una lengua de gran tamaño que se extendía hasta el inicio de la sínfisis mandibular; además, presentaba papilas marginales en el borde de su vértice (**Figura 16**). El par de dientes no era visible, pero se palpaban los dos dientes embebidos en las encías en la mitad del borde alveolar de la mandíbula.



Figura 16: Cavity oral y lengua del zifio MBI-SD. El suelo de la cavity oral se ha separado de la mandíbula (arriba en la imagen) para poder mostrarlo- Se señala con una flecha negra las papilas marginales de la lengua.

4.2.2. Zifio varado en Xove (MBI-XO)

La cabeza se encontraba en un estado de conservación intermedio: la piel mostraba evidentes alteraciones debidas a la congelación y posterior descongelación. Su morfología era cónica, con un rostro muy afilado. En la región ventral se observaban múltiples arañazos y laceraciones epidérmicas, probablemente producidos en el momento del varamiento (**Figura 17**).

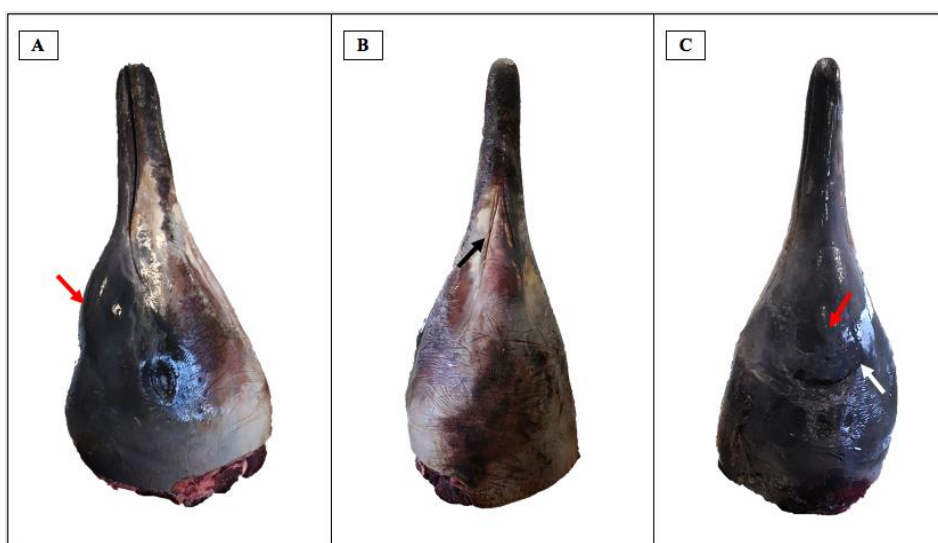


Figura 17: Características morfológicas de la cabeza del zifio MBI-XO. Se observa la cabeza con un aspecto cónico y un pico u hocico muy largo, con un melón prominente (flecha roja en A y C), ventralmente dos surcos que convergen hacia rostral (flecha negra en B) y la comisura derecha del espiráculo más proyectada hacia rostral (flecha blanca en C). (A) vista lateral derecha. (B) vista ventral. (C) vista dorsal.

La superficie dorsal exhibía una pigmentación gris uniforme, mientras que la ventral presentaba una coloración heterogénea, que variaba entre tonos grises, beige y marrones.

Se observaron características externas similares a las del zifio MBI-SD: en la zona ventral se apreciaban dos surcos longitudinales convergentes hacia rostral, un melón prominente en la



región dorsal del rostro y, caudal a este, el espiráculo, con la comisura derecha ligeramente desplazada hacia rostral (**Figura 17**).

Tras la extracción de la teca y el melón, se identificó el órgano *espermaceti*, el cual emergía en su mayor parte del lado derecho y, a medida que se extendía en dirección rostral, convergía hacia la línea media (**Figura 18A**). Al inspeccionar el espiráculo se observó ventralmente el saco vestibular o cavidad espiracular, más desarrollado el lado derecho que el izquierdo; además presentaba dos surcos profundos en el suelo. De forma análoga, los labios fónicos del lado derecho eran más grandes que los del lado izquierdo (**Figura 18B**).

Al diseccionar los labios fónicos y avanzar la disección hacia ventral se observaron también los sacos nasofrontales y los premaxilares, con un mayor desarrollo en el lado derecho frente al izquierdo (**Figura 19**).

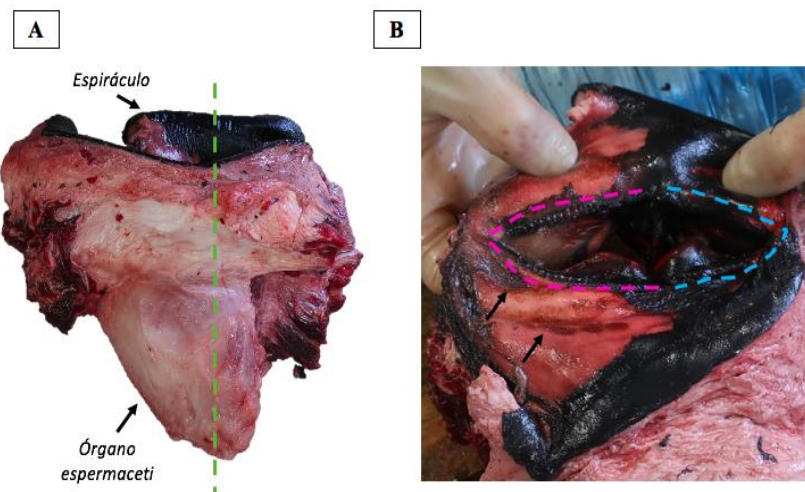


Figura 18: Órgano *espermaceti* y cavidad espiracular del zifio MBI-XO. (A) Vista dorsorrostral del espiráculo y del órgano *espermaceti*. La línea media está definida por la línea discontinua verde. (B) Vista dorsal de la cavidad espiracular. Se aprecia el lado derecho más grande, al igual que los labios fónicos derechos (contorno rosa) respecto a los izquierdos (contorno azul). Las flechas negras señalan los surcos paralelos entre sí, pero oblicuos respecto a la línea media, en el suelo del vestibulo derecho.

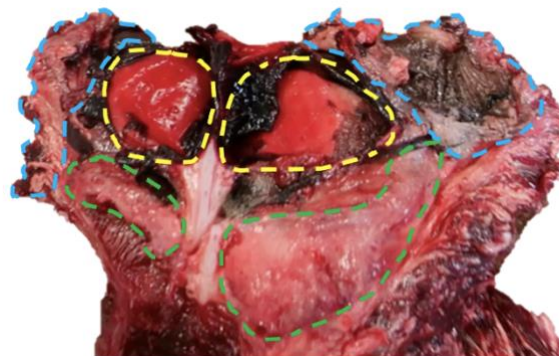


Figura 19: Vista ventral del sistema de sacos nasales del zifio MBI-XO. Se observa la marcada asimetría donde se ve que los sacos premaxilares (contorno verde), los sacos nasofrontales (contorno azul) y los tapones nasales (contorno amarillo) presentan un mayor desarrollo en el lado derecho que en el izquierdo.



4.3. Biometrías

4.3.1. Biometrías del cráneo

Las medidas craneales del zifio control (procedentes de Martín *et al.*, 2011) y de los tres ejemplares de este estudio se presentan en la **Tabla 1**. En la **Tabla 2** se reportan los estadísticos descriptivos de las medidas absolutas (mm).

La longitud cóndilobasal (LCB) para los cuatro ejemplares de zifio fue: MBI-control 779 mm, MBI-AC 739,7 mm, MBI-XO 763,8 mm, MBI-SD 442,8 mm (**Tabla 1**). Los resultados de la LCB en MBI-control, MBI-AC y MBI-XO fueron similares, exhibiendo MBI-control el mayor tamaño cefálico, seguido de MBI-XO MBI-AC, concordando con las longitudes totales registradas para todos ellos (MBI-control 456 cm, MBI-XO 449 cm y MBI-AC 412 cm). MBI-SD presentó una LCB muy pequeña, 442,8 mm.

Puesto que la LCB representaba el 17-18 % de la longitud total en los tres zifios de mayor tamaño, calculamos que MBI-SD podría tener una longitud comprendida entre 246 y 260,5 cm.

Tabla 1: Medidas craneales de los cuatro ejemplares (mm) y porcentajes normalizados (% LCB) respecto a la longitud cóndilobasal de cada individuo.

BIOMETRÍAS DEL CRÁNEO								
	MBI – control (Martín <i>et al.</i> , 2011)		MBI – AC		MBI – XO		MBI – SD	
	Macho – adulto		Macho – adulto		Macho – juvenil		Macho – cría	
	(mm)	%LCB	(mm)	%LCB	(mm)	%LCB	(mm)	%LCB
(1) Longitud cóndilobasal (LCB)	779	100	739,7	100	763,8	100	442,8	100
(2) Longitud rostro	518	66,5	583,4	78,8	510,1	66,8	307,9	69,5
(3) Longitud órbita (l/D)	83	10,7	94	12,7	94,4	12,3	68,9	15,5
(4) Anchura postorbital	296	38	288,1	38,9	280,6	36,6	183,4	41,4
(5) Anchura cigomática	293	37,6	282	38,1	307,3	40,2	179,1	40,4
(6) Anchura exooccipital	244	31,3	243,1	32,8	251,2	32,9	157	35,5

La longitud del rostro de MBI-AC mostró un valor excepcionalmente alto (78,8% LCB), superior al de los demás ejemplares. Esta elongación rostral se acompañó en este ejemplar de una mayor anchura postorbital (38,9 % LCB) y cigomática (38,1 % LCB), comparado con los valores de MBI-control (38 y 37,6 % LCB, respectivamente), lo cual sugiere un cráneo relativamente más estrecho y alargado en MBI-AC (**Tabla 1**).

La longitud de órbita varió poco entre MBI-control, MBI-AC y MBI-XO (10,7-12,7 % LCB), pero alcanzó un valor notablemente mayor en MBI-SD (15,6 % LCB) (**Tabla 1**).



La anchura postorbital mostró variaciones moderadas entre los ejemplares, con 38% LCB en MBI control, 38,9% LCB en MBI-AC, 41,4% LCB en MBI-SD y 36,6% LCB en MBI-XO. De forma análoga, la anchura cigomática osciló entre 37,6% LCB y 40,4% LCB y la anchura exoccipital entre 31,3% LCB y 35,5% LCB (**Tabla 1**).

En conjunto, las medidas craneales de MBI-control, MBI-AC y MBI-XO presentaron tanto valores absolutos (mm) como normalizados (% LCB) similares, aunque con ciertas variaciones individuales entre ellos. Por el contrario, MBI-SD exhibió valores absolutos (mm) menores en todas las medidas, pero valores normalizados (%LCB) mayores respecto al resto de ejemplares.

La estadística descriptiva mostró que la medida más homogénea, es decir, la que presentó menor variabilidad entre los individuos fue la longitud orbitaria (CV = 12,2%), mientras que la LCB y la longitud del rostro exhibieron una mayor variabilidad (CV= 20,3-21,5%), reflejando una mayor dispersión interindividual. Por su parte, las anchuras postorbital, cigomática y exoccipital registraron valores moderados de variabilidad (17,3 – 19,1%), indicando cierta heterogeneidad entre los ejemplares (**Tabla 2**).

Tabla 2: Estadística descriptiva de las mediciones craneales. “n”: número de ejemplares, “ \bar{x} (mm)”: media aritmética, “SD (mm)”: desviación estándar, “CV (%)”: coeficiente de variación.

VARIABLE	n	\bar{x} (mm)	SD (mm)	CV (%)
(1) Longitud cóndilobasal (LCB)	4	681,3	138,4	20,3
(2) Longitud rostro	4	479,8	103,3	21,5
(3) Longitud órbita (I/D)	4	85,1	10,4	12,2
(4) Anchura postorbital	4	262	45,7	17,4
(5) Anchura cigomática	4	265,3	50,6	19,1
(6) Anchura exoccipital	4	223,8	38,7	17,3

4.3.2. Biometrías de la mandíbula

Las medidas de la mandíbula del zifio control (procedentes de Martín *et al.*, 2011) y de los tres ejemplares de este estudio se presentan en la **Tabla 3**. En la **Tabla 4** se reportan los estadísticos descriptivos de las medidas absolutas (mm).



Tabla 3: Medidas mandibulares de los cuatro ejemplares (mm) y porcentajes normalizados (% LM) respecto a la longitud total de la mandíbula de cada individuo.

BIOMETRÍAS DE LA MANDÍBULA								
	MBI – control (Martín et al., 2011)		MBI – AC		MBI – XO		MBI – SD	
	Macho – adulto		Macho – adulto		Macho – juvenil		Macho – cría	
	(mm)	%LM	(mm)	%LM	(mm)	%LM	(mm)	%LM
(7) Longitud total de la mandíbula (LM)	655	100	656,3	100	678,2	100	363,5	100
(8) Longitud sínfisis (región fusionada)	231	35,2	196,2	29,9	188,6	27,8	64,8	17,8
(9) Altura en el proceso coronoides	101	15,4	93	14,2	97	14,3	51	14
(10) Altura externa alveolo	44	6,7	50,2	7,6	44,2	6,5	26	7,1
(11) Longitud alveolo	59	9	66	10	22	3,2	21	5,8
(12) Longitud vertical del diente	87	13,3	60,9	9,3	No diente erupcionado	X	No diente erupcionado	X
(13) Longitud pico - margen anterior alveolo	185	28,2	198,2	30,2	217,5	32,1	73,3	20,2

La longitud total de la mandíbula (LM) se midió en los cuatro ejemplares de zifio (**Tabla 3**): MBI-XO alcanzó el valor máximo (678,2 mm), mientras que MBI-AC (656,3 mm) y MBI-control (655 mm) mostraron longitudes similares; MBI-SD obtuvo una LM marcadamente más reducida (363,5 mm). Por otro lado, la longitud de la sínfisis fue mayor en MBI control (35,2 % LM) y más baja en MBI-SD (17,8 % LM), con valores intermedios y muy similares en MBI-AC (29,9 % LM) y MBI-XO (27,8 % LM) (**Tabla 3**).

La altura en el proceso coronoides osciló entre 14,2 % LM (MBI-AC) y 15,4 % LM (MBI control), mientras que la altura externa del alveolo varió de 6,5 % LM (MBI-XO) a 7,6 % LM (MBI-AC) (**Tabla 3**).

Una medida que mostró resultados dispares entre los individuos fue la longitud alveolar: los mayores % LM correspondieron a MBI control (9 % LM) y MBI-AC (10 % LM), en tanto que MBI-SD (5,8 % LM) y MBI-XO (3,2 % LM) registraron medidas muy inferiores (**Tabla 3**).

Los únicos ejemplares que mostraron erupción de los dientes fueron MBI-control y MBI-AC, con longitudes verticales del diente de 87 mm (13,3 % LM) y 60,9 mm (9,3 % LM) respectivamente (**Tabla 3**).

La longitud pico-margen anterior del alveolo presentó el mínimo en MBI-SD (20,2 % LM) y el máximo en MBI-AC (32,1 % LM), seguidos de MBI-control (30,2% LM) y de MBI-XO (28,2 % LM) (**Tabla 3**).

En conjunto, los ejemplares MBI-control, MBI-AC y MBI-XO mostraban valores similares tanto absolutos (mm) como normalizados (%LM), destacando la uniformidad de la altura en el proceso



coronoides y una mayor variabilidad en la longitud alveolar. MBI-SD nuevamente presentó valores absolutos (mm) notablemente inferiores, aunque con valores normalizados más similares al resto, a excepción de la sínfisis y la longitud pico-margen anterior alveolo, que presentaban valores % LM más bajos (**Tabla 3**).

La estadística descriptiva reveló que la longitud alveolar presentó la mayor variabilidad (CV = 49,2 %), seguida por la longitud de la sínfisis (CV = 37 %) y la longitud pico-margen anterior del alveolo (CV = 33,3 %), lo que indica una considerable heterogeneidad en estas medidas. Por el contrario, la longitud vertical del diente (n = 2) mostró la variabilidad más baja (CV = 17,6 %). Las alturas mandibulares, tanto en el proceso coronoides (CV = 20,1 %) como en el alveolo externo (CV = 22,1%), exhibieron una variabilidad moderada entre los ejemplares (**Tabla 4**).

Tabla 4: Estadística descriptiva de las mediciones craneales. “n”: número de ejemplares, media (mm), “SD” (mm): desviación estándar, “CV (%)”: coeficiente de variación.

VARIABLE	n	\bar{x} (mm)	SD (mm)	CV (%)
(7) Longitud total de la mandíbula (LM)	4	588,2	130,1	22,1
(8) Longitud sínfisis (región fusionada)	4	170,1	62,9	37
(9) Altura en el proceso coronoides	4	85,5	20,1	23,5
(10) Altura externa alveolo	4	41,1	9,1	22,1
(11) Longitud alveolo	4	42	20,7	49,2
(12) Longitud vertical del diente ¹	2	74	13	17,6
(13) Longitud pico - margen anterior alveolo	4	168,5	56,2	33,3

¹ n=2, solo dos ejemplares presentaban el dientes erupcionados.

4.4. Estudios de genética molecular

4.4.1. Resultados de la identificación del sexo

La identificación del sexo en los tres zifios se llevó a cabo mediante la amplificación de intrones de genes presentes en los cromosomas sexuales y visualización de los productos en gel de agarosa. En los tres ejemplares se detectaron dos bandas (**Figura 20**): una de aproximadamente 1050 pb y otra de 950 pb, correspondientes al intrón del gen *Zfy* y al ontrón del gen *Zfx*, respectivamente. La amplificación de estos intrones ubicados en los cromosomas X e Y, confirmó que los tres individuos presentaban un cariotipo XY y que, por lo tanto, eran machos.

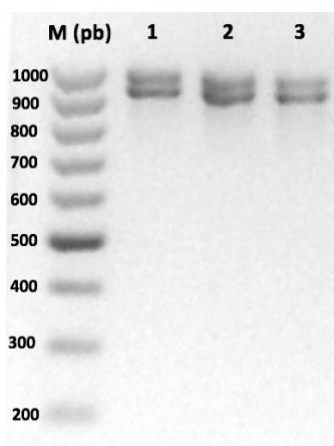


Figura 20: Resultados de la identificación del sexo de los tres ejemplares en gel de agarosa. En el primer carril (M) el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder; los carriles consecutivos corresponden a (1) MBI – SD, (2) MBI – AC y (3) MBI – XO, en los cuales se puede observar dos bandas: una de mayor tamaño (~1050 pb) y otra de menor tamaño (~950 pb).

4.4.2. Resultados de la identificación de la especie

La región control del ADN mitocondrial se amplificó por PCR y los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa. En todas las reacciones se observó una única banda de aproximadamente 500 pb, correspondiente a la región control mitocondrial. Las bandas a 62 °C mostraron una intensidad superior (**Figura 21**), por lo que se seleccionaron esas muestras para la secuenciación posterior.

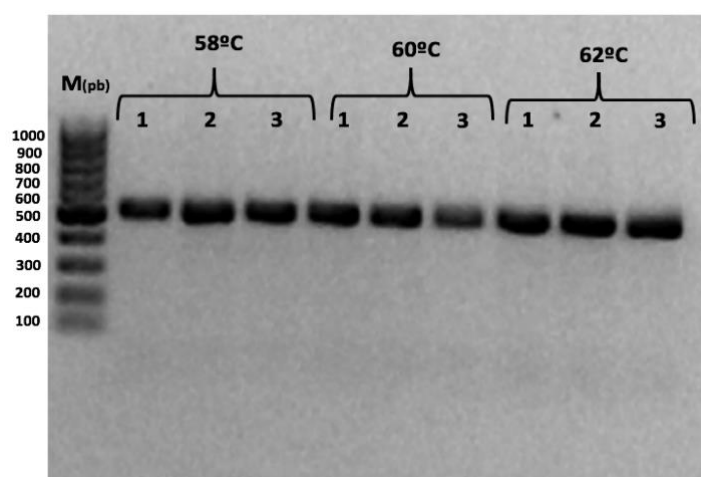


Figura 21: PCR de la región control del ADN mitocondrial a distintas temperaturas de anillamiento. En el primer carril (M) el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder; los carriles consecutivos corresponden a (1) MBI – SD, (2) MBI – AC y (3) MBI – XO.

Las secuencias consenso de la región control del ADN mitocondrial de los tres ejemplares fueron sometidas inicialmente a un análisis BLASTn contra la base de datos “core_nt” del NCBI. En todos los casos, el mejor alineamiento correspondió a *Mesoplodon bidens* (AY579507.1), con



valores de *E-value* inferiores a 10^{-160} y porcentajes de identidad de 96-98% (**Tabla 5**). El *E-value*, que estima la probabilidad de hallar un alineamiento de igual o mejor calidad por simple azar, y el elevado porcentaje de identidad respaldan la alta homología entre las secuencias analizadas y la referencia (*Mesoplodon bidens* AY579507.1).

Tabla 5: Resultados de alineamiento de las secuencias consenso de la región mitocondrial de los tres ejemplares en BLASTn (NCBI) y en DNA Surveillance. Se muestran los valores de *E-value* y el número y porcentaje de identidades obtenidos para la mejor coincidencia en la base de datos GenBank (*Mesoplodon bidens* AY579507.1) y la distancia evolutiva para la mejor coincidencia en la base de datos “Witness for the Whales” (MbiNHM-UK).

Muestra	BLASTn (NCBI)		DNA Surveillance
	<i>Mesoplodon bidens</i> (AY579507.1)	Identidades	MbiNHM-UK (Zifio de Sowerby)
	E-value		Distancia evolutiva
MBI-SD (1)	3×10^{-161}	344/358 (96%)	0,0145
MBI-AC (2)	1×10^{-172}	353/361 (98%)	0,0233
MBI-XO (3)	2×10^{-173}	353/360 (98%)	0,0234

Con el fin de corroborar esta asignación taxonómica, las mismas secuencias se introdujeron en DNA Surveillance contra la base de datos “Witness for the Whales”. El árbol filogenético resultante situó todas las secuencias dentro del clado de los zifios de Sowerby (**Figura 22**), y las distancias evolutivas calculadas respecto a la referencia MbiNHM-UK (zifio de Sowerby) oscilaron entre 0,0145 y 0,0234 (**Tabla 5**), valores notablemente inferiores respecto a otras especies de *Mesoplodon* (p. ej.: ~ 0,08 para el zifio de Gervais). Estos hallazgos refuerzan de manera concluyente la identificación de los tres ejemplares como zifios de Sowerby

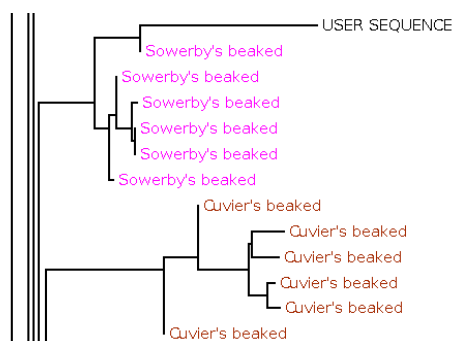


Figura 22: Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la región control del ADN mitocondrial de los zifios. La secuencia consenso (USER SEQUENCE) se sitúa dentro del clado de los zifios de Sowerby (*Mesoplodon bidens*), diferenciándose del clado de los zifios de Cuvier (*Mesoplodon europaeus*). Fuente: <https://new-dna-surveillance.auckland.ac.nz/page/whales/title>



5. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue determinar de forma inequívoca la especie y el sexo a la que pertenecían dos zifios (MBI-XO y MBI-SD), identificados sin certeza como zifios de Sowerby (*Mesoplodon bidens*), empleando como referencia un tercer zifio (MBI-AC) previamente confirmado como tal. Para ello se combinaron métodos clásicos, como el anatómico (disección y biometrías), con metodologías más actuales como la tomografía computarizada (TC) y la genética molecular (PCR y secuenciación).

Las imágenes de TC obtenidas para los tres ejemplares y el estudio posterior de los huesos limpios mostraron un cráneo alargado característico del género *Mesoplodon* (Jefferson *et al.*, 1993; Moore, 1968), con un rostro conformado principalmente por los huesos premaxilar, maxilar y vómer, una asimetría facial marcada con mayor desarrollo en el lado derecho, un vértice muy prominente y la presencia del *pan bone* mandibular. MBI-XO mostraba unas características óseas y de tejidos blandos similares a las descritas en MBI-AC, el ejemplar ya identificado como zifio de Sowerby (Román López, 2024); en el caso de MBI-SD, la conformación de los huesos de la cara y de los tejidos blandos coincidía con los otros dos ejemplares, pero el neurocráneo era mucho más redondeado, típico de ejemplares de poca edad (Alves *et al.*, 2023; Besharse, 1971). MBI-SD también presentaba numerosas articulaciones visibles entre huesos, muchas sin empezar a osificar, tanto en la cara como en el neurocráneo, propio de animales muy jóvenes; MBI-XO también presentaba algunas suturas visibles, pero solo en el neurocráneo, por lo que aún no había completado su desarrollo físico (Alves *et al.*, 2023; Besharse, 1971). El cartílago mesorrostral, un indicador de edad adulta en zifios (Besharse, 1971), solo se había empezado a transformar en hueso caudalmente en MBI-AC que era el individuo que mostraba una mayor madurez física en su esqueleto craneal.

El estudio de TC reveló distintos estadios de desarrollo dentario en los ejemplares: los dientes de MBI-AC, los únicos erupcionados, tenían la cavidad pulpar completamente ocluida; MBI-XO y MBI-SD aún tenían los dientes ocultos bajo las encías, pero la amplitud de la cavidad pulpar era diferente: parcialmente ocluida en MBI-XO y muy amplia en MBI-SD. En la cavidad pulpar de los dientes, tras el nacimiento, se va depositando dentina postnatal en capas y con una cadencia anual hasta que la cavidad se cierra por completo. El conteo de estas capas de dentina permite estimar la edad, pero solo hasta el momento en que se produce la oclusión de la cavidad pulpar (Perrin & Myrick, 1980). Moore (1968) considera que el cierre de la cavidad pulpar de los dientes es el mejor criterio para establecer la madurez física en los zifios. En definitiva, el grado de oclusión de la cavidad pulpar en estos individuos coincide con los hallazgos de TC y biométricos descritos previamente: MBI-SD era un individuo muy joven, probablemente una cría en su primer año de vida, MBI-XO un juvenil o subadulto, y MBI-AC un adulto joven. Un hallazgo curioso en MBI-SD fue la detección de dientes vestigiales embebidos en las encías, caudalmente al par de



dientes principales, aunque ya ha sido descrito en varias especies de zifios, sobre todo en crías y juveniles (Kitchener *et al.*, 2023).

La disección de MBI-XO y MBI-SD reveló en ambos una morfología cónica y afilada del rostro, un melón pequeño, un espiráculo asimétrico con la comisura derecha desplazada hacia rostral, surcos ventrales en “V” y órgano *espermaceti* con mayor desarrollo en el lado derecho. Otros hallazgos relevantes fueron el mayor desarrollo del par derecho de labios fónicos y, sobre todo, los dos surcos profundos en el lado derecho del suelo de la cavidad espiracular. Todas estas características también las presentó el zifio de Sowerby MBI-AC (Román López, 2024), pero la más relevante sin duda fue la presencia de los dos surcos en el suelo de la cavidad espiracular: la única especie de zifio que presenta esta singularidad morfológica es *Mesoplodon bidens* (Heyning, 1989).

La disección también puso de manifiesto que la asimetría de los sacos nasales, con mayor desarrollo en los del lado derecho, y era más evidente en el ejemplar juvenil MBI-XO que en la cría MBI-SD. En un estudio reciente sobre el aparato nasal de varios odontocetos se ha observado precisamente una menor asimetría en etapas ontogenéticas tempranas y que hasta que no finaliza el desarrollo del cráneo tampoco se completa la transformación de las estructuras del aparato nasal (Lanzetti *et al.*, 2022). Otro dato morfológico que refuerza la propuesta de escasa edad para el ejemplar MBI-SD fue observar papilas marginales en el vértice de la lengua. Las papilas marginales en los cetáceos están presentes en los individuos lactantes y desaparecen poco tiempo después del destete; permiten que la lengua se adapte mejor al pezón de la madre, evitando así la pérdida de leche (Heyning & Mead, 1996; Shindo *et al.*, 2008).

La comparación de las biometrías de los tres zifios con las registradas en el zifio de Sowerby de Martín *et al.* (2011) (MBI-control) permitió cuantificar diferencias y similitudes en valores absolutos (mm) y normalizados (% LCB y % LM). En relación con la biometría craneal, MBI-SD presentó una longitud cóndilobasal (LCB) muy inferior (442,8 mm) al resto de ejemplares (739,7-779 mm), presentando una LCB muy similar a las registradas en el estudio de Smith *et al.* (2021) de 7 juveniles (476-461 mm) de zifio de Sowerby; las medidas de los otros tres zifios de este trabajo fueron similares a las de los adultos registrados en ese mismo estudio (757-676 mm). En base a la LCB, que representaba el 17-18 % de la longitud total en los demás ejemplares, se calculó que MBI-SD podría tener una longitud total de 246-260,5 cm, es decir, un individuo neonato (Ellis & Mead, 2017; Jefferson *et al.*, 2015).

Por otro lado, MBI-AC mostró una longitud de rostro mucho mayor (78,8 % LCB) que el resto (66,5-69,5 % LCB), lo que sugiere un cráneo relativamente más estrecho y alargado, quizás reflejo de una variabilidad geográfica o individual (Kobayashi *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 2021). Las anchuras craneales mantuvieron valores muy similares (38-38,9 % LCB en postorbital; 37,6-38,1 % LCB en cigomática; 31,3-32,3 % LCB en exooccipital), aunque ligeramente elevadas en MBI-SD (35,5-41,4 % LCB), indicativo de un cráneo más compacto y “más ancho”; esta mayor



anchura en proporción a la longitud total del cráneo se reflejó también en la cría y en los juveniles y subadultos del estudio de Smith *et al.* (2021) y de otras especies de mesoplodontes como *M. densirostris* y en odontocetos como *Indopacetus pacificus* en los estudios de Besharse (1971) y Kobayashi *et al.* (2021), respectivamente. El mismo patrón se repitió para la longitud de orbita: MBI-control, MBI-AC y MBI-XO presentaban longitudes similares (10,7-12,7 % LCB), mientras que MBI-SD presentó una longitud mayor (15,6 % LCB). Esta diferencia de longitudes de órbita posiblemente responde a una variación ontogenética entre ellos, puesto que se ha observado en otros odontocetos que los juveniles y subadultos presentan una longitud de órbita mayor en relación con su LCB (Dalebout *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2021).

Respecto a la biometría mandibular, la longitud total de la mandíbula (LM) de MBI-AC (656,3 mm) y MBI-XO (678,2 mm) fueron muy similares a MBI-control (655 mm), mientras que MBI-SD alcanzó una LM muy inferior (363,5 mm) y menos parecida a la registrada en Smith *et al.* (2021) en los 7 juveniles (429-441 mm) de zifio de Sowerby; las LM de los otros zifios fueron más similares a las de los adultos del estudio (682-597 mm). Por otra parte, la región fusionada de la sínfisis en MBI-AC y MBI-XO fueron muy similares (29,9 % y 27,8 % LM, respectivamente), pero algo más bajas que en MBI-control (35,2 % LM), mientras que MBI-SD presentó una medida notablemente inferior (17,8 % LM), denotando que la región fusionada de la sínfisis es menor respecto a la LM, propio de crías y juveniles que aún no han completado la fusión y el crecimiento (Besharse, 1971; Mead, 1984). En la longitud alveolar se observaron diferencias notables debidas al tamaño y al grado de erupción de los dientes (Besharse, 1971): MBI-control y MBI-AC, que presentaban los colmillos erupcionados, mostraron una mayor longitud alveolar (9 y 10 % LM, respectivamente) a diferencia de MBI-XO y MBI-SD que los tenían ocultos (3,2 y 5,8 % LM, respectivamente). Además, MBI-AC presentó una menor longitud del diente (60,9 mm / 9,3 % LM) que MBI-control (87 mm / 13,3 % LM); esto puede indicar que MB-AC es un adulto que ha erupcionado más recientemente y aún no ha completado su crecimiento post-erupción, es decir, un adulto más joven que MBI-control, puesto que la erupción de los colmillos marca el inicio de la fase adulta (Würsig & Orbach, 2023).

Para ilustrar la variabilidad interna de las biometrías en los cuatro zifios (sin intención de inferir sobre la población del zifio de Sowerby), se calcularon estadísticos descriptivos básicos debido a que solo se disponía de cuatro ejemplares (n=4). Las medidas craneales mostraron un coeficiente de variación elevado para la LCB (CV=20,3 %) y la longitud del rostro (CV=21,5 %), traduciéndose en que existe una variabilidad notable en el tamaño y la forma del cráneo entre los ejemplares; sin embargo, la longitud de la órbita fue la medida que menor variación mostró (CV=12,2 %). Este contraste se debe a que en odontocetos el complejo de huesos que forman la órbita se desarrolla y alcanza el tamaño definitivo en etapas tempranas, antes de que se complete el alargamiento rostral, la fusión mandibular y que las suturas rostrales completen su fusión (Heyning, 1989; Mead, 1984). En las medidas mandibulares se observaron coeficientes de



variación muy elevados para la longitud del alveolo (CV=49,2 %), la longitud de la sínfisis (CV=37 %) y en la longitud pico-margen anterior alveolo (CV=33,3 %), revelando una gran dispersión atribuible mayoritariamente a las diferencias ontogenéticas (Dalebout *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 2021). Por el contrario, la longitud vertical del diente fue la que menor variación presentó (CV=17,6 %), pudiendo reflejar una pequeña diferencia vinculada a la edad exacta en adultos (Würsig & Orbach, 2023). En definitiva, la estadística descriptiva confirma que existe una heterogeneidad interna en las medidas cráneo-mandibulares, dominada por diferencias en el desarrollo durante el crecimiento, aunque también podría ser coincidente con lo descrito por Smith *et al.* (2021), quienes reportan diferencias biométricas entre poblaciones de zifios de Sowerby del Atlántico este y oeste.

Los estudios de genética molecular proporcionaron información clave que, en varios aspectos, complementa y esclarece los hallazgos morfológicos. MBI-AC era un macho con dientes erupcionados y al que en la necropsia se le encontraron los órganos genitales completos (pene y testículos); en el caso de MBI-SD, el sexo de era desconocido; y para MBI-XO existían dudas de que se tratase realmente de un macho: durante la necropsia no se encontraron los testículos (pero sí el pene) y pese a tener una longitud cercana a la de un adulto (449 cm) los dientes estaban escondidos en las encías (típico de hembras) (MacLeod & Herman, 2004; Würsig & Orbach., 2023). Por ello se realizó la amplificación por PCR de los intrones *Zfx* y *Zfy* de los cromosomas sexuales, obteniéndose dos bandas (~1050 pb para *Zfx* y ~950 pb para *Zfy*) que confirmaron un cariotipo XY y, por ende, que los tres individuos eran machos. Esta identificación genética del sexo es esencial para evitar clasificaciones erróneas basadas solo en la morfología externa, muy importante en los zifios si solo se emplea el criterio de la erupción de los dientes para establecer el sexo de los individuos (Jefferson *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2021). Por otro lado, mediante una técnica molecular cuantitativa (Amplicon-Seq) Einfeldt *et al.* (2019) hallaron aneuploidía XXY en tres zifios del Atlántico norte (dos *Hyperoodon ampullatus* y un *Mesoplodon mirus*), los cuales mostraban rasgos sexuales masculinos y femeninos simultáneamente, recalando que la morfología externa no basta para determinar el sexo. Con perspectivas futuras, MBI-XO podría ser un buen candidato para este protocolo ya que, aunque su morfología atípica puede deberse a una variación individual, otra posible causa podría ser la intersexualidad.

Para identificar sin lugar a duda la especie se secuenció la región control del ADN mitocondrial, puesto que se trata un marcador altamente fiable para la identificación de especies de zifios (Dalebout *et al.*, 2004). Tras obtener las secuencias consenso de los tres ejemplares, se sometieron a un análisis BLASTn contra la base de datos “nt_core” de NCBI y presentaron la mejor correspondencia con *Mesoplodon bidens* (AY579507.1), con porcentajes de identidad $\geq 96\%$ y valores de *E-value* inferiores a 10^{-161} . Estas coincidencias indican que los tres individuos estudiados pertenecen a la misma especie: zifio de Sowerby. Sin embargo, la base de datos “nt_core” de NCBI proviene mayoritariamente de GenBank, la cual presenta numerosos



problemas con las secuencias genéticas de cetáceos como la falta de validación morfológica rigurosa y el muestreo taxonómicamente insuficiente (Hare *et al.*, 2002). Por esta razón, se decidió comprobar los resultados sometiendo las secuencias contra la base de datos de “Witness for the Whales” de DNA Surveillance, donde cada secuencia ha sido validada morfológicamente por especialistas, lo que reduce drásticamente el riesgo de asignaciones erróneas (Dalebout *et al.*, 2004). Finalmente, los resultados en DNA Surveillance coincidieron con los de NCBI, identificando de forma inequívoca que se trataba de zifios de Sowerby.

Esta validación molecular es crucial puesto que los caracteres morfológicos cráneo-mandibulares de mesoplodontes atlánticos pueden solaparse entre *M. bidens* y *M. mirus* y con otras especies de mesoplodontes atlánticos (Kobayashi *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 2021). Estos resultados, además, coinciden y validan los obtenidos en los estudios TC y anatómicos, y han permitido confirmar que las ligeras variaciones morfológicas y biométricas corresponderían a variaciones en la ontogenia e individuales. El hecho de que dos ejemplares careciesen de dientes erupcionados subraya la importancia de no basar la identificación de especie y sexo en zifios exclusivamente en este criterio.

Los resultados moleculares en este trabajo demuestran la necesidad de integrar estas pruebas en protocolos de identificación de especies, especialmente cuando se examinan cadáveres en estados de conservación desfavorables o en ejemplares juveniles. Tal y como han enfatizado Visser *et al.* (2022), la simple morfología puede llevar a clasificaciones erróneas que a su vez dificultan la evaluación de abundancia relativa, estructura poblacional y patrones de varamiento de *M. bidens*. Asimismo, el sexo determinado por PCR permite corregir posibles sesgos al estimar la proporción machos/hembras en varamientos, dato relevante para estudios demográficos (Reeves *et al.*, 2005).

6. CONCLUSIONES

- El empleo de técnicas anatómicas, de diagnóstico por imagen y de genética molecular ha permitido validar la hipótesis de partida y confirmar que MBI-XO y MBI-SD eran zifios de Sowerby (*Mesoplodon bidens*).
- Los estudios de TC y biometrías de la cabeza mostraron las similitudes morfológicas y de tamaño de MBI-XO y MBI-SD con *M. bidens*; por su parte, la disección sí permitió identificar a ambos individuos como zifios de Sowerby, ya que es la única especie de zifio que presenta surcos en el suelo de la cavidad espiracular.
- Los estudios anatómicos y de TC demostraron que MBI-SD presentaba caracteres morfológicos propios de una cría de zifio de Sowerby, mientras que MBI-XO presentaba caracteres morfológicos compatibles con un estadio juvenil o subadulto de zifio de Sowerby.



- El estudio genético demostró que MBI-XO y MBI-SD presentaban cariotipo XY, permitiendo clasificarlos por tanto como machos, aunque no se puede descartar una posible intersexualidad en MBI-XO.
- La genética molecular demostró ser la prueba más fiable para la identificación de la especie en MBI-XO y MBI-SD, por lo que se recomienda integrar el análisis genético en los protocolos de la Red de Varamientos de Galicia para asegurar una identificación de especie en casos dudosos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- **Alves, F., Mesnick, S., Rosso, M., & Pitman, R.** (2023). Beaked whale sexual dimorphism, mating strategies, and diversification. En *Sex in cetaceans: Morphology, behavior, and the evolution of sexual strategies* (Cap. 17). 10.1007/978-3-031-35651-3_17.
- **Berta, A., Sumich, J. L., & Kovacs, K. M.** (2015). *Marine mammals evolutionary biology* (3.^a ed.). Academic Press. 713 pp.
- **Besharse, J. C.** (1971). Maturity and sexual dimorphism in the skull, mandible, and teeth of the beaked whale, *Mesoplodon densirostris*. *Journal of Mammalogy*, 52(2), 297–315. <https://doi.org/10.2307/1378674>
- **Bottlenose Dolphin Research Institute.** (2024). BDRI's studied species. Recuperado 13 de mayo de 2025 de <https://www.thebdri.com/species.html?utm>
- **Carrillo, M., & Tejedor, M.** (2007). Los zifios en las Islas Canarias. *El INdiferente*, 19, 52–63. <https://www.canariasconservacion.org/Documentos/Zifios.El%20Indiferente.pdf>
- **Carwardine, M.** (2019). *Handbook of whales, dolphins and porpoises*. Bloomsbury Publishing.
- **CEMMA.** (2025). Recuperación de cetáceos varados en Galicia. Recuperado 13 de mayo de 2025 de http://www.cemma.org/recuperacion_gal.htm
- **Committee on Taxonomy.** (2024). List of marine mammal species and subspecies. Recuperado 14 de abril de 2025 de <https://www.marinemammalscience.org>
- **Coordinadora para o Estudo dos Mamíferos Mariños (CEMMA).** (2022). *Datos generales de la Red de Varamientos de Galicia en 2023* (Boletín informativo Revargal, n.º 2) [Boletín informativo]. https://www.cemma.org/inve/Revargal_boletin_1_esp.pdf
- **Coordinadora para o Estudo dos Mamíferos Mariños (CEMMA).** (2023). *Datos generales de la Red de Varamientos de Galicia en 2023* (Boletín informativo Revargal, n.º 2) [Boletín informativo]. https://www.cemma.org/inve/Revargal_boletin_2_esp.pdf
- **Cozzi, B., Huggenberger, S., & Oelschläger, H. A.** (2016). *Anatomy of dolphins: Insights into body structure and function*. Academic Press.



- **Cranford, T. W., Amundin, M., & Norris, K. S.** (1996). Odontocete nasal complex: Anatomy and functional morphology. *The Anatomical Record*, 253, 225–264. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(199606\)228:3<223::AID-JMOR1>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199606)228:3<223::AID-JMOR1>3.0.CO;2-3)
- **Dalebout, M. L., Baker, C. S., Mead, J. G., Cockcroft, V. G., & Yamada, T. K.** (2004). A comprehensive and validated molecular taxonomy of beaked whales, family Ziphiidae. *Journal of Heredity*, 95(6), 459–468. <https://doi.org/10.1093/jhered/esh054>
- **Dalebout, M. L., Ross, G. J. B., Baker, C. S., Anderson, R. C., Best, P. B., Cockcroft, V. G., Hinsz, H. L., Peddemors, V., & Pitman, R. L.** (2003). Appearance, distribution, and genetic distinctiveness of Longman's beaked whale *Indopacetus pacificus*. *Marine Mammal Science*, 19(3), 421–461. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2003.tb01314.x>
- **Dalebout, M. L., van Helden, A. V., van Waerebeek, K., & Baker, C. S.** (1998). Molecular genetic identification of southern hemisphere beaked whales (Cetacea: Ziphiidae). *Molecular Ecology*, 7(6), 687–694. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00380.x>
- **DNA Surveillance Auckland.** (2025). How to. Recuperado 10 de junio de 2025 de <https://dna-surveillance.auckland.ac.nz/frontpage/howto.html>
- **Einfeldt, A.L., Orbach D.N., Feyrer, L.J.** (2019a) A method for determining sex and chromosome copy number: sex-by-sequencing reveals the first two species of marine mammals with XXY chromosome condition. *Journal of Mammalogy* 100: 1671–1677. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyz131>
- **Ellis, R., & Mead, J. G.** (2017). *Beaked whales: A complete guide to their biology and conservation*. Johns Hopkins University Press.
- **Fordyce, R. E.** (2018). Cetacean evolution. En B. Würsig, J. G. M. Thewissen, & K. M. Kovacs (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals* (3.^a ed., pp. 180–185). Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-373553-9.00053-5>
- **Genomics, M., & Mancía, A.** (2018). On the revolution of cetacean evolution. *Marine Genomics*, 41, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2018.08.004>
- **Geraci, J. R., & Lounsbury, V. J.** (2005). *Marine mammals ashore: A field guide for strandings* (2.^a ed.). National Aquarium in Baltimore.
- **Hare, M. P., Cipriano, F., & Palumbi, S. R.** (2002). Genetic evidence on the demography of speciation in allopatric dolphin species. *Evolution*, 56, 804–815. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01391.x>
- **Heyning, J. E.** (1989). Comparative facial anatomy of beaked whales (Ziphiidae) and a systematic revision among the families of extant Odontoceti. *Contributions in Science*, 405, 1–64. <https://doi.org/10.5962/p.226812>



- **Heyning, J. E., & Mead, J. G.** (1996). Suction feeding in beaked whales: Morphological and observational evidence. *Contributions in Science*, 464, 1–12. <https://doi.org/10.5962/p.226802>
- **Hooker, S. K., & Baird, R. W.** (1999). Observations of Sowerby's beaked whales, *Mesoplodon bidens*, in the Gully, Nova Scotia. *Canadian Field-Naturalist*, 113(2), 273–277. <https://doi.org/10.5962/p.358569>
- **International Union for Conservation of Nature.** (2025). *The IUCN Red List of Threatened Species*. Retrieved June 11, 2025, from <https://www.iucnredlist.org/>
- **Jauniaux, T., André, M., Dabin, W., De Vreese, S., Gillet, A., & Morell, M.** (2019). *Marine mammals stranding guidelines for post-mortem investigations of cetaceans & pinnipeds*. ACCOBANS.
- **Jefferson, T. A., Leatherwood, S., & Webber, M. A.** (1993). *Marine mammals of the world: FAO species identification guide*. FAO.
- **Jefferson, T. A., Webber, M. A., & Pitman, R. L.** (2015). *Marine mammals of the world: A comprehensive guide to their identification*. Elsevier.
- **Kitchener, A., Herman, J., Doeschate, M., Davison, N., Brownlow, A., Schwarz, T., Kinze, C., & Hantke, G.** (2023). The prevalence of vestigial teeth in two beaked whale species from the North Atlantic. *Mammalia*, 87(2), 190–200. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2022-0099>
- **Kobayashi, N., Tokutake, K., Yoshida, H., Okabe, H., Miyamoto, K., Ito, H., Higashi, N., Fukada, S., Yamazaki, K., Higa, S., Kawazu, I., & Ueda, K.** (2021). The first stranding record of Longman's beaked whale (*Indopacetus pacificus*) in Okinawa, Japan. *Aquatic Mammals*, 47(2), 153–160. <https://doi.org/10.1578/AM.47.2.2021.153>
- **Lanzetti, A., Coombs, E. J., Portela Míguez, R., Fernández, V., & Goswami, A.** (2022). The ontogeny of asymmetry in echolocating whales. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289, 20221090. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1090>
- **Ledwell, W., Lien, J., & Wareham, D.** (2005). A possible ship collision with a Sowerby's beaked whale (*Mesoplodon bidens*) that stranded in Conception Bay, Newfoundland. *The Osprey*, 36, 1–4.
- **Lien, J., & Barry, F.** (1990). Status of Sowerby's beaked whale, *Mesoplodon bidens*, in Canada. *The Canadian Field-Naturalist*, 104(1), 125–130. <https://doi.org/10.5962/p.356316>
- **MacLeod, C. D.** (2018). Beaked whales, an overview. En B. Würsig, J. G. M. Thewissen, & K. M. Kovacs (Eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals* (3.^a ed., pp. 80–83). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804327-1.00062-5>



- **MacLeod, C. D., & Herman, J.** (2004). Development of tusks and associated structures used in aggressive intrasexual interactions in Sowerby's beaked whale, *Mesoplodon bidens*. *Mammalia*, 68, 175–184. <https://doi.org/10.1515/mamm.2004.018>
- **Martín, V., Tejedor, M., Pérez-Gil, M., Dalebout, M. L., Arbelo, M., & Fernández, A.** (2011). Short note: A Sowerby's beaked whale (*Mesoplodon bidens*) stranded in the Canary Islands: The most southern record in the eastern North Atlantic. *Aquatic Mammals*, 37(4), 512. <https://doi.org/10.1578/AM.37.4.2011.512>
- **McKenna, M. F., Cranford, T. W., Berta, A., & Pyenson, N. D.** (2012). Morphology of the odontocete melon and its implications for acoustic function. *Marine Mammal Science*, 28, 690–713. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2011.00526.x>
- **Mead, J. G.** (1984). Survey of reproductive data for the beaked whales (Ziphiidae). En W. F. Perrin, R. L. Brownell Jr., & D. P. DeMaster (Eds.), *Reproduction in whales, dolphins and porpoises: Cetacean reproduction: Estimating parameters for stock assessment and management* (Rep. Int. Whal. Commn. Spec. Iss. 6, pp. 91–96). International Whaling Commission. <http://hdl.handle.net/10088/4730>
- **Mead, J. G.** (1989). Beaked whales of the genus *Mesoplodon*. En S. H. Ridgway & R. Harrison (Eds.), *Handbook of Marine Mammals, Vol. 4: River dolphins and the larger toothed whales* (pp. 349–430). Academic Press.
- **Mead, J. G.** (2009). Beaked whales, overview: Ziphiidae. En W. F. Perrin, B. Würsig, & J. G. M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals* (2.^a ed., pp. 94–97). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373553-9.00027-4>
- **Miján, I.** (2011, Enero). Ballenato de Cuvier – *Ziphius cavirostris* (Cuvier, 1823). En A. Salvador & J. Cassinello (Eds.), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. <https://www.vertebradosibericos.org/mamiferos/identificacion/zipcavid.html>
- **Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico.** (2022). *Protocolo Nacional de Actuación ante Varamientos de Cetáceos*. Recuperado de https://www.miteco.gob.es/content/dam/mitesco/es/biodiversidad/temas/biodiversidad-marina/bm_hayem_em_mm_protocolo_nacional_cetaceos_tcm30-549104.pdf
- **Moore, J. C.** (1968). Relationships among the living genera of beaked whales with classifications, diagnoses and keys. *Fieldiana: Zoology*, 53(4), 209–298. Recuperado de <https://archive.org/details/biostor-52154>
- **National Center for Biotechnology Information.** (2025). *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool* [Computer software]. National Center for Biotechnology Information. Retrieved June 10, 2025, from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



- **O’Callaghan, S. A., Overy, L., Hunt, L., Foxall, D., Collins, M., & O’Connell, M.** (2022). Strandings of a neonate and a pregnant Sowerby’s beaked whale (*Mesoplodon bidens* (Sowerby, 1804)) in Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 102(5), 309–314. doi:10.1017/S0025315422000492
- **Pereira, J. N., Neves, V. C., Prieto, R., Silva, M. A., Cascão, I., Oliveira, C., Cruz, M. J., Medeiros, J. V., Barreiros, J. P., Porteiro, F. M., & Clarke, D.** (2011). Diet of mid-Atlantic Sowerby’s beaked whales *Mesoplodon bidens*. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 58(11), 1084–1094. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2011.08.004>
- **Perrin, W. F., & Myrick, A. C. (Eds.).** (1980). *Age determination of toothed whales and sirenians* (Rep. Int. Whal. Commn. Spec. Iss. 3). International Whaling Commission.
- **Pitman, R. L., & Brownell, R. L. Jr.** (2020). *Mesoplodon bidens*. En *The IUCN Red List of Threatened Species 2020*: e.T13241A50363686. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T13241A50363686.en>
- **Reeves, R. R., Folkens, P. A. (Ilustr.), et al.** (2005). *Guía de los mamíferos marinos del mundo*. National Audubon Society.
- **Reidenberg, J. S.** (2007). Anatomical adaptations of aquatic mammals. *The Anatomical Record*, 290(6), 507–513. <https://doi.org/10.1002/ar.20541>
- **Reidenberg, J. S., & Laitman, J. T.** (2009). Cetacean prenatal development. En W. F. Perrin, B. Würsig, & J. G. M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals* (2.^a ed., pp. 220–230). Academic Press.
- **Román López, M.** (2024). *Zifio de Sowerby (Mesoplodon bidens): Estudio anatómico y radiológico de la región de la cabeza* [Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Santiago de Compostela].
- **Rommel, S. A., Costidis, A. M., Fernández, A., Jepson, P. D., Pabst, D. A., McLellan, W. A., Houser, D. S., Cranford, T. W., van Helden, A. L., & Allen, D. M.** (2006). Elements of beaked whale anatomy and diving physiology and some hypothetical causes of sonar-related stranding. *Journal of Cetacean Research and Management*, 7(3), 189–209. <https://doi.org/10.47536/jcrm.v7i3.730>
- **Schenkkan, E. J., & Purves, P. E.** (1973). The comparative anatomy of the nasal tract and the function of the spermaceti organ in the Physeteridae (Mammalia, Odontoceti). *Bijdragen tot de Dierkunde*, 43, 93–112. <https://doi.org/10.1163/26660644-04301004>
- **Shaw, C. N., Wilson, P. J., & White, B. N.** (2003). A reliable molecular method of gender determination for mammals. *Journal of Mammalogy*, 84(1), 123–128. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2003\)084<0123:ARMMOG>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2003)084<0123:ARMMOG>2.0.CO;2)



- **Shindo, J., Yamada, T. K., Yoshimura, K., & Kageyama, I.** (2008). Morphology of the tongue in a newborn Stejneger's beaked whale (*Mesoplodon stejnegeri*). *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 84(4), 121–124.
- **Smith, K. J., Mead, J. G., & Peterson, M. J.** (2021). Specimens of opportunity provide vital information for research and conservation regarding elusive whale species. *Environmental Conservation*, 48(2), 84–91. <https://doi.org/10.1017/S0376892920000521>
- **Thewissen, J. G. M., Cooper, L. N., Clementz, M. T., Bajpai, S., & Tiwari, B. N.** (2007). Whales originated from aquatic Artiodactyls in the Eocene epoch of India. *Nature*, 450, 1190–1195. <https://doi.org/10.1038/nature06343>
- **Thewissen, J. G. M., Cooper, L. N., George, J. C., & Bajpai, S.** (2009). From land to water: The origin of whales, dolphins, and porpoises. *Evolution: Education and Outreach*, 2(2), 272–288. <https://doi.org/10.1007/s12052-009-0135-2>
- **Visser, F., Oudejans, M. G., Keller, O. A., Madsen, P. T., & Johnson, M.** (2022). Sowerby's beaked whale biosonar and movement strategy indicate deep-sea foraging niche differentiation in mesoplodont whales. *Journal of Experimental Biology*, 225(9), jeb243728. <https://doi.org/10.1242/jeb.243728>
- **Waller, G. N. H.** (2014). A review of nineteenth-century records of Sowerby's beaked whale (*Mesoplodon bidens*). *Archives of Natural History*, 41(2), 338–350. <https://doi.org/10.3366/anh.2014.0252>
- **Whale and Dolphin Conservation.** (2020). *Sowerby's beaked whale*. Whale and Dolphin Conservation. Retrieved June 11, 2025, from <https://uk.whales.org/whales-dolphins/species-guide/sowerbys-beaked-whale/>
- **Würsig, B., & Orbach, D. N. (Eds.).** (2023). *Sex in cetaceans: Morphology, behavior, and the evolution of sexual strategies*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-35651-3>