

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE- FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
BIOLÓGICA

AVALIAÇÃO HISTÓRICA DA ECOLOGIA ESPACIAL E
TRÓFICA DO BOTO-DE-LAHILLE (*Tursiops truncatus*
gephyreus) POR MEIO DA ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS

ANDREA CAMPOS RANGEL

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação em
Oceanografia Biológica da
Universidade Federal do Rio
Grande-FURG como requisito
parcial à obtenção do título de
MESTRE.

Orientadora: Professora Dra. Silvina Botta

Co-orientador: Dr. Pedro F. Fruet

RIO GRANDE
Março 2020

AGRADECIMENTOS

Primeramente, agradezco a Silvina, eres un gran ser humano y una orientadora excepcional, es un orgullo haber trabajado y aprendido tanto de ti, gracias por la paciencia y ayuda en todos los aspectos.

Al Doctor Ricardo Bastida por las muestras concedidas y porque aún a la distancia se mantuvo pendiente y siempre disponible para aclarar mis dudas; a Meica Valdivia por recibirme en su casa de la mejor manera y ayudarme en el muestreo.

Um agradecimento também para o Dr. Pedro Fruet e todos (as) envolvidos (as) na pesquisa que com os seus comentários e aportes ajudaram a melhorar o trabalho, assim como aos professores que se disponibilizaram a fazer parte da banca.

Sempre estarei muito contente de ter conhecido e trabalhado no ECOMEGA, mais do que um grupo de trabalho é uma família que levarei no meu coração, obrigada a todos, especialmente a Andréa, Juh e Camila que se tornaram tão amigas e que sempre estiveram aí para me escutar, e claro, rir e desfrutar milhões.

Para esses brasileiros que me apoiaram quando eu mais precisei e sem vocês talvez eu não tivesse conseguido este mestrado, um agradecimento especial a Geraldo, Verónica, Virginia, Denis e “Manu”.

Víctor, María, Andy y Russell, gracias por el apoyo incondicional, me ayudaron a seguir firme y fuerte en este camino, estoy muy feliz de haberlos conocido y tener una valiosa amistad en cada uno, a su forma todos son personas maravillosas y realmente los aprecio.

Indudablemente mi mayor apoyo ha sido, es y será mi familia, me alientan siempre a crecer como persona y profesionista. Cada día lejos de ustedes ha sido una batalla, pero también mi motivación para trabajar duro. Gracias por ser y estar, los amo.

A tod@s l@s que formaron parte de mi vida de una u otra forma durante estos años en Brasil: ¡GRACIAS!

INDICE

	Página
Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução.....	3
Material e Métodos.....	12
Resultados e Discussão.....	16
Conclusões.....	18
Referências bibliográficas.....	18
Apêndice I.....	26
Apêndice II.....	64

Resumo

No Oceano Atlântico Sul-Occidental, o boto-de-Lahille (*Tursiops truncatus geophyreus*) distribui-se de forma restrita nas águas costeiras do sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina. Seus hábitos costeiros o tornam uma espécie suscetível a impactos antrópicos, principalmente aos efeitos negativos das interações com atividades pesqueiras, como a redução da disponibilidade de suas presas. Com o objetivo de avaliar mudanças históricas na dieta e estimar a ecologia trófica e uso do habitat atual do boto foram realizadas análises de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em amostras de osso de espécimes depositados em museus e coleções científicas do Brasil (BR), Uruguai (URU) e Argentina (ARG), coletadas nos períodos I (1900-1950), II (1951-1980), III (1981-2000), e IV (2000-2017). Os valores isotópicos dos botos da ARG foram diferentes do URU e BR desde mediados do SXX até o presente (períodos II, III e IV), refletindo uma provável variação na composição da dieta ou diferenças nos valores isotópicos basais entre as áreas. Estas diferenças coincidem com a separação em Unidades Evolutivamente Significantes previamente postuladas com base em dados genéticos. Na ARG o nicho isotópico consideravelmente amplo da espécie evidenciado nas amostras coletadas no período I foi substituído por um nicho mais estreito nos períodos III e IV, ocupando apenas uma porção deste nicho mais amplo do período I. Nesta área, o boto tinha uma presença comum ao longo de toda a região norte da costa argentina. Hoje, apenas populações com um número reduzido de indivíduos podem ser encontradas ao sul da província de Buenos Aires e na costa norte da Patagônia. A dieta do boto teve uma pequena alteração nas proporções das presas entre os períodos III e IV nesta área. No URU, peixes como *Trichiurus lepturus* e *Mugil* sp. são as que mais contribuem com a dieta atualmente (Período IV). Porém, outras espécies demersais também faziam parte da dieta durante o período III, porém em menor proporção que as duas principais. Estas mudanças podem ser devidas à sobre-exploração de presas demersais como demonstrado para a população do estuário da Lagoa dos Patos (BR). A análise retrospectiva de amostras arquivadas em coleções científicas do boto-de-Lahille contribuiu para ampliar o conhecimento da estrutura ecológica e do comportamento alimentar dessa subespécie pouco conhecida.

Palavras chave: Dieta, Modelos de mistura, Nicho isotópico, Oceano Atlântico Sul-Occidental, boto-de-Lahille.

Abstract

In the Southwest Atlantic Ocean, the Lahille's bottlenose dolphin (LBD - *Tursiops truncatus gephyreus*) is restricted to the coastal waters of southern Brazil, Uruguay and northern Argentina. Its coastal habits make it a species susceptible to anthropogenic impacts, mainly to the negative effects of interactions with fishing activities, such as the reduction of the availability of its prey. In order to evaluate historical changes in the diet and estimate the trophic ecology and use of the current habitat of the LBD, analyzes of stable isotopes of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) were carried out on bone samples from specimens deposited in museums and collections scientific data from Brazil (BR), Uruguay (UY) and Argentina (ARG), collected in periods I (1900-1950), II (1951-1980), III (1981-2000), and IV (2000-2017). The isotopic values of ARG dolphins were different from UY and BR from mid-20th century to the present, reflecting a probable variation in the composition of the diet or differences in the basal isotopic values between the areas. These differences coincide with the separation into Evolutionary Significant Units previously postulated based on genetic data. In the ARG the considerably broad isotopic niche of the species shown in the samples collected in period I was replaced by a narrower niche, occupying only a portion of this primordial niche. In this area, the dolphin had a common presence throughout the northern region of the Argentine coast. Today, only a few populations with a small number of individuals can be found south of the province of Buenos Aires and on the northern coast of Patagonia. The current LBD diet had a small change in the proportions of prey between periods III and IV in this area. In UY, fish such as *Trichiurus lepturus* and *Mugil* sp. are the ones that most contribute to the diet in the present (Period IV). However, other demersal species were also part of the diet during period III, but to a lesser extent than the main two. These changes may be due to the overexploitation of demersal prey as shown for the population of BR. The retrospective analysis of samples stored in scientific collections of the Lahille's bottlenose dolphin contributed to the knowledge of the ecological structure and feeding behavior of this little-known subspecies

Keywords: Diet, Mixing models, Isotopic niche, South-Western Atlantic Ocean, Lahille's bottlenose dolphin

1.INTRODUÇÃO

Os grandes predadores marinhos são de particular interesse como indicadores de mudanças no ecossistema devido a sua elevada posição trófica na cadeia alimentar e ciclo de vida normalmente longo (Sergio et al. 2008). Mudanças na ecologia trófica (nível trófico, localização de forrageamento) têm sido consideradas como importantes reguladores do tamanho das populações e da distribuição de organismos marinhos (Österblom et al. 2008).

Os cetáceos são animais de grande porte e altamente móveis que vivem em ambientes dinâmicos, sendo considerados predadores importantes nos ecossistemas marinhos (Savenkoff et al. 2008). Entender as interações tróficas e as posições que estes organismos ocupam nas teias alimentares, contribui para a compreensão do funcionamento, estrutura e fluxo energético dos ecossistemas marinhos (Pauly et al. 1998). Como os principais predadores dependem de transferências de energia que ocorre a cada nível trófico, eles são sensíveis a perturbações em qualquer ponto da cadeia alimentar. Assim, alterações no tamanho da população, distribuição ou ecologia de forrageamento dos principais predadores podem indicar mudanças estruturais dos ecossistemas (Rossman et al. 2012).

Existe também uma variedade de distúrbios antropogênicos, incluindo poluição, alteração de habitat e perturbações climáticas que podem afetar os ecossistemas marinhos. Não obstante, a alteração no ecossistema é frequentemente difícil de documentar porque os distúrbios ocorrem em várias escalas temporais e a grande maioria dos estudos ecológicos se estende por apenas alguns anos (Knowlton & Jackson 2008). Apesar das diversas pressões sobre seus habitats, os mamíferos marinhos que habitam ambientes costeiros altamente modificados parecem ter alta capacidade de adaptação às mudanças. Porém, como as alterações demográficas podem ser lentas e difíceis de detectar, raramente é comprovado se tais alterações têm efeitos negativos. No caso de pequenas populações locais de espécies ameaçadas de extinção, como a baleia-franca-do-norte (*Eubalaena glacialis*), a vaquita (*Phocoena sinus*), os perigos das pressões de habitat são evidentes. Porém o conhecimento é ainda limitado para várias espécies (Evans 2018).

O golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) é uma espécie amplamente distribuída em águas tropicais e temperadas de todos os oceanos, ocorrendo ao longo da costa e em águas mais profundas, tanto na plataforma continental quanto em oceano aberto

(Leatherwood & Reeves 1983). Esta adaptação a uma ampla variedade de ambientes resulta numa variação geográfica significativa da espécie, sendo reconhecidos ecótipos costeiros e oceânicos em várias regiões ao longo da sua distribuição (Perrin et al. 2011).

No Oceano Atlântico Sul Ocidental (ASO) o golfinho-nariz-de-garrafa ocorre desde a foz do Rio Amazonas, no norte do Brasil (Siciliano et al. 2008) até a província argentina de Tierra del Fuego (Godall et al. 2011). Nesta região, a taxonomia da espécie tem sido controversa, devido a pontos de vista divergentes sobre o grau de diferenciação entre os ecótipos oceânico e costeiro. Os ecótipos parecem ocorrer em parapatría, sendo o ecótipo oceânico distribuído amplamente em águas mais profundas, enquanto o ecótipo costeiro parece estar restrito a áreas de baixas profundidades entre o litoral de Santa Catarina e o norte da patagônia Argentina. Características externas distintas foram descritas entre os dois ecótipos, sendo que o costeiro apresenta uma nadadeira dorsal triangular, focinho mais longo e coloração cinza clara; O ecótipo costeiro foi descrito pela primeira vez por Lahille (1908) como *Tursiops geophyreus*. Já o ecótipo oceânico apresenta coloração mais escura e nadadeira dorsal falcada (Vermeulen & Cammareri 2009, Simões-Lopes et al. 2019). Recentemente foi encontrada uma marcada diferenciação genética entre os ecótipos costeiro e oceânico sugerindo isolamento genético de longo prazo no ASO (Fruet et al. 2017). Por esta razão, especialmente devido a diferenças na morfologia craniana, alguns autores defendem que essas características são suficientes para classificar o ecótipo costeiro como uma espécie, o boto-de-Lahille *Tursiops geophyreus* (Wickert et al. 2016). Por outro lado, alguns autores defendem a teoria de que os ecótipos ainda encontram-se em processo de especiação recente e, portanto, deveriam ser classificados como uma subespécie, *T. t. geophyreus* (Costa et al. 2016; 2019). Neste trabalho, é assumida a condição de subespécie. Porém, independentemente da sua classificação taxonômica atual e sob ponto de vista biológico, é importante considerar que o boto-de-Lahille é uma entidade evolutiva distinta do ecótipo oceânico e, portanto, deverá ser tratada como tal para fins de pesquisa, conservação e ações de mitigação de impactos.

Especificamente sobre o boto-de-Lahille (daqui para diante referido como boto), destaca-se que a espécie ocorre somente em uma pequena porção do Oceano Atlântico Sul-Ocidental, em águas do sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina (Costa et al. 2016, Vermeulen et al. 2017). Suas populações são pequenas e preferencialmente ocorrem em

zonas costeiras e estuarinas, em águas rasas, com profundidades inferiores a 20 m (Di Tullio et al. 2016).

Estudos genéticos evidenciam duas linhagens distintas do boto, uma que ocorre na Argentina e outra no sul do Brasil e Uruguai, representando duas unidades evolutivas diferentes. Além disso, apresentam níveis de diversidade genética nuclear notavelmente baixos, refletindo o pequeno tamanho das comunidades locais de botos ao sul do Brasil, Uruguai e Argentina central (Fruet et al. 2014), as quais não ultrapassam os 100 indivíduos (Fruet et al. 2016).

Os machos podem atingir aproximadamente 400 cm de comprimento, sendo que se estima que atinjam a maturidade sexual com tamanhos corporais superiores a 350 cm e ao redor dos 18 anos. Por outro lado, as fêmeas parecem estar maduras sexualmente quando atingem tamanhos superiores a 316 cm e 13 anos de idade (Venuto et al. 2020). A primavera e verão demarcam sua época reprodutiva, quando os indivíduos têm maior atividade na superfície e maior contato entre os indivíduos. É uma espécie poligâmica e procriam uma única cria a cada dois ou três anos, em média (Fruet et al. 2015, Laporta et al. 2016).

O boto é considerado um consumidor generalista. No Estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente a espécie é preferencialmente ictiófaga consumindo principalmente peixes scianídeos pelágico-demersais e demersais. Porém, apresenta algum grau de plasticidade nos hábitos de forrageio e na alimentação de acordo com padrões espaciais e temporais de disponibilidade de presas. Nesta população, foi evidenciada uma mudança na contribuição das principais presas possivelmente devido à menor disponibilidade das mesmas causadas pela sobre-exploração pela pesca comercial (Secchi et al. 2016). Por outro lado, tanto no Uruguai como na Argentina os dados sobre a dieta do boto são virtualmente inexistentes, limitando-se à descrição de presas encontradas no conteúdo estomacal de uns poucos indivíduos (Mermoz 1977, Moreno et al. 1984, Laporta et al. 2016). Estes poucos registros indicam uma dieta baseada principalmente em peixes demersais.

A situação de conservação do boto foi recentemente avaliada, sendo considerado pela IUCN como “Vulnerável” (Vermeulen et al. 2019a), enquanto no Brasil a subespécie é considerada como “Em Perigo” e consta nas listas das espécies ameaçadas de Uruguai (Soutullo et al. 2013) e Argentina (Vermeulen et al. 2019b). Sua distribuição costeira torna

a espécie mais suscetível a impactos antrópicos, principalmente aos efeitos negativos das interações com atividades pesqueiras, como a captura incidental em redes de pesca e a competição entre os botos e a pesca por meio da redução da disponibilidade de suas presas (Fruet et al. 2012, Secchi et al. 2016).



Figura 1. Exemplar de *Tursiops truncatus gephyreus*. Foto Projeto Botos da Lagoa.

Aparentemente, as ameaças mais sérias e contínuas para os botos ao longo da costa do ASO são encontradas no sul do Brasil e Uruguai devido as taxas crescentes de mortalidade relacionada a atividades antrópicas durante a última década (Fruet et al. 2012). Esta população também enfrenta degradação do habitat costeiro considerável causado pelas atividades industriais e portuárias (Tagliani et al. 2007). No entanto, uma atividade que potencialmente pode ser a principal causa de uma mudança na ecologia do boto é a exploração pesqueira desenvolvida na região responsável, em parte, pelo crescimento urbano na periferia e o seu desenvolvimento econômico.

O estuário da Lagoa dos Patos foi objeto de múltiplas atividades humanas, sendo descritas interferências ecológicas desde o século XIX (Von Ihering 1885). Até a década de

1940, a pesca na Lagoa dos Patos e sua região estuarina dependia de pequenas embarcações e botes de remo; depois, se introduziram meios modernos de estocagem e transporte que permitiu aos pescadores artesanais realizarem a pesca de arrasto. Em 1980, a sobrepesca associada à captura indiscriminada no período de reprodução provocou uma diminuição nos estoques estuarinos de várias espécies, principalmente *Pogonia cromis* (corvina preta), *Micropogonias furnieri* (corvina) e *Genidens barbatus* (bagre) (Reis et al. 1994). Atualmente, as redes de cerco e redes costeiras de emalhe que operam muito perto da costa, e que tem como alvo espécies de peixes demersais constituem a principal ameaça à conservação do boto (Fruet et al. 2014; 2016).

Tanto no Uruguai quanto para Argentina, a mortalidade por pesca não parece ser a base do declínio histórico da população de boto (P .Laporta e R. Bastida, com. pessoal); todavia, existe pouca informação sobre possíveis ameaças diretas e indiretas aos botos nas águas uruguaias e argentinas. Especula-se que a contaminação por efluentes agrícolas possa ter um impacto significativo devido à carga poluente detectada em outros organismos marinhos na descarga do Canal Andreoni, uma área de alta ocorrência do boto (Franco-Trecu et al. 2009, Passadore et al. 2015). Por outro lado, a redução da disponibilidade de presas, causada pela sobre-exploração e destruição de ecossistemas bentônicos pelas pescarias (Lercari & Defeo 1999, Saucó et al. 2010), são outras possíveis ameaças para a subespécie no Uruguai. O estuário do Rio de la Plata tem sido explorado pelas pescarias artesanais desde 1880 e, de forma industrial aproximadamente a partir de 1980. No início dos anos 2000, a pesca da corvina *Micropogonias furnieri*, em águas mixohalinas envolve cerca de 200 embarcações e 1.000 pescadores, enquanto na Zona de Pesca Comum Argentina-Uruguai, a espécie é claramente sobreexplorada (Garcia, 2013; Mianzan et al. 2001).

Na Argentina, alguns autores registraram um declínio nos avistamentos do boto na costa norte de Buenos Aires e Chubut nas últimas décadas, principalmente na província norte de Buenos Aires, onde a espécie parece ter desaparecido completamente (Bastida & Rodríguez 2003, Coscarella et al. 2012, Vermeulen et al. 2018; 2019b) (Figura 2). Atualmente, uma pequena população residente de botos, ocupa a região da Bahia de San Antonio em Chubut (Vermeulen & Bräger 2015, Vermeulen et al. 2016). Nesta população, aparentemente, a mortalidade de adultos não é a maior ameaça, já que apresentam altas taxas de sobrevivência (Vermeulen & Bräger 2015). No entanto, foi registrado um pequeno

número de fêmeas reprodutoras e, portanto, uma baixa taxa de recrutamento nessa população, causando um declínio considerável na população (Vermeulen & Bräger 2015). Foi observada uma ausência de crias em Chubut (Coscarella 2012) como o relatado por Bastida (*comunicação pessoal*) para Buenos Aires entre 1970 e 1980. A captura acidental nas artes de pesca nesta área parece não ser comum, com apenas alguns estudos relatando captura de nove indivíduos ao total, provavelmente como resultado do uso diferencial do espaço entre as pescarias e os botos (Fruet et al. 2016). Devido às grandes pressões que as populações sofrem, o boto encontra-se protegido por lei nos três países que ele ocorre (Vermeulen et al. 2019a).



Figura 2. Boto-de-Lahille (*Tursiops truncatus gephyreus*) nas costas de Buenos Aires, Argentina, na década de 1970. Foto: Ricardo Bastida

A recuperação de informações históricas sobre a ecologia destas espécies é de extrema importância para poder compreender os fatores históricos e atuais que poderiam estar associados ao declínio das suas populações ao longo da sua distribuição.

1.2 Análise de isótopos estáveis

Estudos de dieta são comumente realizados mediante a análise de conteúdo estomacal cujo estudo fornece informações sobre as presas ingeridas nas últimas horas ou dias, o que pode levar a uma sub ou superestimação de determinadas presas devido a tempos de digestão distintos entre elas (Hyslop 1980). Desta forma, metodologias complementares, como a análise de isótopos estáveis (AIE) vêm sendo comumente aplicadas para estudos sobre a ecologia trófica e o uso do habitat dos mamíferos aquáticos (Botta et al. 2012, Riccialdelli et al. 2012) assim como para avaliar mudanças históricas na dieta (Szteren et al. 2018).

A inferência de dieta por meio da AIE baseia-se na análise da composição isotópica (expressas na notação δ , em partes por mil) dos tecidos dos consumidores, a qual é produto dos processos metabólicos envolvidos na assimilação do alimento ingerido (BenDavid & Flaherty 2012). Os isótopos estáveis mais comumente usados são os de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e nitrogênio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. A razão (R) de dois isótopos estáveis, um pesado e um leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) é quantificada nas amostras e expressa em relação à aquela encontrada num padrão internacionalmente aceito com notação $\delta X\text{‰} = [R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}] - 1 \cdot 1000$ onde $X = ^{13}\text{C}$ ou ^{15}N . Uma amostra que possui maior quantidade do isótopo pesado com relação ao padrão é comumente chamada de enriquecida, e aquelas com quantidades proporcionalmente menores do isótopo pesado e chamada empobrecida. Por outro lado, o fracionamento isotópico é o processo pelo qual um isótopo é discriminado em relação a outro, ou é absorvido preferencialmente, de forma que o produto possui um valor δ diferente a fonte. Dessa forma o fracionamento resulta num enriquecimento ou empobrecimento do isótopo pesado numa amostra (predador) em relação a sua fonte (presa). Assim, as composições isotópicas dos predadores estão diretamente relacionadas àsquelas presentes nas suas dietas, porém estão tipicamente enriquecidos nos isótopos mais pesados como produto da discriminação isotópica dos isótopos mais leves durante o metabolismo.

A menor discriminação isotópica do ^{13}C em relação ao ^{12}C comparada à maior discriminação sofrida pelo ^{15}N em relação ao ^{14}N faz com que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ sejam utilizados em conjunto para indicar a base das redes tróficas nas quais o predador está se alimentando ($\delta^{13}\text{C}$), assim como para evidenciar a posição trófica ocupada pelo predador ($\delta^{15}\text{N}$). (Peterson & Fry 1987). Estes traçadores também permitem avaliar a contribuição proporcional de potenciais recursos alimentares para a dieta por meio de modelos de mistura isotópica (Parnell et al. 2013).

A lógica por trás do uso destes traçadores para estudar o uso do habitat de diferentes predadores marinhos baseia-se na existência de um gradiente isotópico entre o ambiente costeiro, onde a produção primária se baseia em macrófitas e macroalgas (i.e. mais enriquecido em ^{13}C), e o pelágico, com valores menores de $\delta^{13}\text{C}$ devido à produção exclusivamente fitoplanctônica (Cherel & Hobson 2007, Graham et al. 2010). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ também podem variar de acordo com a profundidade da coluna d'água, onde ambientes bentônicos tendem a ser mais enriquecidos em ^{13}C (France 1994). Portanto, o $\delta^{13}\text{C}$ é comumente utilizado na investigação do uso de diferentes habitats pelos consumidores (Cherel & Hobson 2007, Graham et al. 2010). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ são comumente utilizados para estimar a posição trófica dos consumidores, assim permitindo avaliar o fluxo de energia e os níveis tróficos dos indivíduos (Post 2002). Porém, estes valores também podem ser utilizados como traçadores espaciais já que as diversas fontes de nitrogênio utilizadas pelos produtores fazem com que estes possuam valores isotópicos distintos (Sigman et al. 2009).

Ainda, estes traçadores vêm sendo utilizados para estimar o nicho ecológico de diversas espécies, por meio da interpretação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ como uma aproximação dos eixos espacial e trófico, respectivamente, do hipervolume n-dimensional ou nicho ecológico (i.e., nicho isotópico, Bearhop et al. 2004, Newsome et al. 2007).

Por outro lado, a análise de isótopos estáveis possui a vantagem de proporcionar informação referente a diversas escalas temporais por meio da análise de tecidos com diferentes taxas de renovação. Aqueles tecidos que são rapidamente renovados como a pele ou o sangue, revelam a dieta de um animal em um passado relativamente recente (Ben-David & Flaherty 2012). Por outro lado, tecidos metabolicamente inertes após a deposição (p.ex. pelos, bigodes, dentes ou barbatanas) ou de lenta renovação (p.ex. osso), permitem acessar a

informação da dieta do organismo a longo prazo (Knoff et al. 2002, Szteren et al. 2018). Assim, amostras para análise isotópica adquiridas dos dentes e ossos de espécimes de museus e coleções científicas podem ser usadas para possibilidade de analisar mudanças temporais na dieta dos organismos (Walker et al. 1999).

Neste contexto, no presente trabalho utilizaram-se amostras de ossos de exemplares de boto, depositadas em coleções científicas do Brasil, Uruguai e Argentina para investigar a variação temporal dos componentes trófico e espacial do nicho ecológico desta espécie. As hipóteses postuladas, foram as seguintes:

1. Os botos do Brasil e Uruguai serão isotopicamente distintos daqueles encontrados na Argentina, principalmente no período recente, devido ao isolamento das populações remanentes da subespécie neste último país;
2. Os botos de Uruguai e Argentina haverão sofrido uma modificação na proporção das suas presas principais devido à pressão de sobrepesca sobre as mesmas, similar ao reportado para os botos do sul do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a variação geográfica e temporal na dieta e o nicho isotópico do boto-de-Lahille, *Tursiops truncatus gephyreus*, nas costas do sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina.

2.2 Objetivos específicos

- (I) Avaliar a existência de tendências temporais nos valores isotópicos dos botos das costas do sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina;
- (II) Estimar o nicho isotópico do boto nas três áreas e suas diferenças temporais;

(III) Estimar a composição da dieta dos botos do Uruguai e Argentina e sua variação temporal.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e amostragem

Os ecossistemas costeiros do Atlântico Sul Ocidental são altamente influenciados por interações entre condições climáticas, descargas continentais e condições oceanográficas (Kjerfve et al. 2001). Nesta região é originada a Convergência subtropical a partir do encontro das águas frias da corrente das Malvinas e as águas quentes da corrente do Brasil. A região costeira caracterizada pelas condições oceanográficas e climáticas principalmente os ventos NE que dominam durante a maioria do ano e os ventos Sul durante o inverno. O ambiente estuarino-costeiro é controlado diretamente pelas descargas de água doce das bacias hidrográficas do Rio la Plata e do sistema lagunar Patos-Mirim (Seeglier & Obredecht 2010).

A Lagoa dos Patos situada no extremo sul do Brasil forma uma região estuarina de aproximadamente 1000 km² cuja conexão com o Oceano Atlântico ocorre através de um estreito canal (Seeliger 2004). O estuário é influenciado principalmente por ventos NE-SW, com padrões sazonais que fazem do vento o maior fator forçante do sistema da Lagoa dos Patos controlando a circulação, salinidade e os níveis de água. (Seeliger et al. 1998).

Por outro lado, a dinâmica do estuário do Rio de la Plata é controlada pelas ondas provocadas pela maré e pelo vento e pelo escoamento continental, mas modificada pela topografia e pela força de Coriolis. O equilíbrio entre essas forças é altamente variável, dependendo em grande parte da intensidade do estresse do vento e da descarga de água doce (Guerrero et al. 1997). Durante o outono e inverno, o estuário é caracterizado pela menor influência do vento e um máximo no escoamento do rio, resultando em um regime de menor salinidade; já durante o período de primavera e verão, há ventos em terra predominantes e um mínimo de escoamento continental induzindo uma condição de salinidade mais alta. O movimento da água salina é maior na costa norte, através do canal norte profundo. A temperatura média permanece quase homogêneo nos períodos quente (dezembro-março) e

frio (junho-setembro), tanto na escala vertical quanto na horizontal com uma variação entre 8 e 27,5 ° C (Guerrero et al. 1997). O estuário do Rio de la Plata é o acesso marítimo a um sistema fluvial altamente complexo pelo que atividades industriais e conglomerados urbanos podem afetar o habitat aquático e entrar em conflito com questões ambientais (Mianzan 2001).

Fragmentos ósseos de 103 espécimes maduros de botos-de-Lahille (*Tursiops truncatus geophyreus*) (com ossos do crânio fusionados) foram extraídos das coleções científicas de diferentes instituições da Argentina, Uruguai e Brasil. Os espécimes foram coletados entre 1903 e 2018 ao longo das costas do Rio Grande do Sul, Brasil, de algumas localidades do Uruguai e do norte da Argentina. Os pequenos fragmentos ósseos foram removidos da parte interna do crânio para não interferir nas medidas morfométricas do mesmo.

No caso da Argentina, foram coletados tecidos musculares da região dorso lateral de peixes e mantos de lulas, considerados presas potenciais para os golfinhos, de acordo com os escassos relatórios científicos e observações pessoais (Bastida e Lichtschein, 1984; Laporta et al., 2016; Moreno et al., 1984; Vermeulen et al., 2019). Estes foram coletados com várias artes de captura: pesca esportiva e artesanal para amostras costeiras e redes de arrasto para amostras estuarinas, entre abril e dezembro do 2018 em Mar del Plata e Baía Samborombón. Diversos trabalhos foram publicados sobre a dieta de predadores marinhos na região do Uruguai (e.g. Franco-Trecu et al. 2012, 2013), de forma que estes valores foram utilizados nos modelos de mistura sem a necessidade de serem realizadas amostragens de presas nesse país.

3.2 Preparação e análise química das amostras

As amostras de osso foram limpas com água destilada e lixadas com uma ferramenta Dremel para eliminar impurezas externas. Em seguida, a extração lipídica foi realizada pela técnica de clorofórmio-metanol (2: 1) durante 8 horas, utilizando um soxhlet. Os fragmentos ósseos foram pulverizados e acidificados para remover o carbono inorgânico usando HCl a uma concentração de 2% com substituição da solução ácida a cada 24 horas (dois ciclos) e

lavados com lavagens sucessivas de água deionizada e secos a 60 °C. As amostras de músculo das presas foram lavadas com água destilada e secas em estufa elétrica por 48 horas a 60-70° C. Posteriormente foram processadas com morteiro e colocadas em Eppendorf (Fig. 3)

Aproximadamente 0,7-1 mg de pó (osso e músculo) foram pesados e armazenados em cápsulas de estanho para análise isotópica. A análise de isótopos estáveis foi realizada usando um espectrômetro de massa com razão de isótopos na Universidade do Novo México (EUA). As razões isotópicas foram representadas na notação delta (δ) tendo como baseos padrões internacionais como Pee Dee Belemnite (VPDB) para carbono, N2 atmosférico para nitrogênio pela seguinte equação :

$$\delta (\text{‰}) = \frac{R_{amostra}}{R_{padr\tilde{a}o}} - 1$$



Figura 3. Processamento de amostras: a) Seleção de crânios com osso fusionados, b) Limpeza de amostras, c) Extração de lipídios, d) Maceração da amostra, e) Acidificação f) Pesagem em cápsulas de estanho.

3.3 Análises estatísticas

Os valores isotópicos de carbono foram corrigidos segundo Colluen (2001) usando uma correção de 0,005 ‰ para amostras antes de 1960 (Eq.1) e 0,022 ‰ para dados após 1960 (Eq. 2), da seguinte maneira:

Equação 1: $\delta^{13}\text{C}$ corrigido = $\delta^{13}\text{C}$ -Número de anos até 1960 * 0,005-Número de anos desde 1960 * 0,022

Equação 2: $\delta^{13}\text{C}$ corrigido = $\delta^{13}\text{C}$ - Número de anos desde 1960 * 0,022

Para testar as diferenças regionais e temporais nos valores isotópicos, as amostras foram divididas em quatro períodos: I)1900-1950, II)1951-1980, III)1981-2000 e IV) 2000-2017. Essa divisão foi realizada considerando principalmente a exploração pesqueira. O primeiro período (1900-1950) representa um ambiente do começo do século passado; o segundo período (1951-1980) representa a etapa anterior ao início da pesca em grande escala no SWA; o terceiro período (1981-2000) inclui o início da atividade pesqueira que levou à sobrepesca atual e é contemporâneo com o desaparecimento de *T. truncatus gephyreus* no norte da província de Buenos Aires (Vermeulen et al. 2017; 2018); o quarto período (2000-2017) inclui as amostras mais recentes coletadas nas áreas onde a subespécie ainda ocorre. ANOVAs de duas vias, seguidas de testes post hoc de Tukey, foram utilizados para analisar os efeitos da área de amostragem (sul do Brasil, Uruguai e Argentina) e do período (I a IV) e sua interação nos valores isotópicos dos golfinhos. Nenhum boto do período I estava disponível para o Brasil.

O pacote SIBER (Stable Isotope Bayesian Ellipses in R, Jackson et al. 2019) foi usado para estimar o nicho isotópico dos golfinhos (Jackson et al. 2012). As áreas de elipse padrão corrigidas para pequenas amostras (SEAc) foram geradas para cada período e área, sempre que o tamanho da amostra fosse > 4 . As áreas de sobreposição entre pares de elipses foram calculadas. As elipses bayesianas (Bayesian standard ellipse áreas SEAB) foram calculadas assim como seus respectivos intervalos de credibilidade.

Os modelos de mistura isotópica utilizam dados do traçadores, como os isótopos estáveis para estimar as proporções de contribuições das fontes (presas) a uma mistura

(consumidor). Os modelos de mistura bayesiana consideram explicitamente a incerteza nos valores das fontes, covariáveis categóricas e contínuas e informações a priori. Por tanto foram usados para avaliar a contribuição relativa das diferentes presas na dieta do boto da Argentina e do Uruguai. O pacote MixSiar (versão R 3.5.0, Stock & Semmens 2016) foi executado para botos coletados nos Períodos III e IV, a fim de minimizar possíveis diferenças temporais nos valores isotópicos das presas. Resultados isotópicos das presas da ARG (presente estudo) foram utilizados nos modelos. Essas fontes foram agrupadas em grupos de acordo com o resultado das análises de agrupamento, usando os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ para cada espécie de presa como variáveis independentes. Além disso, esses resultados foram apoiados pela inspeção visual do SEAc das presas gerado para cada espécie de peixe. Quase nenhuma informação está disponível para a composição da dieta dos botos do Uruguai. No entanto, com base em padrões de deslocamento dos botos conhecidos entre o Uruguai e o sul do Brasil (Laporta et al. 2016) e a similaridade da fauna de peixes entre essas áreas, a composição de presas conhecida dos botos do Brasil (Secchi et al. 2016) foi usada para selecionar fontes para os modelos de mistura. Portanto, foram utilizados dados isotópicos publicados de presas de amostras coletadas em URU (Franco-Trecu et al. 2012, Franco-Trecu et al. 2013, Bergamino et al. 2011).

Nenhum fator de discriminação trófica (TDFs) para colágeno ósseo de cetáceo está disponível; portanto, TDFs genéricos de 5,0% ($\pm 0,5\%$ DP) e 3,4% ($\pm 0,5\%$ DP) para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente, foram usados no modelo (Secchi et al. 2016). A adequação dos grupos de presas e TDFs a cada modelo de mistura foi testada usando polígonos de mistura (Smith et al. 2013). Esses modelos forneceram uma base quantitativa para aceitação ou rejeição do modelo, com base na probabilidade (95%) do modelo de mistura proposto possa calcular corretamente as contribuições das fontes alimentares de acordo com a composição isotópica dos botos e as suas presas. Todas as análises foram realizadas no ambiente estatístico R (R Core Team 2016).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO (SÍNTESE)

- Os valores isotópicos dos botos-de-Lahille presentes nas costas da Argentina foram superiores aos do Uruguai e do sul do Brasil, refletindo uma provável variação na

composição da dieta ou diferenças nos valores isotópicos basais entre as áreas. Estas diferenças coincidem com a separação em Unidades Evolutivamente Significativas previamente postuladas com base em dados genéticos.

- A diferença entre os valores isotópicos das amostras históricas de Brasil e Uruguai com aqueles da Argentina é consistente ao longo das últimas décadas, provavelmente devido a uma estruturação ecológica diferente, impulsionada por uma barreira entre estas populações (i.e. estuário do Rio de la Plata). Este estuário parece ter um papel estruturante para diversas populações que habitam as regiões costeiras desta parte do Atlântico Sul Ocidental.
- Uma redução no nicho isotópico do boto na região da Argentina pode ser evidenciada no período mais recente. De fato, o nicho isotópico consideravelmente amplo da espécie evidenciado nas amostras coletadas no período I (início do séc. XX) foi substituído por um nicho mais estreito, ocupando apenas uma porção deste nicho inicial. Nesta área, o boto tinha uma presença comum ao longo de toda a região norte da costa argentina, desde o estuário do Rio de la Plata até o golfo San Matias, no norte da Patagônia. Atualmente populações com um número reduzido de indivíduos podem ser encontradas ao sul da província de Buenos Aires e na costa norte da Patagônia. Assim, o reduzido nicho obtido para as amostras do Período IV, pode estar evidenciando esta drástica redução na diversidade de habitats de forrageio antigamente utilizados pela espécie.
- A dieta atual do boto (período IV) na costa argentina baseia-se principalmente em peixes demersais, de alto nível trófico como *Cynoscion guatucupa*, *Pagrus pagrus* e *Percophis brasiliensis* e, em menor proporção, por espécies detritívoras (e.g. *Mugil*). No período III, além das espécies acima, outros peixes demersais como *Micropogonias furnieri* e *Macrodon atricauda* também faziam parte da dieta deste predador, porém em menor proporção.
- No Uruguai, peixes como *Trichiurus lepturus* e *Mugil* sp. Foram as espécies que mais contribuíram com a dieta no período mais recente (IV). Porém, espécies demersais como *Macrodon atricauda* e *Micropogonias furnieri* também faziam parte da dieta durante o período III, porém em menor proporção que as duas principais.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostraram uma clara distinção isotópica entre botos de BR / URU e aqueles amostrados na ARG, o que reforça a distinção genética previamente identificada entre essas duas unidades evolutivas. A análise temporal de mais de um século revelou que essa diferença era evidente na maioria dos períodos abrangidos por este estudo. Os modelos de mistura isotópica também mostraram algumas mudanças na composição da dieta dos golfinhos do URU que refletiram um pouco o relatado anteriormente para as populações melhores estudadas do sul do Brasil. Na ARG, um encolhimento da área de nicho isotópico pretérito (período I) pode ser evidenciada, onde os botos do período IV exibiram uma área de nicho mais estreita que representa uma porção do original. Em conclusão, a análise retrospectiva por meio da composição de isótopos estáveis no colágeno de amostras de osso arquivadas em coleções científicas do boto-de-Lahille contribuiu para avançar o conhecimento da estrutura ecológica e do comportamento alimentar dessa subespécie numa perspectiva histórica. Esses resultados fornecem uma importante contribuição para futuras estratégias de conservação e planos de manejo para essa espécie de cetáceo ameaçada, endêmica do sudoeste do Oceano Atlântico.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bastida R & Rodríguez D (2003) Mamíferos marinos de Patagonia y Antártida. Editorial Vazquez Mazzini. Buenos Aires, Argentina.
- Bastida, R. & Lichtschein, V., 1984. Capturas incidentales de pequeños cetáceos en el área de Mar del Plata (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Actas de la Primera Reunión de Trabajo de Expertos en Mamíferos Acuáticos de América del Sud: 14-22.
- Bearhop S., Adams C.E., Waldron S., Fuller R.A., Macleod H. 2004. Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, 73: 1007–1012.
- Ben-David M & Flaherty EA (2012) Stable isotopes in mammalian research: a beginner's guide. *Journal of Mammalogy* 93:312-328

- Bergamino L, Lercari D & Defeo O (2011). Food web structure of sandy beaches: temporal and spatial variation using stable isotope analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 91(4), 536-543.
- Botta S, Hohn AA, Macko SA, & Secchi ER (2012) Isotopic variation in delphinids from the subtropical western South Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 92:1689-1698
- Coscarella M A, Dans SL, Degradi M, Garaffo GV & Crespo E A (2012) Bottlenose dolphins at the southern extreme of the south-western Atlantic: local population decline?. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(8), 1843-1849.
- Costa A P, Rosel PE, Daura-Jorge FG & Simões-Lopes PC (2016) Offshore and coastal common bottlenose dolphins of the western South Atlantic face-to-face: What the skull and the spine can tell us. *Marine Mammal Science*, 32(4), 1433-1457.
- Costa AP, Fruet PF, Secchi ER, Daura-Jorge FG, Simões-Lopes PC, Di Tullio JC & Rosel PE (2019). Ecological Divergence and Speciation in Common Bottlenose Dolphins in the Western South Atlantic. *Journal of Evolutionary Biology*.
- Cullen JT, Rosenthal Y & Falkowski PG (2001) The effect of anthropogenic CO₂ on the carbon isotope composition of marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 46, 996–998. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.4.0996>
- Di Tullio JC, Fruet PF, Secchi ER (2016) Identifying critical areas to reduce bycatch of coastal common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in artisanal fisheries of the subtropical western South Atlantic. *Endanger Species Res* 29:35–50.
- Evans PG (2018) Habitat pressures. In *Encyclopedia of marine mammals* (pp. 441-446). Academic Press.
- France R.L. 1995 Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: foodweb implications. *Marine Ecology Progress Series* 124, 307–312.
- Franco-Trecu V, Auriolles-Gamboa D, Arim M & Lima M (2012). Prepartum and postpartum trophic segregation between sympatrically breeding female *Arctocephalus australis* and *Otaria flavescens*. *Journal of Mammalogy*, 93(2), 514-521.

- Franco-Trecu V, Costa P, Abud C, Dimitriadis C, Laporta P, Passadore C & Szephegyi M (2009) By-catch of franciscana *Pontoporia blainvillei* in Uruguayan artisanal gillnet fisheries: an evaluation after a twelve-year gap in data collection. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 7(1-2), 11-22.
- Franco-Trecu V, Drago M, Riet-Saprizza FG, Parnell A, Frau R & Inchausti P (2013). Bias in diet determination: incorporating traditional methods in Bayesian mixing models. *PLoS One*, 8(11).
- Fruet PF, Kinas PG, Da Silva KG, et al. (2012) Temporal trends in mortality and effects of by-catch on common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*, in southern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 92: 1865–1876
- Fruet PF, Laporta P, Flores PAC (2017) Report of the Working Group on Population Parameters and Demography of *Tursiops truncatus* in the Southwest Atlantic Ocean. *Lat Am J Aquat Mamm* 11:71.
- Fruet PF, Secchi ER, Daura-Jorge F, Vermeulen E, Flores PA, Simoes-Lopes PC, ... & Dalla Rosa L (2014) Remarkably low genetic diversity and strong population structure in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal waters of the Southwestern Atlantic Ocean. *Conservation Genetics*, 15(4), 879-895.
- Fruet, PF, Zappes CA, Bisi TL, Simões-Lopes PC, Laporta P, Loureiro JD and Flores PAC (2016) Report of the Working Group on Interactions between Humans and *Tursiops truncatus* in the Southwest Atlantic Ocean.
- Garcia SV (2014). La pesca comercial y el estudio de la fauna marina en la Argentina, 1890-1930. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 21(3), 827-845.
- Goodall, R. N. P., Marchesi, M. C., Pimper, L. E., Dellabianca, N., Benegas, L. G., Torres, M. A., & Riccialdelli, L. (2011). Southernmost records of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. *Polar Biology*, 34, 1085–1090.
- Graham B.S., Koch P.L., Newsome S.D., McMahon K.W. and Auriolles D. (2010) Using isoscapes to trace the movements and foraging behavior of top predators in oceanic environments. In West J.B., Bowen G.J., Dawson T.E. and Tu K.P. (eds) *Isoscapes: understanding movement, pattern and process on Earth through isotope mapping*. Dordrecht, The Netherlands: Springer Science and Business Media, pp. 299–318.

- Guerrero RA, Acha EM, Framiñan MB, Lasta and CA (1997) Physical oceanography of the Rio de la Plata Estuary, Argentina. 17:727–742.
- Hyslop EJ. 1980. Stomach contents analysis- a review of methods and their application. Journal of Fish Biology 17:411-429
- Jackson AA, Parnell A, Jackson MA (2019) Package ‘ SIBER ’.
- Jackson A.L., Inger R., Parnell A.C., Bearhop S. 2011 Comparing Isotopic Niche Widths among and within Communities: SIBER - Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. The Journal of Animal Ecology 80: 595–602.
- Jackson, A., Parnell, A., Jackson, M. A., 2019. Package ‘SIBER’: Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. R package version, 2(4).
- Kjerfve B, Seeliger U & De Lacerda LD (2001). A summary of natural and human-induced variables in coastal marine ecosystems of Latin America. In Coastal marine ecosystems of Latin America (pp. 341-353). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Knoff AJ, Macko SA, Erwin RM & Brown KM (2002). Stable isotope analysis of temporal variation in the diets of pre-fledged laughing gulls. Waterbirds 25:142-148
- Knowlton N & Jackson JB (2008) Shifting baselines, local impacts, and global change on coral reefs. PLoS biology, 6(2).
- Laporta P, Menchaca C (2016) Ficha zoológica *Tursiops truncatus* (Cetacea : Delphinidae)
Nombre científico : *Tursiops truncatus* Montagu 1821 Ubicación taxonómica :
Mammalia : Cetacea : Delphinidae Nombre común en español : Tonina Nombre común en inglés : Bottlenose dolphin.
- Leatherwood S & Reeves RR (1983) Abundance of bottlenose dolphins in Corpus Christi Bay and coastal southern Texas.
- Lercari D, Defeo O (1999) Effects of freshwater discharge in sandy beach populations: The mole crab *Emerita brasiliensis* in Uruguay. Estuar Coast Shelf Sci 49:457–468.
- Mermoz JF (1977). Sobre el varamiento de un delfín nariz de botella, *Tursiops truncatus*, en la desembocadura del Río de la Plata (Buenos Aires, Argentina). Physis 7(93):227-235.

- Mianzan H, Lasta C, Acha E, Guerrero R, Macchi G, and Bremec C (2001) The Rio de la Plata estuary, Argentina–Uruguay. *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. (Eds U. Seeliger and B. Kjerfve.) pp. 185–204.
- Moreno VJ, Pérez A, Bastida RO, De Moreno JEA, & Malaspina AM (1984). Distribución de mercurio total en los tejidos de un delfín nariz de botella. *Tursiops gephyreus*.
- Newsome SD, Martinez del Rio C, Bearhop S, & Phillips DL (2007). A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(8), 429-436.
- Österblom H, Olsson O, Blenckner T, Furness R (2008) Junk-food in marine ecosystems. *Oikos* 117:967–977.
- Parnell AC, Phillips DL, Bearhop S, Semmens BX, et al. (2013) Bayesian stable isotope mixing models. *Environmetrics* 24: 387–399
- Passadore C, Domingo A, and Secchi ER(2015) Analysis of marine mammal bycatch in the Uruguayan pelagic longline fishery operating in the Southwestern Atlantic Ocean. – *ICES Journal of Marine Science*, 72: 1637–1652.
- Pauly D, Christensen V, Dalsgaard J, Froese R & Torres F (1998) Fishing down marine food webs. *Science*, 279(5352), 860-863.
- Perrin WF, Thieleking JL, Walker WA, Archer FI & Robertson KM (2011) Common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in California waters: Cranial differentiation of coastal and offshore ecotypes. *Marine Mammal Science*, 27(4), 769-792.
- Peterson B J & Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 293-320
- Post, D. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position models, methods and assumptions. *Ecology* 83: 703–718.
- R Core Team (2016) R: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reis EG & Vieira PC (1994) Pesca artesanal de teleosteos no estuario da Lagoa dos Patos e costa do Rio Grande do Sul.[Artisanal fisheries of teleost fish in the estuary of Patos Lagoon and coast of Rio Grande do Sul]. *Atlantica*. 16. 69-86.

- Riccialdelli L, Newsome SD, Goodall RNP, Fogel M, Bastida R (2012) Insight into niche separation of Risso's dolphin (*Grampus griseus*) in the southwestern South Atlantic via $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values. *Marine Mammal Science* 28:e503-e515
- Rossmann S, Barros NB, Ostrom PH, Stricker CA, Hohn AA, Gandhi H, Wells RS (2013) Retrospective analysis of bottlenose dolphin foraging: A legacy of anthropogenic ecosystem disturbance. *Mar Mammal Sci* 29:705–718.
- Sauco S, Eguren G, Heinzen H, Defeo O (2010) Effects of herbicides and freshwater discharge on water chemistry, toxicity and benthos in a Uruguayan sandy beach. *Mar Environ Res*.
- Savenkoff C, Morissette L, Castonguay M, Swain DP, Hammill MO, Chabot D & Hanson JM (2008). Interactions between marine mammals and fisheries: implications for cod recovery. *Ecosystem ecology research trends*. Nova Science Publishers, New York, NY, 107-151.
- Secchi ER, Botta S, Wiegand MM, Lopez LA, Fruet PF, Genoves RC, Di Tullio JC (2017) Long-term and gender-related variation in the feeding ecology of common bottlenose dolphins inhabiting a subtropical estuary and the adjacent marine coast in the western South Atlantic. *Mar Biol Res* 13:121–134.
- Seeliger U & Odebrecht C (2010) O estuário da Lagoa dos Patos: Um século de transformações. 1a edição. Universidade Federal do Rio Grande-FURG.
- Seeliger U, Odebrecht C & Castello JP (1998) Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. In:(ed) Editora Ecoscientia, Rio Grande.
- Sergio F, Caro T, Brown D, Clucas B, Hunter J, Ketchum J, McHugh K, Hiraldo F (2008) Top Predators as Conservation Tools: Ecological Rationale, Assumptions, and Efficacy. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 39:1–19.
- Siciliano S, Emin-Lima NR, Costa A F, Rodrigues AL, Magalhães F A D, Tosi C H, ... & Silva Junior, J D S (2008) Revisão do conhecimento sobre os mamíferos aquáticos da costa norte do Brasil.
- Sigman DM, Karsh KL, Casciotti KL (2009) Ocean process tracers: nitrogen isotopes in the ocean. Em: Steele JH, Turekian KK, Thorpe SA (eds) *Encyclopedia of Ocean Sciences* (2nd Ed). Elsevier Ltd.

- Simões-Lopes, P. C., Daura-Jorge, F. G., Lodi, L., Bezamat, C., Costa, A. P., & Wedekin, L. L. (2019). Bottlenose dolphin ecotypes of the western South Atlantic: the puzzle of habitats, coloration patterns and dorsal fin shapes. *Aquatic Biology*, 28, 101-111.
- Smith JA, Mazumder D, Suthers IM, Taylor MD (2013) To fit or not to fit: Evaluating stable isotope mixing models using simulated mixing polygons. *Methods Ecol Evol* 4:612–618.
- Soutullo A, C Clavijo & JA Martínez-Lanfranco (eds.). 2013. Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. snap/dinama/mvotma y dicyt/mec, Montevideo. 222 pp.
- Stock BC & Semmens BX (2016). MixSIAR GUI User Manual. <https://github.com/brianstock/MixSIAR/>. doi:10.5281/zenodo.47719.
- Szteren D, Auriolles-Gamboa D, Labrada-Martagón V, Hernández-Camacho CJ, De María M (2018) Historical age-class diet changes in South American fur seals and sea lions in Uruguay. *Mar Biol* 165:1–17.
- Tagliani PRA, Asmus ML, Tagliani CRA, Polette M, Costa CSB & Salas E (2007). Integrated coastal zone management in the Patos Lagoon Estuary (South Brazil): state of art. *WIT. Transactions on Ecology and the Environment*, 103, 679-686.
- Venuto R, Botta S, Barreto AS, Secchi ER, Fruet PF (2020) Age structure of strandings and growth of Lahille's bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus gephyreus*) *Marine Mammal Science*. DOI: 10.1111/mms.12683
- Vermeulen E & Bräger S (2015) Demographics of the disappearing bottlenose dolphin in Argentina: a common species on its way out?. *PLoS One*, 10(3).
- Vermeulen E & Cammareri A (2009) Residency patterns, abundance, and social composition of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Bahía San Antonio, Patagonia, Argentina. *Aquatic mammals*, 35(3), 378.
- Vermeulen E, Balbiano A, Belenguer F, Colombil D, Failla M, Intrieri E & Bräger S (2017). Site-fidelity and movement patterns of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in central Argentina: essential information for effective conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 27(1), 282-292.

- Vermeulen E, Bastida R, Berninsone L, Bordino P, Failla M, Fruet P, Harris G, Iñíguez M, Marchesi M, Petracci P, Reyes L, Sironi M, Bräger S (2018) A review on the distribution, abundance, residency, survival and population structure of coastal bottlenose dolphins in Argentina. *Lat Am J Aquat Mamm* 12:2–16
- Vermeulen, E., Fruet P, Costa A, Coscarella M. & Laporta P (2019a) *Tursiops truncatus* ssp. *gephyreus* . A Lista Vermelha da IUCN de Espécies Ameaçadas 2019: e.T134822416A135190824. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019->.
- Vermeulen; E., Failla, M.; Loizaga de Castro, R.; Romero, M. A.; Svendsen, G.; Coscarella, M. A.; Cáceres-Saez, I.; Bastida, R.; Dassis, M. (2019b). *Tursiops truncatus*. En: SAyDS–SAREM (eds.) Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción. Lista Roja de los mamíferos de Argentina. Versión digital: <http://cma.sarem.org.ar>.
- Von Ihering HV (1885s)A Lagoa dos Patos. *Revista Organon*, (14), 101-142.
- Walker J L, Potter CW & Macko SA (1999) The diets of modern and historic bottlenose dolphin populations reflected through stable isotopes. *Marine Mammal Science*, 15(2), 335-350.
- Wickert J C, Von Eye S M, Oliveira LR & Moreno IB (2016) Revalidation of *Tursiops gephyreus* Lahille, 1908 (Cetartiodactyla: Delphinidae) from the southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Mammalogy*, 97(6), 1728-1737.

APÊNDICE I

Historic foraging ecology of the endangered Lahille's bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus gephyreus*) inferred by stable isotopes

Manuscrito submetido à revista *Estuarine Coastal and Shelf Science*

Historic foraging ecology of the endangered Lahille's bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus gephyreus*) inferred by stable isotopes

Andrea Campos-Rangel^{a,b}, Ricardo Bastida^c, Pedro Fruet^{a,d,e}, Paula Laporta^{f,g}, Luis Humberto Cappozzo^h, Meica Valdiviaⁱ, Els Vermeulen^j, Silvina Botta^{a,e,*}

^a Laboratório de Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha, Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Instituto de Oceanografia, Rio Grande, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Instituto de Oceanografia, Rio Grande, RS, Brazil.

^c Departamento de Ciencias Marinhas, Universidad Nacional de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

^d Museu Oceanográfico ‘Prof. Eliézer C. Rios’, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil.

^e KAOSA, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

^f Yaqu Pacha Uruguay - Organización para la Conservación de Mamíferos Acuáticos en América del Sur, Punta del Diablo, Rocha, Uruguay.

^g Centro Universitario Regional del Este, Universidad de la República, Rocha, Uruguay.

^h Museo Argentino de Ciencias Naturales, Buenos Aires, Argentina

ⁱ Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay.

^j Mammal Research Institute Whale Unit, University of Pretoria, South Africa

*Corresponding author

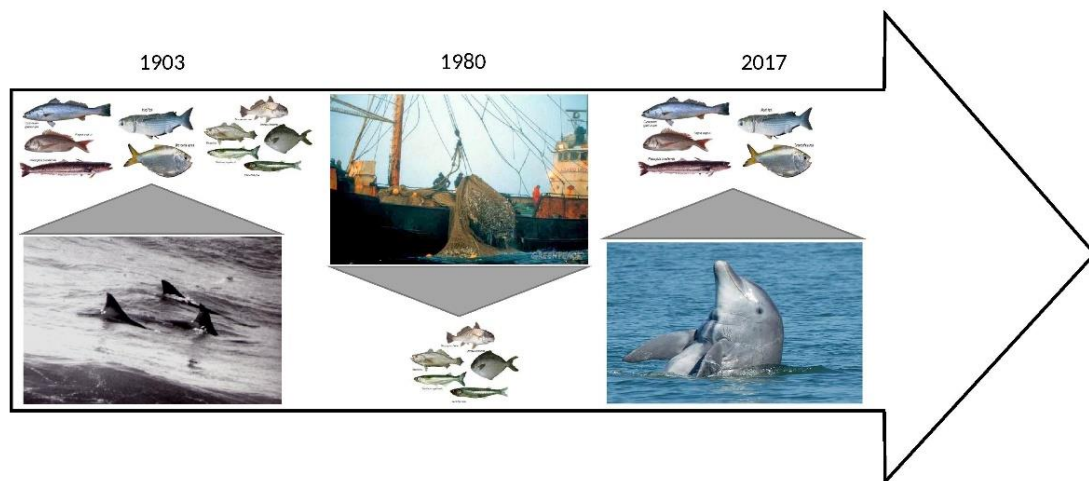
Permanent address: Laboratório de Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha, Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Instituto de Oceanografia, Avenida Italia km8 s/n, Rio Grande, RS 96203-900, Brazil, silbotta@gmail.com (S. Botta)

Abstract

In the Southwest Atlantic Ocean, the Lahille's bottlenose dolphin (LBD - *Tursiops truncatus gephyreus*) is restricted to the coastal waters of southern Brazil (BR), Uruguay (UY) and northern Argentina (ARG). Its coastal habits make it a species susceptible to anthropogenic impacts, mainly to the negative effects of interactions with fishing activities. In order to evaluate historical changes in the diet and estimate the trophic ecology and use of the current habitat of the LBD, stable isotopes of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) were analyzed in bone samples from specimens deposited in scientific institutions from BR, UY and ARG, collected in periods PI (1900-1950), PII (1951-1980), PIII (1981-2000), and PIV (2000-2017). The isotopic values of ARG dolphins were different from UY and BR in PII, III and IV, reflecting variations in the composition of the diet and/or basal isotopic values. The considerably broad isotopic niche of the ARG dolphins from PI was replaced by a narrower niche in PIV. In this area, the species had a common presence throughout the northern region of the Argentine coast. Today, only a few small populations can be found in the southern limit of its distribution. The LBD diet had a small change in the proportions of prey between PIII and PIV in ARG and UY, which may be due to the overexploitation of demersal prey as previously shown for the BR population. The retrospective analysis of the LBD diet contributed to the knowledge of the ecological structure and feeding behavior of this poorly-known subspecies.

Keywords: carbon, nitrogen, diet, *Tursiops truncatus gephyreus*, Western South Atlantic Ocean

Graphical abstract



1. Introduction

Large marine predators are of particular interest as indicators of changes in the ecosystem due to their high trophic position in the food chain and normally long life cycles (Sergio et al., 2008). Changes in trophic ecology (trophic level, foraging location) have been implicated as important regulators of population size and the distribution of marine organisms (Österblom et al., 2008). Cetaceans are large and highly mobile animals that live in dynamic environments, being considered important predators in marine ecosystems (Savenkoff et al. 2008). Therefore, understanding the trophic interactions and the positions that these organisms occupy in the food webs, contributes to reveal the functioning, structure and energy flow of marine ecosystems (Pauly et al., 1998).

The bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) is a species widely distributed in tropical and temperate waters of all oceans, occurring along the coast and in deeper waters, both on the continental shelf and in the open ocean (Leatherwood & Reeves 1983). This adaptation to a wide variety of environments results in a significant geographical variation of the species, with coastal and oceanic ecotypes being recognized in several regions throughout its distribution (Perrin et al., 2011). In the Southwestern Atlantic Ocean (SAO) a distinct coastal ecotype had been described based on external (Simões-Lopes et al. 2019) and skull characters (Barreto, 2000; Costa et al., 2016; Wickert et al., 2016). Recently, a marked genetic differentiation from the oceanic ecotype was found, suggesting long-term genetic isolation in SAO (Fruet et al., 2017). These characteristics lead to the recognition of this coastal ecotype as a subspecies, the Lahille's bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus gephyreus*) (IWC, 2018).

The Lahille's bottlenose dolphin occurs only in a small portion of the SAO, between the state of Parana in southern Brazil in the North (approximately 25°S; Wickert et al., 2016) to the province of Chubut in Argentina in the South (approximately 46°S; Coscarella et al., 2012), a distributional range of approximately 3,500 km of coastline (Vermeulen et al., 2019). Populations are small (<100 individuals) (Fruet et al., 2016) and preferably occur in coastal and estuarine areas, in shallow waters, with depths below 20 m (Di Tullio et al., 2016).

This dolphin is considered a generalist consumer. In the Patos Lagoon Estuary and adjacent coastal region, the species is preferably ichthyophagous, consuming mainly pelagic-demersal

and demersal sciaenid fishes. However, it presents some degree of plasticity in foraging habits and in feeding according to spatial and temporal patterns of prey availability. Temporal changes in the contribution of the main prey for this dolphin has been observed, possibly due to the lower availability of the same prey caused by overexploitation by commercial fishing (Secchi et al., 2016). On the other hand, both in Uruguay and Argentina, data on this specie's diet are very scarce, limited to the description of prey found in the stomach contents of a few individuals (Mermoz, 1977; Moreno et al., 1984; Laporta et al., 2016). These few records indicate a diet based mainly on demersal fish.

The conservation status of the Lahille's bottlenose dolphin was recently assessed, being considered as "Vulnerable" by the IUCN (Vermeulen et al., 2019) and appears in the lists of endangered species in Brazil, Uruguay and Argentina (Vermeulen et al., 2019). Its coastal distribution makes the species more susceptible to anthropogenic impacts, mainly due to the negative effects of interactions with fishing activities, such as incidental captures in fishing nets and competition between dolphins and fishing by reducing the availability of their prey (Fruet et al., 2012; Secchi et al., 2016). In Argentina and Uruguay, the species was formerly common along coastal regions of Rio de la Plata estuary during the 1960s to 1980s (Lázaro & Praderi, 2000; Vermeulen et al., 2018). However, its presence is currently reduced to some portions of its original distribution (Lodi et al., 2017; Vermeulen et al., 2017), which seems to suggest that some kind of pressure must have played a role in the population decline of the subspecies (Bastida and Rodríguez, 2003).

Stable isotope analyses (SIA) have been commonly applied to reconstruct the historical diet of marine megafauna (Riofrío-Lazo & Auriolles-Gamboa, 2013; Artecona et al., 2019). This method is particularly useful for determining trophic level, identifying major food sources, and assessing foraging habitats of these predators (Das et al., 2003; Krahn et al., 2007; Pinela et al., 2010; Ricchialdelli et al., 2010). This information can refer to different time scales through the analysis of tissues with different renewal rates. Those tissues that are rapidly renewed, such as skin or blood, reveal an animal's diet in a relatively recent past (Ben-David and Flaherty, 2012). Carbon stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$) can provide information on the sources of the primary productivity (e.g. seagrass, salt marsh, phytoplankton, France, 1995; Walker et al., 1999; Graham et al., 2010), while and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) is useful to infer the trophic level and nutrient sources of the food web where the predator forages (Post, 2002; Graham et al.,

2010). Thus, combining the information derived from these tracers it is possible to provide insights on the foraging ecology of a species. Furthermore, the isotopic niche, as proxy of the ecological niche, can be defined by using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ data as its scenopoetic and bionomic axes, respectively (Bearhop et al., 2004; Newsome et al., 2007). On the other hand, metabolically inert tissues after deposition (e.g. whiskers, teeth) or with low turnover rates (e.g. bone), allow the access to long-term dietary information (Knoff et al., 2002).

In this study we analyze the carbon and nitrogen stable isotopes composition of bone collagen from Lahille's bottlenose dolphin skeletal material deposited in collections which encompass a time period of more than a century and from locations throughout almost the entire range of the subspecies. These analyses aimed to evaluate the temporal and spatial variation in isotopic compositions along the south of Brazil, Uruguay and north of Argentina, and particularly estimate the diet of the subspecies in Uruguay and Argentina. The retrieval of historical information about the ecology of this species will help to understand the historical and current factors that could be associated with the decline of their populations along their distribution.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The coastal ecosystems of the SAO are highly influenced by interactions between climatic conditions, continental discharges and oceanographic conditions (Kjerfve et al., 2001). In this region, the subtropical convergence originates from the confluence of cold waters from the Malvinas current and the warm waters of the Brazilian current. The coastal region is characterized by oceanographic and climatic conditions, mainly NE winds that dominate during most of the year and southern winds during the winter. The estuarine-coastal environment is directly controlled by freshwater discharges from the hydrographic basins of the Rio de la Plata and the Patos-Mirim lagoon system (Seeglier & Obredecht, 2010).

The Patos Lagoon, located in the extreme south of Brazil, forms an estuarine region of approximately 1,000 km² whose connection with the Atlantic Ocean occurs through a narrow

channel (Seeliger, 2004). The estuary is mainly influenced by NE-SW winds; with seasonal patterns that make wind the major force in the Patos Lagoon system. The NE-SW winds are the main factors driving circulation, salinity and water levels, although rainfall can generate salinity gradients during the rainy season (Seeliger et al., 1998). The high primary and secondary production in the region support important populations of fish, local birds and the resident population of bottlenose dolphins (Bastida et al., 2007)

On the other hand, the dynamics of the Rio de la Plata estuary are controlled by the tide, the wind and the continental flow, but modified by the topography and Coriolis force. The balance between these forces is highly variable, depending largely on the intensity of wind and freshwater discharge (Guerrero et al., 1997). During autumn and winter, the estuary is characterized by less influence of the wind and a maximum in the flow of the river, resulting in a lower salinity regime. In contrast during the spring and summer predominant onshore winds are predominant and a minimum of river runoff induce higher salinity conditions. The movement of saline water is greater on the north coast, through the deep North Channel. The average temperature remains almost homogeneous in the warm (December to March) and cold (June to September) periods, both on the vertical and on the horizontal scale with a variation between 8 and 27.5 ° C (Guerrero et al., 1997). The Rio de la Plata estuary is a maritime access to a highly complex river system harboring industrial activities and urban conglomerates, wich can affect the aquatic habitat and conflict with environmental problems (Mianzan et al., 2001). The high productivity and consequent biomass present, turn the estuary of the Rio de la Plata an area of reproduction and breeding of several species of fish such as sciaenids, clupeids and mugilids, thus becoming an important foraging area for top predators such as pinnipeds and cetaceans (Bastida et al., 2007).

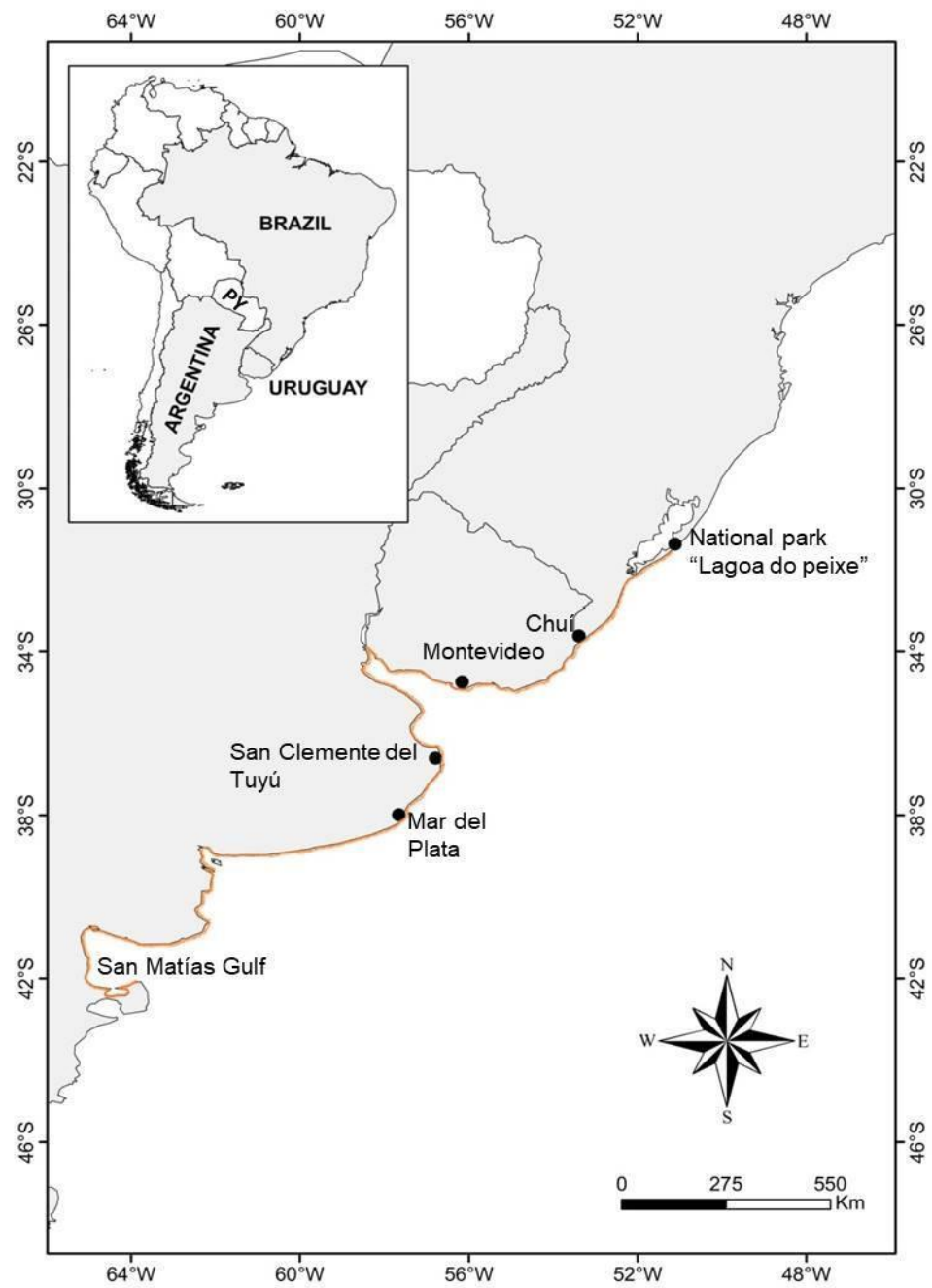


Figure 1. Map of the study area. The colored line indicates the sampling area of Lahille's bottlenose dolphins.

2.2 Sampling

Bone fragments were extracted from 103 Lahille's bottlenose dolphin specimens deposited in the scientific collections of different institutions from Brazil (BR), Uruguay (UY) and Argentina (ARG). The specimens were collected between 1903 and 2018 along the coasts of Rio Grande do Sul, in southern Brazil, Uruguay and northern Argentina (Fig. 1). Only animals considered to be adults were used. We only included animals classified as physically mature based on the fusion of the cranial bones; as no teeth were available for age estimation for most of the specimens. We removed small bone fragments from the inner part of the skull in order to not interfere with its morphometric measurements.

The diet of the bottlenose dolphins from BR were previously reported by Secchi et al. (2016) based on stomach content and stable isotopes analyses. Therefore, in order to investigate the diet of the species in the remaining locations (UY and ARG) we searched for stable isotope values of the main prey described for the species in those areas. In the case of UY, previous studies on the diet of other marine mammal species provided data of prey species common to the bottlenose dolphin (e.g. Franco-Trecu et al., 2012; Franco-Trecu et al., 2013). In the case of Argentina, due to the scarce isotopic data on coastal fish species, we collected muscle tissue of fish species and mantle of squids considered as potential prey for the Lahille's bottlenose dolphins (Bastida and Lichtschein, 1984; Laporta et al., 2016; Moreno et al., 1984; Vermeulen et al., 2019) both in estuarine and marine coastal waters of Buenos Aires (between 36° and 38° S).

2.3. Stable isotope analyses

Bone samples were cleaned with distilled water and sanded with a Dremel® tool to eliminate external impurities. Lipids were removed using a Soxhlet and a chloroform methanol solution (2:1) during 8 hours. The bone fragments were then macerated to a powder and acidified to remove inorganic carbon by using HCl 2% with replacement of the acid solution every 24 hours (two cycles), washed with successive rinses of deionized water and dried at 60°C. Prey muscle samples were washed with distilled, dried in an oven at 60°C and powdered with mortar and pestle. Approximately 0.7-1 mg of each powdered sample was weighed and stored in tin capsules until isotopic analysis.

Stable isotope analysis was performed using an elemental analyzer coupled to a Thermo Scientific Delta V isotope ratio mass spectrometer at the University of New Mexico Center for Stable Isotopes (UNM–CSI). The isotopic ratios are expressed as delta (δ) values following the equation:

$$\delta(\text{‰}) = \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1$$

where R_{sample} and R_{standard} are the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ or $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios of the sample and standard, respectively. The internationally accepted standards are Vienna Peedee Belemnite limestone (V-PDB) for carbon and atmospheric N_2 for nitrogen.

2.4. Statistical analyses

Carbon isotopic values were corrected following Cullen (2001) using a correction of 0.005‰ for samples before 1960 (Eq.1) and 0.022‰ for data after 1960 (Eq. 2) as follows:

$$\delta^{13}\text{C corrected} = \delta^{13}\text{C} - \text{Number of years to 1960} \times 0.005 - \text{Number of years since 1960} \times 0.022$$

Eq. 1

$$\delta^{13}\text{C corrected} = \delta^{13}\text{C} - \text{Number of years since 1960} \times 0.022 \quad \text{Eq. 2}$$

In order to test for regional and temporal differences in isotopic values, samples were divided in four periods: I)1900-1950, II)1951-1980, III)1981-2000, and IV)2000-2017. This division was made considering mainly the fishery exploitation. The first period (1900-1950) represents an environment of the beginning of the last century; the second period (1951-1980) represents the previous stage to the start of large-scale fishery in SWA; the third period (1981-2000) includes the beginning the fishing activity that led to the current overfishing and is contemporary with the disappearance of the Lahille's bottlenose dolphin in the north of the Buenos Aires province and Rio de la Plata estuary coast in Uruguay (Vermeulen et al., 2016); the fourth period (2000-2017) includes the most recent samples collected along the areas where the subspecies still occurs. Two-way factorial ANOVAs, followed by Tukey post-hoc tests were used to analyze the effects of the sampling area (southern Brazil, Uruguay and northern Argentina) and the period (I to IV) and their interaction on the isotope values of the dolphins. No dolphins from period I were available for Brazil.

We used the package SIBER (Stable Isotope Bayesian Ellipses, Jackson et al., 2019) to estimate the isotopic niche for the dolphins (Jackson et al., 2011). Standard Ellipse Areas corrected for small samples (SEAc) were generated for each period and area, whenever sample size was >4 . The overlap area between paired SEAc were calculated and the respective percentage of overlap area was estimated for each group. Additionally, we calculated Bayesian standard ellipse areas (SEAB) and their respective 95% credibility intervals (Jackson et al., 2011).

In order to calculate the most probable diet proportions for bottlenose dolphins from UY and ARG we ran Bayesian stable isotope mixing models, implemented in the MixSiar package (Stock & Semmens, 2016). Models were run for dolphins collected in Periods III and IV in order to minimize potential temporal differences in prey isotopic values. We estimated dietary proportions without informative prior distributions as no information on the relative importance of prey to the diet was available for these areas. Prey isotopic values were included as mean and standard deviation. In the case of Argentina, isotopic results of prey samples collected (present study) were used in the models. These sources were lumped into groups according to the result of cluster analyses, in order to reduce the number of sources introduced in the model. For running cluster analyses, we used $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for each prey species as independent variables, calculated a pairwise Euclidean distance matrix (complete-linkage) and produced a hierarchical tree to identify prey groups. Furthermore, these results were supported by the visual inspection of prey SEAc generated for each fish species. Almost no information is available for the diet composition of bottlenose dolphins from Uruguay. However, based on recognized movements between Uruguay and southern Brazil (Laporta et al., 2016) and the similarity of the fish fauna between these areas, the known prey composition of bottlenose dolphins from BR (Secchi et al., 2016) was used to select sources for the mixing models. Therefore, published prey isotopic data from samples collected in UY were used (Franco-Trecu et al., 2012; Franco-Trecu et al., 2013; Bergamino et al., 2011). In this case, we did not clustered the prey into groups as the number of sources was lower than in the case of ARG (Table S1).

No diet-to-bone collagen trophic discrimination factors (TDFs) are available for any cetacean, therefore generic TDFs of 5.0% ($\pm 0.5\%$ SD) and 3.4% ($\pm 0.5\%$ SD) for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively, were used in the model (Secchi et al., 2016). The adequacy of the prey

groups and TDFs to each mixing model was tested using mixing polygons (Smith et al., 2013). These models provided a quantitative basis for model acceptance or rejection based on a frequentist probability that the proposed mixing model can correctly calculate source contributions to explain the isotopic value of dolphins. All analyses were performed in the R statistical environment (R Core Team 2016).

3. Results

Mean nitrogen isotope values were significantly different among areas (2-way ANOVA, $F_{2, 7.9}$, $p < 0.001$, Figure 2, Table 1) and the interaction term was significant ($F_{5, 2.9}$, $p < 0.05$). Tukey's post hoc test revealed that mean ARG $\delta^{15}\text{N}$ values were higher than those of samples from UY ($p < 0.001$). Significant differences were found among BR and ARG, and UY and ARG for samples from Period II, and between UY and ARG for samples from Period IV. Mean $\delta^{15}\text{N}$ values for UY and ARG were also significantly different for samples from periods IV and II, respectively. Significant differences were found for $\delta^{13}\text{C}$ values among periods (2-way ANOVA, $F_{3, 5.2}$, $p < 0.05$). Tukey's test showed differences among periods I and II ($p < 0.001$) and III and I ($p < 0.05$) were significant (Figure 3, Table 1).

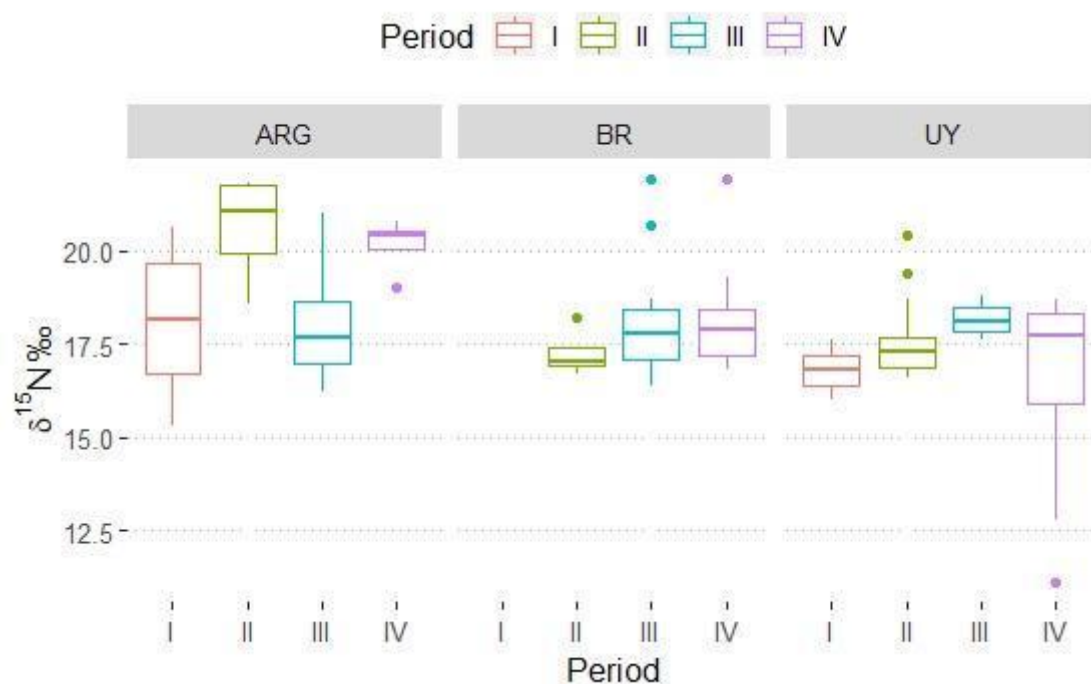


Figure 2. Boxplots of $\delta^{15}\text{N}$ values in bone collagen of *Tursiops truncatus gephyreus* sampled between 1903 and 2017 in Brazil, Uruguay and Argentina. Separate plots for samples collected in Periods I (1900-1950), Period II (1951-1980), Period III (1981-2000) and Period IV (2001-2017) in each area are shown.

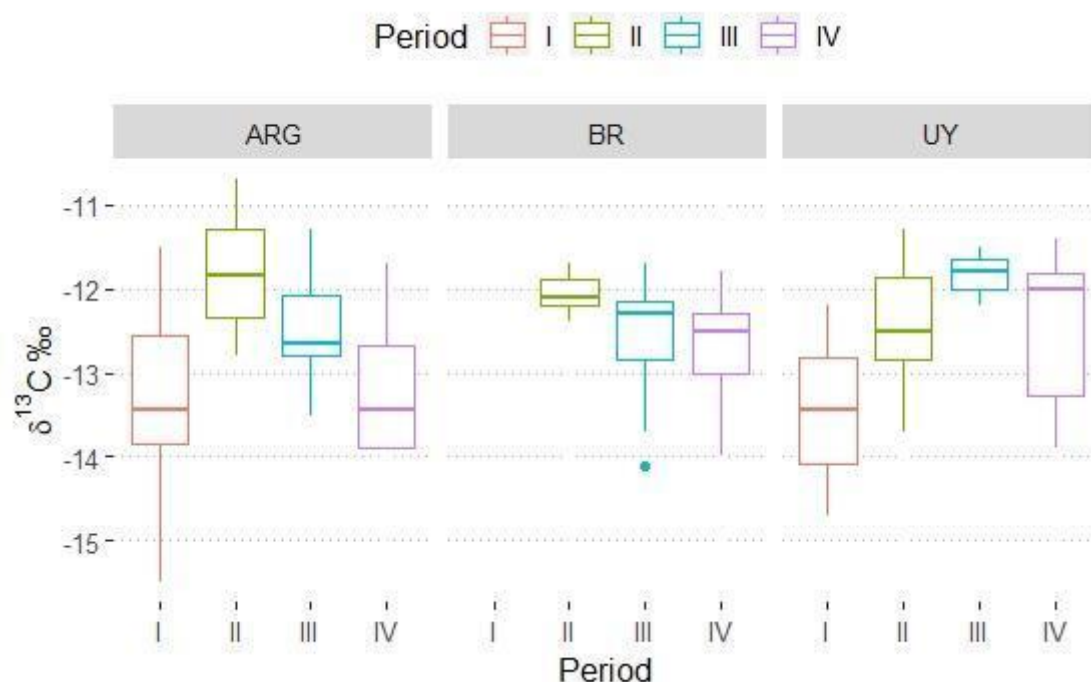


Figure 3. Boxplots of $\delta^{13}\text{C}$ values in bone collagen of *Tursiops truncatus geophyreus* sampled between 1903 and 2017 in Brazil, Uruguay and Argentina. Separate plots for samples collected in Periods I (1900-1950), Period II (1951-1980), Period III (1981-2000) and Period IV (2001-2017) in each area are shown.

Table 1. Mean, minimum (min) and maximum (max) values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ (in ‰) in bone collagen of *Tursiops truncatus geophyreus* sampled between 1903 and 2017 in Brazil, Uruguay and Argentina. The values for samples collected in Periods I (1900-1950), Period II (1951-1980), Period III (1981-2000) and Period IV (2001-2017) in each area are also shown.

	Mean $\delta^{13}\text{C}$	Min $\delta^{13}\text{C}$	Max δ^{13} C	Mean $\delta^{15}\text{N}$	Min $\delta^{15}\text{N}$	Max $\delta^{15}\text{N}$	n
<i>Brazil</i>							
Period II	-11.7	-12.4	-10.9	17.3	16.9	18.2	5
Period III	-12.6	-14.1	-11.7	18.2	16.4	21.9	1

Period IV	-12.7	-14	-11.8	18.1	21.9	16.8	2
							5
All periods	-12.4	-18.3	-11.7	17.8	16.4	21.9	4
							1
<i>Uruguay</i>							
Period I	-13.4	-14.7	-12.2	16.8	16	17.6	2
Period II	-12.4	-13.7	-11.3	17.6	16.6	20.4	1
							6
Period III	-11.8	-12.2	-11.5	18.2	17.6	18.8	3
Period IV	-12.4	-13.9	-11.3	16.5	11.1	18.7	1
							0
All periods	-12.2	-14.7	-11.3	17.4	12.8	20.4	3
							1
<i>Argentina</i>							
Period I	-13.3	-15.5	-11.5	18.2	15.3	20.6	1
							6
Period II	-11.8	-12.8	-10.7	20.6	18.6	21.8	4
Period III	-12.4	-13.5	-11.3	18.1	16.2	20.5	8
Period IV	-13.1	-13.9	-11.7	20.1	19	20.8	4
All periods	-12.8	-14.8	-10.7	18.7	15.3	21.8	3
							2

3.1. Isotopic Niche Areas

The isotopic niche areas of the individuals sampled in the different periods showed different patterns of overlap among the sampled areas. During the first period, only the isotopic niche of the ARG samples could be calculated as no samples were available for BR and only two samples from UY. Although these two Uruguayan samples were not within the area of the ARG, they were almost similar to other ARG samples. In the second Period, BR and UY dolphins showed a high overlap of their isotopic niches (85% of the BR area and 17% of the UY area overlapped), while a complete segregation was observed for ARG samples. In

contrast, the isotopic ellipses showed a high overlap between BR and ARG in the period III representing 27% and 70% of their respective areas, whereas the three UY samples also showed similar values with them. During Period IV, a partial overlap was evidenced between BR and UY (24% of the BR area and 11% of the UY area) whereas the ARG niche was completely segregated in the δ -space. (Fig 4, Table 2).

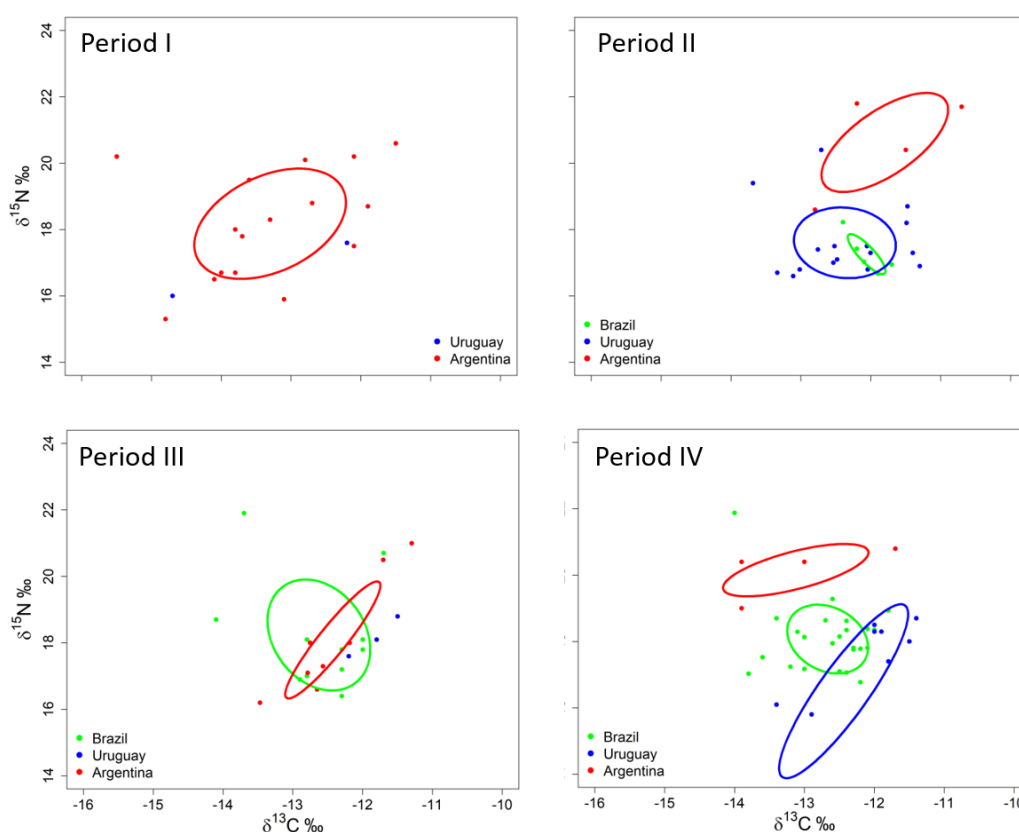


Figure 4. Biplot of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of Lahille's bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus gephyreus*) from Brazil, Uruguay and Argentina sampled during Periods I (1900-1950), II (1951-1980), III (1981-2000) and IV (2001-2017). Each point represents the individual isotopic composition. Standard ellipse areas corrected for small sample sizes (SEAc) representing the isotopic niche of dolphins collected in different areas and periods are shown whenever sample size is >3 .

Table 2. Values of Convex hulls (CH), standard ellipse areas for small sample sizes (SEAc) and Bayesian ellipse areas (SEAB) with their respective credibility intervals (CI 95%) from $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of Lahille's bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus geophyreus*) from Brazil, Uruguay and Argentina sampled during Periods I (1900-1950), II (1951-1980), III (1981-2000) and IV (2001-2017). All metrics are in (‰²).

	Period I			Period II			Period III			Period IV		
	BR	UY	ARG	BR	UY	ARG	BR	UY	ARG	BR	UY	ARG
CH	-	-	14.5	0.3	6.2	2.6	8.4	0.1	2.1	6.8	6.6	1.5
SEAc	-	-	5.2	0.4	2.6	4.8	4.2	0.2	1.6	1.9	4.0	2.9
SEAB	-	-	5.1	0.3	2.4	3.2	3.5	0.4	2.0	1.8	4.3	1.9
CI_{95%}	-	-	3.1-	0.1-	1.4-	0.9-	1.9-6.7	0.1-	1.0-	1.2-	2.1-	0.5-
			8.5	1.0	4.0	10.1		1.9	4.5	2.7	8.7	6.5

3.2. Diet composition of dolphins from Argentina and Uruguay

No significant differences were found between the isotopic values of ARG prey individuals sampled both in the estuary and the marine environment. Therefore, species data were combined for posterior analyses. The lowest carbon isotopic values were found for *Loligo sanpaulensis* ($-19.6 \pm 0.3\text{‰}$) and the highest values for *Pagrus pagrus* ($-16.6 \pm 0.4\text{‰}$). The highest nitrogen isotopic values were found for *Cynoscion guatucupa* ($18.5 \pm 0.3\text{‰}$), whereas *Brevoortia aurea* showed the lowest mean value ($12.2 \pm 1.4\text{‰}$) (Table 3). Preys were grouped into the following categories: based on cluster analysis (Fig. S1) and isotopic niches results (Fig. S2) results: (G 1) includes *Cynoscion guatucupa*, *Pagrus pagrus* and *Percophis brasiliensis*, demersal species sampled in the coast, with high $\delta^{15}\text{N}$ values, (G 2) is formed by *Mugil liza* and *Brevoortia aurea*, filter-feeding fishes of low trophic level, (G 3) individuals of the cephalopod species *Loligo sanpaulensis*. Although this prey showed similar isotopic values with species of group 5, it was included in a separate group due to its taxonomic disparity, (G 4) including *Pomatomus saltatrix*, a predator fish with high values of $\delta^{15}\text{N}$, but lower $\delta^{13}\text{C}$ than Group 1 species, and (G 5) includes *Macrodon atricauda*, *Stromateus brasiliensis*, *Odontesthes argentinensis*, *Odontesthes incisa* and *Micropogonias furnieri*, mostly demersal species with intermediate isotopic values.

Table 3. Mean ($\pm$ SD) $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) of potential dietary source groups of *Tursiops truncatus geophyreus* collected along the coasts of Buenos Aires, Argentina.

Species	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	Habitat	Trophic guild	n	Sampling region
Group 1						
<i>Cynoscion guatucupa</i>	-	17.7 $\pm$ 0.6	Coastal-demersal	Piscivore, carcinophagus	1 0	Coastal
<i>Pagrus pagrus</i>	-16.6 $\pm$ 0.4	17.9 $\pm$ 0.5	Benthopelagic	Piscivore	1 0	Coastal marine
<i>Percophis brasiliensis</i>	-16.8 $\pm$ 0.3	17.7 $\pm$ 0.3	Coastal-demersal	Ichthyophagous	3	Coastal marine
Mean G1 values	-	17.7$\pm$0.5			2 3	
Group 2						
<i>Mugil liza</i>	-19.3 $\pm$ 0.8	12.2 $\pm$ 1.4	Estuarine demersal	Detritivorous	7	Estuarial
<i>Brevoortia aurea</i>	-18.6 $\pm$ 0.4	12.8 $\pm$ 1.5	Pelagic neritic	Planktophagus	8	Estuarial
Mean G2 values	-	12.5$\pm$1.5			1 5	
Group 3						
<i>Loligo sanpaulensis</i>	-19.6 $\pm$ 0.3	14.2 $\pm$ 0.6	Coastal	Ichthyophagous, carcinophagus	1 0	Marine
Mean G3 values	-19.6 $\pm$ 0.3	14.2 $\pm$ 0.6			1 0	
Group 4						
<i>Pomatomus saltatrix</i>	-18.8 $\pm$ 0.4	17.8 $\pm$ 0.0	Oceanic/coastal/estuarine	Ichthyophagous, invertivore	2	Coastal marine
Mean G4 values	-18.8 $\pm$ 0.4	17.8 $\pm$ 0.0			2	
Group 5						
<i>Macrodon atricauda</i>	-19.0 $\pm$ 0.4	14.6 $\pm$ 0.8	Demersal	Piscivore,	8	Estuarial
<i>Stromateus brasiliensis</i>	-19.0 $\pm$ 1.2	15.7 $\pm$ 0.5	Benthic pelagic	Invertivore	8	Estuarial

<i>Odontesthes</i>	-18.3 ±	15.5 ±	Coastal/estuarine	Detritivorous,	1	Estuarial
<i>argentinensis</i>	0.7	0.6		Planktophagus	7	and
						marine
<i>Odontesthes</i>	-18.0 ±	14.8 ±	Neritic demersal	Detritivorous,	1	Coastal
<i>incisa</i>	0.3	0.4		Planktophagus	0	
<i>Micropogonias</i>	-18.0 ±	15.9	Coastal/estuarine	Omnivore	8	Estuarial
<i>furnieri</i>	0.7	±0.3				
Mean GI	-	15.3±0.			5	
values	18.5±0.	7			1	
	7					

Mixing models used to describe the diet composition of dolphins from UY were run considering eight prey species (Table S1).

Mixing polygons showed that almost all UY and ARG individuals were within the 95% mixing region formed by the TDF-corrected isotopic values of their respective prey (Fig. 3). Only three (ARG) and two (UY) individuals were outside the outermost 95% contour thus indicating that the models fitted could be considered relatively robust.

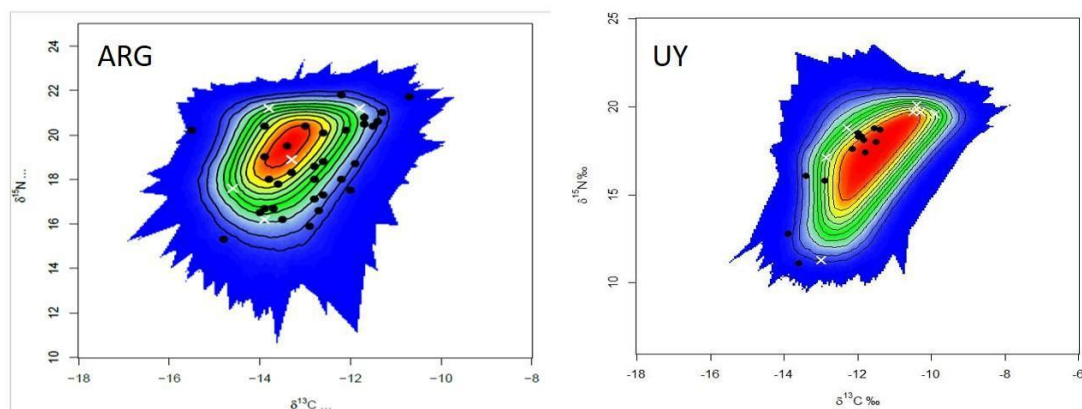


Figure 3. Simulated mixing polygons for Lahille's bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus gephyreus*) sampled in Argentina (ARG) and Uruguay (UY) during Periods III and IV. Generic trophic discrimination values for correcting prey isotopic values were applied. The position of the consumers (black dots) and the average source signatures (white crosses) are shown. Probability contours (black lines) are at the 5% level (outermost line) and at every 10% level.

MixSiar models showed that for ARG dolphins during Period III (1980-2000), fishes from Group 1 contributed 32% (9% - 54% credible interval-CI), similar to that of Group 2 (26%; 4% - 48% CI). Group 5 also contributed to the diet, but to a lesser degree (20%; 1% - 53% CI). The relative contribution of Groups 3 and 4 to the diet was considered low (G3: 11%; 0% - 32% CI and G4: 11%; 0% - 28% CI). Dolphins from ARG in the Period IV had a diet mainly composed by fish from Group 1 (37%; 5% - 70% CI), with some contribution of G2 (14%; 2% - 34% CI), and showing irrelevant contribution from the other prey groups (Fig. 4).

Dolphins from UY showed a high proportion of *Trichiurus lepturus* and *Mugil* sp. in their diets during Period III (*T. lepturus*: 27%; 10% - 50% CI and *Mugil liza*: 20%; 7% - 34% CI). The other demersal fish species (*Cynoscion guatucupa*, *Macrodon atricauda*, *Menticirrhus* sp. and *Paralonchurus brasiliensis*) had a lower contribution to the diet during this period. However, the contribution of these demersal fishes was even lower during period IV, where *Trichiurus lepturus* and *Mugil liza* largely dominated the UY dolphin diets (*T. lepturus*: 50%; 15% - 83% CI and *Mugil liza*: 27%; 3% - 50% CI) (Fig. 4).

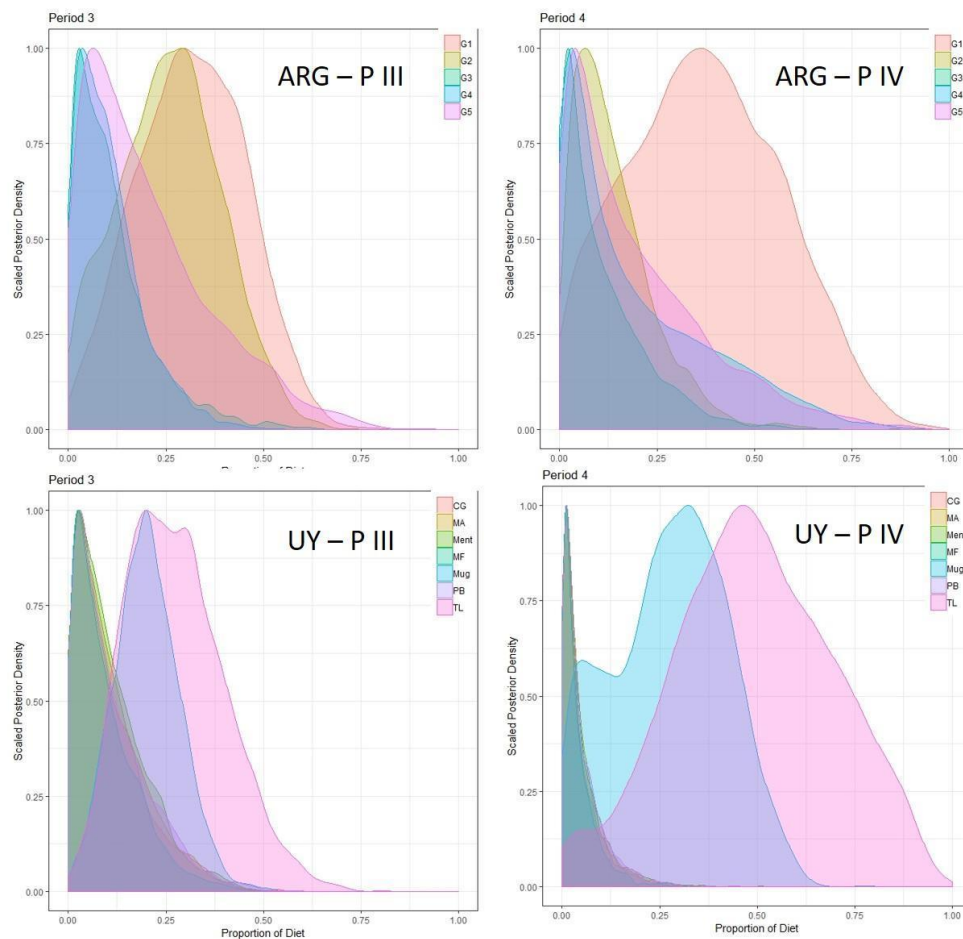


Figure 4. MixSIAR plots of the diet composition of Lahille's bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus gephyreus*) from Argentina (ARG) and Uruguay (UY) collected in Periods III (P III) and IV (P IV). Prey composition of groups 1 to 5 (G1 to G5) are described in Table 3.

4. Discussion

In this work, the temporal and spatial variations in the patterns of diet for the Lahille's bottlenose dolphin were analyzed by means of stable isotope analysis of historical and contemporary bone samples. Our findings represent the first information about the foraging ecology of this endemic dolphin for the coasts of Argentina and Uruguay, showing a diet based mainly on demersal fish for both areas, as reported for other populations of southern Brazil (Secchi et al., 2016). Isotope values for samples collected along the coasts of Argentina were higher than those from Uruguay and southern Brazil, probably reflecting both a

variation in diet composition and differences in the basal isotopic values among areas (Vales et al., 2013). Moreover, the isotopic distinction of the Argentina dolphins can be considered as an additional line of evidence supporting the existence of an Evolutionarily Significant Unit (ESU) of Lahille's bottlenose dolphin in this area, currently isolated from Southern Brazil-Uruguay ESU (Fruet et al., 2014). In a temporal perspective, the analysis of samples covering more than a century also revealed that this ecological difference was consistent across decades, indicating that the large estuary of the Río de la Plata has been probably acting as an important factor driving the ecological structuring of Lahille's bottlenose dolphin populations. In fact, the Río de la Plata estuary constitutes a biogeographic barrier for many taxa in both marine and terrestrial organisms and is hypothesized to constitute a significant biogeographic boundary to coastal ecosystems (Bisbal, 1995; Vales et al., 2013; Pereira et al., 2009). Abrupt environmental changes are known to have the potential to shape ecological patterns in the marine environment, even in high mobile species such as cetaceans. For example, franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) inhabiting coastal waters at both sides of the Río de La Plata estuary show a fine-scale differentiation revealed by genetic data (Mendez et al., 2008). This pattern is also supported by concomitant differences in the diet composition, parasite loads and morphometric parameters (Secchi et al., 2003). The application of stable isotope analysis to reveal population structure have been applied to support the genetic structuring observed in other *Tursiops truncatus* populations (e.g. Borrell et al., 2006; Brotons et al., 2008). Although it was not the main purpose of this study, the ecological discontinuity observed between Southern Brazil/Uruguay and Argentina bottlenose dolphins, which matches with their genetic structuring patterns, seems to coincide with significant changes in ecological characteristics between these regions.

Similar $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for dolphins sampled in southern Brazil and Uruguay were found. This result seems to be in line with the ecological characteristics of the region, where there are no evident environmental barriers acting in the coastal habitat, suggesting that dolphins from Southern Brazil and Uruguay share similar resources and isotopic landscapes. Indeed, Fruet et al. (2014) proposed that dolphins from southern Brazil and Uruguay are split into at least five management units (MU's) functioning as a metapopulation, where exchange and/or movement of individuals between MU's can occur at different temporal and spatial scales. Photo-identification data conducted in La Coronilla, Uruguay, and in the Patos Lagoon Estuary and adjacent coastal areas, southern Brazil, has revealed regular movement

of dolphins between these two areas (Laporta et al., 2016). Every year, a great proportion of dolphins from Uruguay MU are observed feeding in the adjacencies of the Patos Lagoon estuary MU, especially during the cold months, but the inverse movement direction seems to be rare (Laporta et al., 2016). Therefore, the results presented here reinforce the ecological link between these two MUs, despite the fine scale genetic population structure.

4.1. Isotopic niches and dietary patterns of Lahille's bottlenose dolphins from Uruguay and Argentina

Variation in the isotopic niches was observed among some periods and areas (Fig. 4), but the low sample size for these specific cases precludes a robust discussion about the causes that may have driven these variations. Nevertheless, the remarkable reduction in the isotopic niche area from Period I to Period IV in ARG dolphins, region with the largest number of samples available for Period I, is probably mirroring the current reduction of the habitat occupied by the species in Argentina (Vermeulen et al., 2017). Specimens collected from Period I virtually covered the entire range of the historical distributional area of the Lahille's bottlenose dolphin in ARG, ranging from the Rio de la Plata estuary down to the northern Patagonia coast (Vermeulen et al., 2017). On the other hand, samples from Period IV were obtained specifically from Bahia San Antonio population (northern Rio Negro province, Argentina), as there are no more records of the species from the former common sampling areas (e.g. northern Buenos Aires coast, Vermeulen et al., 2017). Therefore, the larger isotopic niche for the Period I samples probably represents the original wide ecological niche of the species in the past, when bottlenose dolphins occupied more diverse habitats and, probably, preyed on different fish types. Currently, it appears that the spatial retraction in habitat use of bottlenose dolphins towards the south of Buenos Aires province have reduced their isotopic niche, apparently occupying a restricted portion of their past niche, with Period IV dolphins showing high nitrogen isotopic values. This pattern of higher $\delta^{15}\text{N}$ values towards southern coastal waters in ARG was already reported for franciscanas (Botta, 2011) and attributed to the influence of the El Rincón estuarine complex (Acha et al., 2004) and continental shelf waters (Lucas et al., 2005), modified from nutrient-rich subantarctic waters (Guerrero & Piola, 1997; Lara et al., 2010; Lucas et al., 2005). Among others, depletion of fish stocks and high contaminant loads have been argued as the main possible causes of the disappearance of the bottlenose dolphins from the Province of Buenos Aires and the southern coast of Uruguay, where the species was frequently seen in the 1970s (Vermeulen et al.,

2017). Indeed, for decades, the region has been intensively explored by fisheries. The whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* represents the species of greatest interest among coastal demersal species from ARG and whose capture had increased since the 1990s by the artisanal, coastal and high altitude fleet that is concentrated in the province of Buenos Aires (Carroza, 2010). The high fishing exploitation of species that are part of the bottlenose dolphin diet along the coast of the Buenos Aires province may have influenced the decline of the population in the area. Moreover, the exploitation of *Cynoscion guatucupa* began in the 1930s and peaked in the 1990s, whereas during the next decade it was considered the second most important species of demersal resources after *M. furnieri* (Ruarte et al., 2004).

Isotopic mixing models demonstrated a diet based mainly on demersal pelagic fish in ARG and UY Lahille's bottlenose dolphins, as demonstrated in previous studies on the feeding of demersal and pelagic demersal sciaenid fish from the coastal zone (Secchi et al., 2016). As reported by those authors for southern Brazil, changes in the proportions of the main prey were also detected between Periods III (1981-2000) and IV (2001-2017) for dolphins collected in both countries.

In Uruguay, mixing models showed that the bottlenose dolphins have been relying on the cutlass fish (*Trichiurus lepturus*) and the mullet (*Mugil liza*) during the last decades, represented by Periods III and IV. No previous information exists about the diet composition of the species for this area, but it is supposed that it would not differ greatly from that reported for the bottlenose dolphins inhabiting southern Brazilian waters (Laporta et al., 2016; Secchi et al., 2016), as they share similar habitat characteristics and fish resources. In that region, the authors noted a decrease in the relative importance of the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) and a rise in the proportion of the cutlass fish (*Trichiurus lepturus*) and the mullet (*Mugil liza*) after the 1980s, which was probably related to the decline of the croaker due to overfishing (Milessi et al., 2005). This change in the availability of this species was also detected in other demersal resources (e.g. the king weakfish, *Macrodon ancylodon*) in Uruguay (Gianelli & Defeo, 2017). Therefore, based on our mixing model results and considering that the species is believed to have a preference for demersal sciaenids, we can hypothesize that the current diet composition of the species in UY could have not been the same in the past. However, isotopic values did not statistically differ among periods, thus a consistency in the diet composition of the species, regardless of the increased depletion of demersal resources in the area is also possible.

The analysis of samples of the Lahille's bottlenose dolphin, including a large part of its distribution and a time series of more than a century, offered a unique opportunity to investigate trophic habits of this subspecies. However, caution is needed when interpreting the results obtained, mainly due to the small sample size in certain areas / periods. In addition, to apply isotope mixing models to investigate predator diets, some prior information about the composition of prey of the species is necessary. The scarcity of previous studies on the species' diet in a large part of its distribution (i.e. Uruguay and Argentina) may have caused the inclusion of prey that are not part of the species' diet in those places. However, the inclusion of prey reported as preferred dietary items and species of common presence in the studied areas, allows us to believe that the results obtained reflected a diet close to the real one. Still, one of the problems of using bone collagen, generally the most commonly available tissue in the case of historical samples of vertebrates, is the lack of specific isotopic discrimination factors for this type of tissue. However, we have tried to control this caveat by using generic TDFs and testing the fit of the models by means of mixing polygon.

4.2. Conclusions

Our findings showed a clear distinction in the isotopic values between dolphins from Brazil (BR)/Uruguay (UY) and those sampled in Argentina (ARG), which reinforces previously identified genetic distinction between these two evolutionary units (Fruet et al., 2014). The temporal analysis covering more than a century revealed that this difference was evident at least since mid-20th century (Periods II, III, and IV). Isotope mixing models also showed some changes in the diet composition of dolphins from UY that somewhat matched what was previously reported for the better studied populations from southern Brazil (Secchi et al., 2016). In ARG, a reduction of the previous (i.e. period I) large isotopic niche area could be evidenced, where period IV dolphins exhibited a narrower niche area that represents a portion of the original one. In conclusion, the retrospective analysis by means of the stable isotope composition in archived bone collagen of Lahille's bottlenose dolphin contributed to the knowledge of the ecological structure and feeding behavior of this poorly known subspecies. These results provide an important contribution for future conservation strategies and management plans for this endangered cetacean subspecies, endemic of the southwestern Atlantic Ocean.

Aknowledgments

We would like to thank to Society of Marine Mammalogy for financial support to this Project through their Small Grants-in-Aid program. This study was financed in part by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)*—Finance Code 001 and the National Council for Scientific and Technological Development (Edital Universal – CNPq). CAPES provided a scholarship to A. C.-R., as well as access to the *Portal de Periódicos* and financial support through *Programa de Excelência Acadêmica—PROEX*. Research fellowship was provided to P.F.F (CAPES-PNPD). We are grateful to the “Museo de Ciencias Naturales de La Plata (Argentina), “Museo Argentino de Ciencias Naturales” (Argentina), “Colección de la Universidad Nacional de Mar del Plata” (Argentina), “Museo Nacional de Historia Natural” (Uruguay), “Colección de Zoología de Vertebrados” de la Facultad de Ciencias (Uruguay), “Museo del mar de Punta del Este” “Coleção do Laboratório de ecologia e conservação da megafauna marinha” (Brazil) and Fundación Mundo Marino (Argentina) for the samples granted for this work. This article is part of A. C.-R.’s MSc. Dissertation in Biological Oceanography (FURG, Brazil) under the supervision of S.B. and P.F.F. This work is a contribution of the research group Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha—EcoMega/CNPq.

Literature cited

- Acha, E. M., Mianzan, H. W., Guerrero, R. A., Favero, M., & Bava, J., 2004. Marine fronts at the continental shelves of austral South America: physical and ecological processes. *Journal of Marine Systems* 44: 83-105.
- Artecona, F., De María, M., Bergamino, L., & Szteren, D. 2019. A historical perspective of niche differentiation between two top predators in the Uruguayan coastal area. *Wildlife research* 46: 136-144.
- Barreto, A. S., 2000. Variação craniana e genética de *Tursiops truncatus* (Delphinidae, Cetacea)(Montagu, 1821) na costa atlântica da América do Sul. Universidade do Rio Grande, Rio Grande, Brazil.
- Bastida, R. and Rodríguez, D. (2003) *Mamíferos marinos de Patagonia y Antártida*. 1.ed. Vázquez Mazzini, Buenos Aires, Argentina.

Bastida, R. & Lichtschein, V., 1984. Capturas incidentales de pequeños cetáceos en el área de Mar del Plata (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Actas de la Primera Reunión de Trabajo de Expertos en Mamíferos Acuáticos de América del Sud: 14-22.

Bastida, R. O., Rodríguez, D., Secchi, E., & da Silva, V. 2007. Mamíferos acuáticos de Sudamérica y Antártida. Vázquez Mazzini Editores.

Bearhop S., Adams C.E., Waldron S., Fuller R.A., Macleod H. 2004. Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, 73: 1007–1012.

Ben-David, M. & Flaherty E.A. 2012. Stable isotopes in mammalian research: a beginner's guide. *Journal of Mammalogy* 93:312-328

Bergamino, L., Lercari, D., & Defeo, O., 2011. Food web structure of sandy beaches: temporal and spatial variation using stable isotope analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 91: 536-543.

Bisbal, G.A., 1995. The southeast South American shelf large marine ecosystem. *Marine Policy* 19: 21-38.

Borrell, A., Aguilar A., Tornero, V., Sequeiro, M., Fernández G., Alis, S., 2006. Organochlorine compounds and stable isotopes indicate bottlenose dolphin subpopulation around the Iberian Peninsula. *Environment International* 32: 516–523.

Botta, S. 2011 Uso do habitat e identificação de unidades populacionais de pequenos cetáceos do Atlântico sul-ocidental através de isótopos estáveis e elementos traços. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil.

Brotons, J. M., Grau, A. M., Rendell, L., 2008. Estimating the impact of interactions between bottlenose dolphins and artisanal fisheries around the Balearic Islands. *Marine Mammal Science*, 24: 112-127.

Carozza, C., 2010. Pesquería comercial de corvina rubia en Argentina (*Micropogonias furnieri*). *Frente Marítimo* 21: 15–22.

Coscarella, M., Dans, S.L., Degradi, M., Garaffo, G. and Crespo, E.A. 2012 Bottlenose dolphins at the southern extreme of the south-western Atlantic: local population decline? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 92: 1843-1849.

Costa, A. P., Rosel, P.E., Daura-Jorge, F.G., Simões-Lopes, P.C., 2016 Offshore and coastal common bottlenose dolphins of the western South Atlantic face-to-face: What the skull and the spine can tell us. *Marine Mammal Science* 32: 1433-1457.

Cullen, J.T., Rosenthal, Y., Falkowski, P.G., 2001. The effect of anthropogenic CO₂ on the carbon isotope composition of marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 46: 996–998. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.4.0996>

Das, K., Beans, C., Holsbeek, L., Mauger, G., Berrow, S. D., Rogan, E., & Bouquegneau, J. M. 2003. Marine mammals from northeast Atlantic: relationship between their trophic status as determined by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements and their trace metal concentrations. *Marine environmental research*, 56(3), 349-365.

Di Tullio, J.C., Fruet, P.F., Secchi, E.R., 2016. Identifying critical areas to reduce bycatch of coastal common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in artisanal fisheries of the subtropical western South Atlantic. *Endangered Species Research* 29: 35–50. <https://doi.org/10.3354/esr00698>

France R.L. 1995 Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: foodweb implications. *Marine Ecology Progress Series* 124, 307–312.

Franco-Trecu, V., Aurióles-Gamboa, D., Arim, M., Lima, M., 2012. Prepartum and postpartum trophic segregation between sympatrically breeding female *Arctocephalus australis* and *Otaria flavescens* . *Journal of Mammalogy* 93: 514–521. <https://doi.org/10.1644/11-mamm-a-174.1>

Franco-Trecu, V., Drago, M., Riet-Sapiriza, F. G., Parnell, A., Frau, R., & Inchausti, P., 2013. Bias in diet determination: incorporating traditional methods in Bayesian mixing models. *PLoS One* 8(11).

- Fruet, P.F., Kinas, P.G., Da Silva, K.G., et al., 2012. Temporal trends in mortality and effects of by-catch on common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*, in southern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 92: 1865–1876
- Fruet, P.F., Laporta, P., Flores, P.A.C., 2017. Report of the Working Group on Population Parameters and Demography of *Tursiops truncatus* in the Southwest Atlantic Ocean. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 11:71.
- Fruet, P.F., Secchi, E.R., Daura-Jorge, F., Vermeulen, E., Flores, P.A., Simoes-Lopes, P.C., Dalla Rosa, L., 2014. Remarkably low genetic diversity and strong population structure in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal waters of the Southwestern Atlantic Ocean. *Conservation Genetics* 15: 879-895.
- Fruet, P.F., Zappes, C.A., Bisi, T.L., Simões-Lopes, P.C., Laporta, P., Loureiro, J.D., and Flores P.A.C., 2016. Report of the Working Group on Interactions between Humans and *Tursiops truncatus* in the Southwest Atlantic Ocean.
- Gianelli, I., & Defeo, O. 2017 Uruguayan fisheries under an increasingly globalized scenario: long-term landings and bioeconomic trends. *Fisheries Research* 190: 53-60.
- Graham B.S., Koch P.L., Newsome S.D., McMahon K.W. and Aurioles D. (2010) Using isoscapes to trace the movements and foraging behavior of top predators in oceanic environments. In West J.B., Bowen G.J., Dawson T.E. and Tu K.P. (eds) *Isoscapes: understanding movement, pattern and process on Earth through isotope mapping*. Dordrecht, The Netherlands: Springer Science and Business Media, pp. 299–318.
- Guerrero, R. A. & Piola, A.R. 1997. Masas de agua en la plataforma continental. *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros* 1:107-118.
- Guerrero, R. A., Acha, E. M., Framin, M. B., Lasta, C. A., 1997. Physical oceanography of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Continental shelf research*, 17(7), 727-742.
- International Whaling Commission. (2018). Report of the Scientific Committee. Bled, Slovenia 24 April – 6 May 2018.

Jackson A.L., Inger R., Parnell A.C., Bearhop S. 2011 Comparing Isotopic Niche Widths among and within Communities: SIBER - Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *The Journal of Animal Ecology* 80: 595–602.

Jackson, A., Parnell, A., Jackson, M. A., 2019. Package ‘SIBER’: Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. R package version, 2(4).

Kjerfve, B., Seeliger, U., De Lacerda, L.D., 2001. A summary of natural and human-induced variables in coastal marine ecosystems of Latin America. In *Coastal marine ecosystems of Latin America* (pp. 341-353). Springer, Berlin, Heidelberg.

Knoff, A.J., Macko, S.A., Erwin, R.M., Brown, K.M., 2002. Stable isotope analysis of temporal variation in the diets of pre-fledged laughing gulls. *Waterbirds* 25:142-148

Krahn, M.M., Herman D.P., Matkin C.O., Durban J.W., Barrett-Lenard L., Burrows D.G., Dahlheim M.E., Black N., LeDuc R.G., Wade P.R., 2007. Use of chemical tracers in accessing the diet and foraging regions of eastern North Pacific killer whales. *Marine Environmental Research* 63: 91–114.

Laporta, P., Martins, C. C., Lodi, L., Domit, C., Vermeulen, E., Di Tullio, J. C., 2016. Report of the working group on habitat use of *Tursiops truncatus* in the Southwest Atlantic Ocean. *Latin American Journal of Aquatic Mammals* 11: 47-61.

Lara, R.J., Alder, V., Franzosi, C.A., Katter G., 2010. Characteristics of suspended particulate organic matter in the southwestern Atlantic: influence of temperature, nutrient and phytoplankton features on the stable isotope signature. *Journal of Marine Systems* 79:199-209.

Lázaro, M. and Praderi, R. 2000 Problems and status of species in Uruguay. Pages 8–9 in Huckle-Gaete, R. (Ed.) *Review of the conservation status of small cetaceans in southern South America*. UNEP/CMS Secretariat Bonn Alemania.

Leatherwood, S. & Reeves, R.R., 1983 Abundance of bottlenose dolphins in Corpus Christi Bay and coastal southern Texas. *Contributions to Marine Science* 26: 179-199.

- Lodi, L., Domit, C., Laporta, P., Di Tullio, J.C., Martins, C.C.A., Vermeulen, E. 2017. Report of the Working Group on the Distribution of *Tursiops truncatus* in the Southwest Atlantic Ocean. Latin American Journal of Aquatic Mammals 11: 29-46.
- Lucas, A.J., Guerrero, R.A., Mianzán, H.W., Acha EM, Lasta C.A., 2005. Coastal oceanographic regimes of the Northern Argentine Continental Shelf (34-43°S). Estuarine, Coastal and Shelf Science 65:405-420.
- Mendez, M., Rosenbaum, H. C., Bordino, P., 2008. Conservation genetics of the franciscana dolphin in Northern Argentina: population structure, by-catch impacts, and management implications. Conservation Genetics, 9(2), 419-435.
- Mermoz, J.F. 1977. Sobre el varamiento de un delfín nariz de botella, *Tursiops truncatus*, en la desembocadura del Río de la Plata (Buenos Aires, Argentina). Physis 7:227-235.
- Mianzan, H., Lasta, C., Acha, E., Guerrero, R., Macchi, G., Bremec, C., 2001. The Río de la Plata estuary, Argentina-Uruguay. In Coastal marine ecosystems of Latin America (pp. 185-204). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Milessi, A. C., Arancibia, H., Neira, S., Defeo, O., 2005. The mean trophic level of Uruguayan landings during the period 1990–2001. Fisheries Research 74: 223-231.
- Moreno, V. J., Pérez, A., Bastida, R. O., Aizpún de Moreno, J. E., & Malaspina, A. M. 1984. Distribución del mercurio total en los tejidos de un delfín nariz de botella (*Tursiops geophyus* Lahille, 1908) de la provincia de Buenos Aires (Argentina). Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero 4: 93-102.
- Newsome, S.D., Rio, C.M., Bearhop, S., Phillips, D.L. 2007. A niche for isotopic ecology. Frontiers in Ecology and the Environment 5:429–36.
- Österblom, H., Olsson, O., Blenckner, T., Furness, R., 2008 Junk-food in marine ecosystems. Oikos 117:967–977.
- Pauly, D., Christensen, V., Dalsgaard, J., Froese, R., Torres, F., 1998 Fishing down marine food webs. Science 279: 860-863

- Pereira, A. N., Márquez, A., Marin, M., & Marin, Y., 2009. Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Río de la Plata and oceanic front in Uruguay. *Journal of Fish Biology*. 75(2), 321-331.
- Perrin, W.F., Thieleking, J.L., Walker, W.A., Archer F.I., Robertson, K.M. 2011 Common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in California waters: Cranial differentiation of coastal and offshore ecotypes. *Marine Mammal Science* 27: 769-792.
- Pinela A.M., Borrell A., Cardona L., Aguilar A. 2010. Stable isotope analysis reveals habitat partitioning among marine mammals off the NW African coast and unique trophic niches for two globally threatened species. *Marine Ecology Progress Series* 416: 295–306.
- Post, D. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position models, methods and assumptions. *Ecology* 83: 703–718.
- R Development Core Team 2016 R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ricciardelli L., Newsome S.D., Fogel M.L. and Goodall R.N.P. 2010. Isotopic assessment of prey and habitat preferences of a cetacean community in the southwestern South Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 418: 235–248.
- Riofrío-Lazo, M., and Aurióles-Gamboa, D. (2013). Timing of isotopic integration in marine mammal skull: comparative study between calcified tissues. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27: 1076–1082.
- Ruarte, C., Lasta, C., Carozza, C., 2004. Pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*). *El mar argentino y sus recursos pesqueros* 4, 271–281
- Savenkoff, C., Morissette, L., Castonguay, M., Swain, D.P., Hammill, M.O., Chabot D., Hanson J. M., 2008. Interactions between marine mammals and fisheries: implications for cod recovery. *Ecosystem ecology research trends*. Nova Science Publishers, New York, NY, 107-151.
- Secchi, E. R., Ott, P. H., Danilewicz, D., 2003. Effects of fishing by-catch and conservation status of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Marine mammals: fisheries, tourism*

and management issues (N. Gales, M. Hindell, and R. Kirkwood, eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia, 174-191.

Secchi, E.R., Botta, S., Wiegand, M.M., Lopez, L.A., Fruet, P.F., Genoves, R.C., Di Tullio, J.C., 2016. Long-term and gender-related variation in the feeding ecology of common bottlenose dolphins inhabiting a subtropical estuary and the adjacent marine coast in the western South Atlantic. *Marine Biology Research* 13, 121–134. <https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1213398>

Seeliger U & Odebrecht C., 2010. O estuário da Lagoa dos Patos: Um século de transformações. 1a edição. Universidade Federal do Rio Grande-FURG.

Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P., 1998. Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. In:(ed)Editora Ecoscientia,Rio Grande.

Sergio, F., Caro, T., Brown, D., Clucas, B., Hunter, J., Ketchum, J., ... Hiraldo, F., 2008. Top predators as conservation tools: ecological rationale, assumptions, and efficacy. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 39, 1-19.

Simões-Lopes, P. C., Daura-Jorge, F. G., Lodi, L., Bezamat, C., Costa, A. P., & Wedekin, L. L. (2019). Bottlenose dolphin ecotypes of the western South Atlantic: The puzzle of habitats, coloration patterns and dorsal fin shapes. *Aquatic Biology* 28: 101–111.

Smith, J.A., Mazumder, D., Suthers, I.M., Taylor, M.D. 2013. To fit or not to fit: Evaluating stable isotope mixing models using simulated mixing polygons. *Methods in Ecology and Evolution* 4:612–618.

Stock, B. C. & Semmens, B. X. 2016. MixSIAR GUI User Manual.<https://github.com/brianstock/MixSIAR/>. doi:10.5281/zenodo.47719.

Vales, D. G., Saporiti, F., Cardona, L., De Oliveira, L. R., Dos Santos, R. A., Secchi, E. R., ... & Crespo, E. A. 2013. Intensive fishing has not forced dietary change in the South American fur seal *Arctophoca (Arctocephalus) australis* of Río de la Plata and adjoining areas. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 24(6), 745-759.

Vermeulen, E., Bastida, R., Berninsone, L.G., Bordino, P., Failla, M., Fruet, P., Harris, G., Iniguez, M., Marchesi, M.C., Petracci, P., Reyes, L., Sironi, M., Brager, S., 2017. A review on the distribution, abundance, residency, survival and population structure of coastal bottlenose dolphins in Argentina. *Latin American Journal of Aquatic Mammals* 12: 2-16.

Vermeulen, E., Fruet, P., Costa, A., Coscarella, M. & Laporta, P. 2019. *Tursiops truncatus* ssp. *gephyreus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019: e.T134822416A135190824. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T134822416A135190824.en>. Downloaded on 08 March 2020.

Walker J.L., Potter C.W. and Macko S.A. (1999) The diets of modern and historic bottlenose dolphin populations reflected through stable isotopes. *Marine Mammal Science* 15: 335–350.

Wickert, J. C., Von Eye, S. M., Oliveira, L.R. & Moreno, I.B., 2016. Revalidation of *Tursiops gephyreus* Lahille, 1908 (Cetartiodactyla: Delphinidae) from the southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Mammalogy* 97: 1728-1737.

Supplementary material

Historic foraging ecology of the endangered Lahille's bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus gephyreus*) inferred by stable isotopes

Andrea Campos-Rangel, Ricardo Bastida, Pedro Fruet, Paula Laporta, Luis Humberto Cappozzo, Meica Valdivia, Els Vermeulen, Silvina Botta

Table S1. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values (‰) of prey species used in the Mixing models to estimate the diet composition of dolphins from Uruguay.

Species	Mean $\delta^{13}\text{C}$	SD $\delta^{13}\text{C}$	Mean $\delta^{15}\text{N}$	SD $\delta^{15}\text{N}$	n	Source
<i>Menthicirrhus americanus</i>	-15.4	0.4	16.7	0.4	4	Franco-Trecu et al. 2012
<i>Micropogonias furnieri</i>	-14.9	0.1	16.2	0.1	7	Franco-Trecu et al. 2012
 <i>Mugil liza</i>	-18	0.4	7.9	0.4	3	Bergamino et al. 2012
<i>Trichiurus lepturus</i>	-17.3	0.4	15.4	1.4	2	Franco-Trecu et al. 2012
<i>Macrodon ancyclodon</i>	-15.3	0.3	16.3	0.2	10	Franco-Trecu et al. 2012
<i>Paralonchurus brasiliensis</i>	-15.5	0.5	16.3	0.5	5	Franco-Trecu et al. 2013
<i>Cynoscion guatucupa</i>	-15.4	0.3	17.0	0.1	6	Franco-Trecu et al. 2012

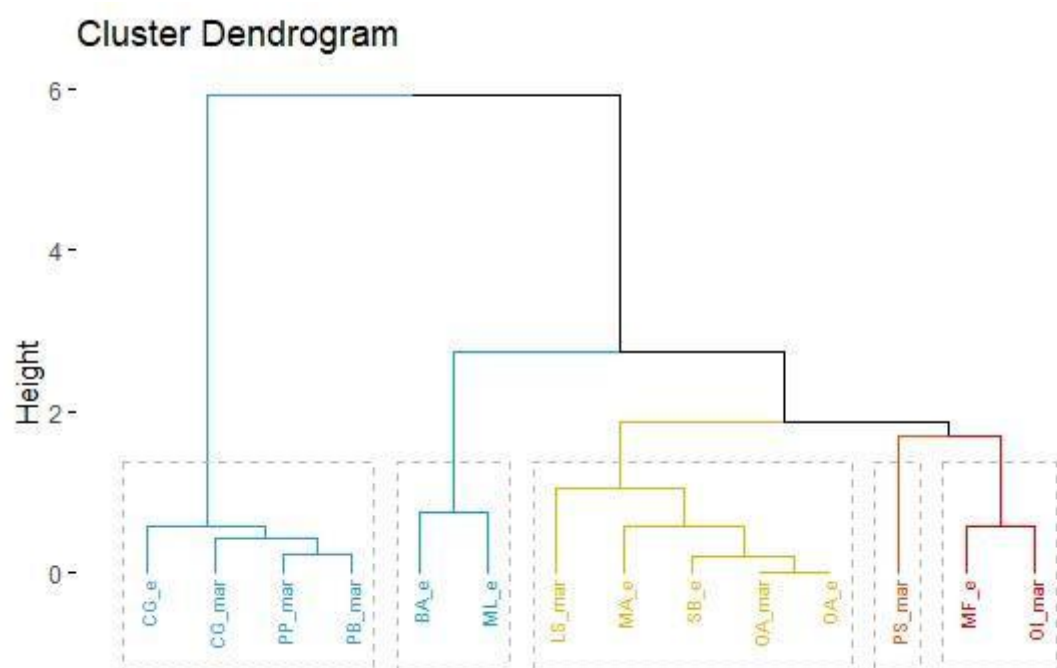


Fig S1. Cluster analysis based on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of potential dietary species of *Tursiops truncatus gephyreus*.

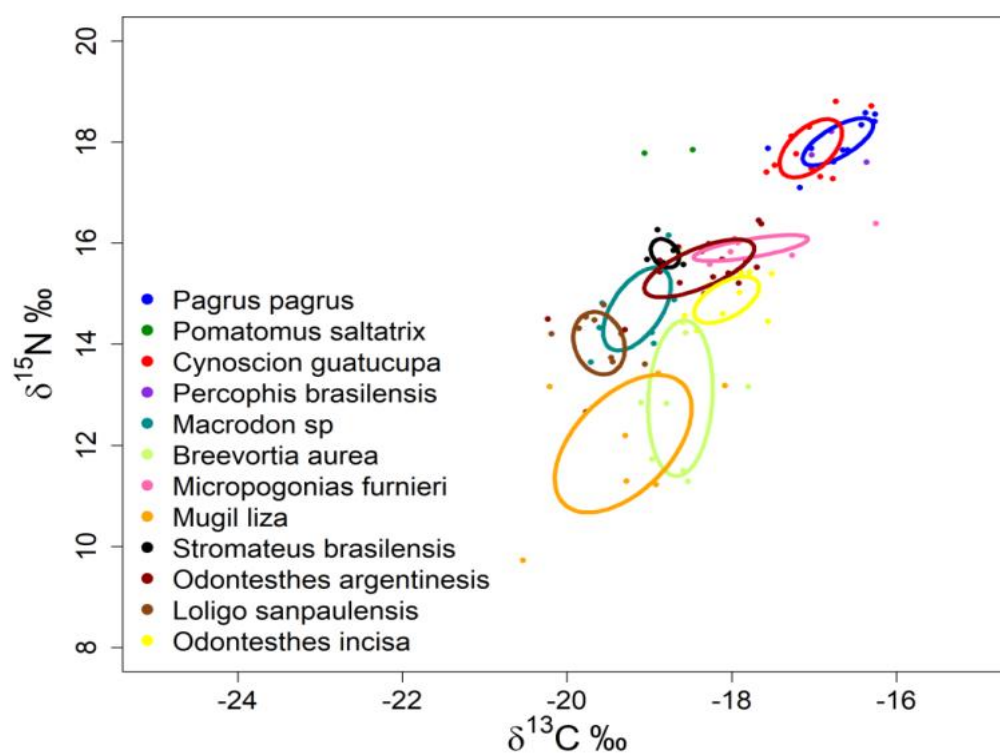


Fig S2. Biplot of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of potential dietary species of *Tursiops truncatus gephyreus*. Each point represents the individual isotopic composition. Standard ellipse areas corrected for small sample sizes (SEAc) are shown.

APÊNDICE II

Tabela 1. Lista de instituições, país e número de exemplares utilizados para análises isotópicas

Procedência das amostras	Origem	n
Laboratório de Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha – IO/FURG	Brasil	29
Museu Oceanográfico “Professor Eliézer Rios” - FURG	Brasil	11
Museo Nacional de Historia Natural	Uruguai	15
Universidad de la República	Uruguai	7
Museo del Mar de Punta del Este	Uruguai	4
Paula Laporta, colección personal	Uruguai	5
Museo de La Plata - UNLP	Argentina	10
Fundación Mundo Marino	Argentina	2
Museo Argentino de Ciencias Naturales	Argentina	16
Els Vermeulen - Mar y Bio	Argentina	4