



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Variación regional y estacional de los linajes
mitocondriales de las ballenas jorobadas
del Pacífico mexicano**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

PRESENTA:

XOCHIQUETZAL CORTÉS RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS MEDRANO GONZÁLEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. MANUEL URIBE ALCOCER
ICMyL, UNAM.

DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
CIECO, UNAM.

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Variación regional y estacional de los linajes
mitocondriales de las ballenas jorobadas
del Pacífico mexicano**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

PRESENTA:

XOCHIQUETZAL CORTÉS RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS MEDRANO GONZÁLEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. MANUEL URIBE ALCOCER
ICMyL, UNAM.

DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
CIECO, UNAM.

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/220/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de enero de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del (la) alumno (a) **CORTÉS RODRÍGUEZ XOCHIQUETZAL** con número de cuenta **508019469** con la tesis titulada "**Variación regional y estacional de los linajes mitocondriales de las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. LUIS MEDRANO GONZÁLEZ**:

Presidente: DR. OMAR CHASSIN NORIA
Vocal: DR. PÍNDARO DÍAZ JAIMES
Secretario: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Suplente: DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Suplente: DR. MANUEL URIBE ALCOCER

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 7 de Mayo de 2013.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la elaboración del proyecto de Maestría.

A mi comité tutorial:

Dr. Luis Medrano González, Facultad de Ciencias, UNAM.

Dr. Manuel Uribe Alcocer, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa, CIECO-UNAM.

A los miembros del jurado:

Dr. Omar Chassin Noria

Dr. Píndaro Díaz Jaimes

Dra. Livia Socorro León Paniagua

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa

Dr. Manuel Uribe Alcocer

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Laboratorio de Genética que proporcionó espacio y equipo para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi comité tutorial por sus valiosos comentarios y apoyo en la realización de este proyecto. En especial al Dr. Uribe por apoyarme con un espacio para la realización de mi tesis

A mi tutor Dr. Luis Medrano González por las horas dedicadas a mi formación y por abrirme las puertas de su grupo de trabajo.

A mis padres y mis hermanos por el apoyo recibido, por la paciencia que tuvieron para que se concluyera este proyecto.

A mis hermanit@s, sin ellos no hubiera sido posible este sueño, gracias por adoptarme, sin duda volvería a hacerlo, para mí ha sido un honor haber formado parte de este grupo. Sé que mi trabajo se llevo a cabo gracias a horas y horas de esfuerzo previo realizado por ustedes. Pero sin duda lo más importante; gracias por hacerme sentir en casa Hiram, Miriam, Axa, Carlos, Sergio, Elia, Sandra Pompa, Sandra Smith, María José y Anidia.

Al laboratorio de Genética del ICMYL. Al Dr. Píndaro Díaz por siempre estar al pendiente de que las cosas marcharan correctamente, por todas sus enseñanzas y sobre todo por el valiosísimo apoyo moral. Gracias a Eva y Lulú por todo lo enseñado durante los análisis de laboratorio.

A Miriam quien además de ser una excelente amiga compartió conmigo los buenos y malos ratos a nivel personal y académico, hizo de mis horas de laboratorio recuerdos increíbles.

A mis inseparables compañeros de la maestría Yislem, José y Roberto gracias por compartir esta aventura conmigo, no pude tener mejores acompañantes. A ti Rober porque cuando el camino se tornó incierto, siempre estuviste presente con palabras de aliento, jalones de oreja, discusiones sobre el tema y compartiste días enteros de trabajo. En lo dicho, juntos llegamos, juntos nos vamos.

Un reconocimiento especial a las personas que me apoyaron con material de laboratorio para la conclusión de mi proyecto Arturo Ávila y Anidia Blanco quien además me brindo su apoyo invaluable para la obtención de mi trabajo de laboratorio.

Finalmente a mis amigos que formaron parte de esto desde otro ángulo, mi vida personal, siempre dándome ánimos y creyendo en mí. Nath, Úrzula, Karla, Cyn, Rosy, Edward y Jorge.

A los que perdí durante este camino
Mis abuelos Teresa y Eugenio
Olga y Blanca

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	3
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 La genética como herramienta en el estudio de las ballenas jorobadas	12
2. ANTECEDENTES	13
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos particulares.....	19
6. METODOLOGÍA	20
6.1 Muestras analizadas	20
6.2 Extracción de DNA	20
6.3 PCR	21
6.4 RFLP	22
6.5 Secuenciación.....	24
6.6 Determinación de los linajes mitocondriales	24
6.7 Análisis de datos	25
7.- RESULTADOS	29
7.1 Identidad haplotípica y filogenia.....	29
7.2 Diversidad y Neutralidad	33
7.3 Diferenciación Genética.....	38
a) Índices de diferenciación genética	40
b) Análisis de componentes principales.....	46

8- DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIONES	55
10. LITERATURA CITADA	57
11. ANEXOS	64

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Ballena jorobada. Imagen de P. Folkens en Perry <i>et al</i> ,1999.....	14
Figura 2. Localización de las zonas de estudio. La primera, la Bahía de Banderas ubicada entre Nayarit y Jalisco y la Segunda Isla Socorro (IS) que es parte del Archipiélago de Revillagigedo del cual también forman parte Isla Clarión (IC), Isla Roca partida (IRP) e Isla San Benedicto (ISB)	21
Figura 3. Extracciones de DNA de piel de ballena jorobada. Carril 1 marcador, carriles 2-8 extracciones DNA ballenas jorobadas 2004	22
Figura 4. Amplificaciones de aproximadamente 531 pb con los primers Dlp 5 y Dlp 1.5 mtDNA. Carril 1 marcador 1 Kb plus, carriles 2-20 muestras correspondientes a ballenas jorobadas del Pacífico mexicano del año 2005.....	22
Figura 5. Digestiones con la enzima <i>NcoI</i> . Carril 1 marcador 1 Kb plus, carriles 2-20 muestras del año 2005. La presencia de dos bandas indica un sitio de corte para esta enzima.....	23
Figura 6. Digestiones con la enzima <i>DraI</i> . Carril 1, marcador 1 Kb plus, carriles 2 – 6, muestras del año 2005. Carril 9, producto de PCR sin digerir. La presencia de dos bandas indica que existe un sitio de corte para esta enzima.....	23
Figura 7. Digestiones con la enzima <i>Sau96I</i> . Carril 1, marcador 1 Kb plus, carriles 2-7 digestiones de producto de PCR correspondientes al año 2005, carril 8 producto de PCR sin digerir. Se muestran las tres posibles combinaciones de cortes. Carril 1, 2 (abc), carril 3, (bc) carril 4, 5 (ac)	24
Figura 8. Haplotipos identificados, sitios variables y sitios de restricción. Haplotipos identificados en el Pacífico Norte para la secuencia de un fragmento de 426 pb de la región control de la posición 1278 a la 1703 del mtDNA de las ballenas jorobadas. Cambios en los nucleótidos: adenina (azul), guanina (negro), timina (rojo) y citocina (azul). En la parte superior se muestran los sitios de corte para las enzimas <i>NcoI</i> , <i>DraI</i> y <i>Sau96I</i>	31
Figura 9. Reconstrucción filogenética de 58 secuencias de la región control del mtDNA de las ballenas jorobadas con sus probabilidades posteriores ver Anexo 3.....	32

Figura 10. Relación entre los índices θ_k y θ_h para las diferentes etapas invernales de las ballenas jorobadas en el Pacífico mexicano.....	36
Figura 11. Relación entre los índices θ_s y θ_π para las diferentes etapas invernales de las ballenas jorobadas en el Pacífico mexicano.....	37
Figura 12. Relación entre la Fis observada y la Fis esperada para las diferentes etapas invernales identificadas	38
Figura 13. Frecuencias haplotípica entre regiones. Composición haplotípica global para la región de Isla Socorro y la región de la Bahía de Banderas.....	39
Figura 14. Frecuencias haplotípica entre regiones por año. Composición haplotípica para Isla Socorro y la Bahía de Banderas para los años 2004 y 2005.....	39
Figura 15. Distribución temporal de las frecuencias haplotípicas para el Pacífico mexicano	41
Figura 16. Diferenciación molecular (ϕ_{st}) y por frecuencias de haplotipos (F_{st}) entre las diferentes etapas invernales de las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano. BB = comparación entre etapas de la Bahía de Banderas, IS = comparación entre etapas de Isla Socorro, BB_IS = comparación entre etapas de la Bahía de Banderas e Isla Socorro	43
Figura 17. Estructura espacio temporal de la variación genética mitocondrial para los índices F_{st} y ϕ_{st}	44
Figura 18. Diferenciación molecular (ϕ_{st}) y por frecuencias de haplotipos (F_{st}) anual (2004- 2005), regional (BB = Bahía de Banderas, IS = Isla socorro) y estacional (entre etapas invernales, para Isla Socorro ver los grupos comparativos Cuadro 10) de las ballenas jorobadas de Pacífico mexicano	46
Figura 19. Distribución de los grupos invernales y haplotipos para los dos primeros factores principales. Se observa una clara diferenciación para los grupos preestablecidos: el Factor 1 separa claramente las regiones.	49
Cuadro 1. Número de muestras por sitio y por año.....	20
Cuadro 2. Patrones de corte enzimático para los diferentes haplotipos. Para <i>NcoI</i> y <i>DraI</i> , 0 = ausencia del sitio de corte, 1= existe el sitio de corte. Para la enzima <i>Sau96I</i> , existen tres diferentes sitios de corte, que denominamos a = sitio de corte en la posición 23, b = sitio de corte en la posición 262 y c = sitio de corte en la posición 371	30

Cuadro 3. Diez agrupaciones naturales identificadas para la Bahía de Banderas (BB03-04 y BB04-05) e Isla Socorro (IS03-04 y IS04-05). El cuadro muestra un resumen de las muestras encontradas cada cuatro días, excepto para los días donde la diferencia entre agrupaciones es muy cercana.....	34
Cuadro 4. Número de muestras de las cuales se logró extraer DNA y número de muestras que se logró tipificar.....	33
Cuadro 5. Diversidad genética mitocondrial para las etapas invernales de Isla Socorro y la Bahía de Banderas. Se indica el tamaño de muestra (N), número de haplotipos (k), diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π)	35
Cuadro 6. Pruebas de neutralidad para las etapas invernales de Isla Socorro y la Bahía de Banderas.....	36
Cuadro 7. Valores de endogamia. Valores de endogamia observados y esperados calculados a partir de la prueba de E-W así como su respectivo valor de probabilidad (P).....	37
Cuadro 8. Matriz de índices F_{st} . Variación genética mitocondrial de las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano entre las diversas etapas invernales para los dos años. El signo + indica significancia estadística sobre 0.05.....	42
Cuadro 9. Matriz de índices ϕ_{st} . Variación genética mitocondrial de las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano entre las diversas etapas invernales para los dos años. El signo + indica significancia estadística sobre 0.05.....	42
Cuadro 10. Grupos de comparación formados y sus abreviaturas para analizar la variación en Isla Socorro (ver Cuadro 3, Anexo 4 y 5).....	45
Cuadro 11. Diferenciación molecular (ϕ_{st}) y diferenciación entre haplotipos (F_{st}) así como sus valores de P, comparación entre regiones (BB-IS), entre años (BB04-05; IS04-05) y a lo largo de las temporadas para la Bahía de Banderas (BB_E) y la Isla Socorro (IS_E; IS_AE1; IS_AE; ver Cuadro 10). En negritas indica significancia estadística sobre 0.05.....	45
Cuadro 12. Eigenvalores y varianza, proporciones relativas y acumuladas. Eigenvalores y varianza para los primeros seis factores del análisis de componentes principales.....	47
Cuadro 13. Contribución de cada variable a los seis principales factores. Se muestra la contribución de cada grupo invernal a los factores del análisis de componentes principales. Para el factor 1 y 2 marcados en negritas los grupos que más contribuyen a dicho factor.....	47

Cuadro 14. Contribución de cada variable a los seis principales factores. Se muestra la contribución de cada haplotipo a los factores del análisis de componentes principales. Para el Factor 1 y 2 marcados en negritas los haplotipos que más contribuyen a dicho factor..... 48

RESUMEN

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) realiza migraciones anuales relacionadas con sus ciclos de alimentación y reproducción. Durante el verano, las ballenas se alimentan en regiones subpolares de alta productividad y en el invierno migran a regiones subtropicales en donde realizan actividades reproductivas. En el mundo existen tres poblaciones que corresponden al Pacífico Norte, el Atlántico Norte y el Océano Austral. La población del Océano Pacífico Norte está subdividida en *stocks* de acuerdo con la terminología de la Comisión Ballenera Internacional. Si bien los *stocks* tienen áreas de alimentación específicas, éstos pueden mezclarse en las zonas de reproducción aunque globalmente las zonas reproductivas están demográfica y genéticamente diferenciadas como resultado de la fidelidad migratoria que los recién nacidos aprenden de sus madres durante el primer año de vida. Los *stocks* muestran diferenciación en los linajes de DNA mitocondrial (mtDNA) y de esta manera, la estructura genética de las poblaciones es un reflejo de su estructura migratoria. En este trabajo se analizó la estructura migratoria de las ballenas jorobadas que llegan al Pacífico mexicano con base en la variación anual y estacional del mtDNA tanto en el *stock* que se reproduce en las Islas Revillagigedo como en el que se reproduce en la costa continental entre México y Centroamérica. Se analizó un total de 352 muestras de piel de ballenas jorobadas de la Isla Socorro, Revillagigedo y la Bahía de Banderas, Nayarit-Jalisco de los inviernos 2003-2004 y 2004-2005. Se realizaron extracciones de DNA y amplificaciones de un fragmento de la región control del mtDNA de 531 pb. Algunos de los fragmentos amplificados fueron algunos secuenciados y otros examinados mediante el análisis de su polimorfismo de restricción (RFLP) para tipificar los haplotipos mitocondriales. Esto permitió identificar los haplotipos A+, A-, E, E7, E10 y F. De acuerdo con el muestreo, se identificaron tres grupos estacionales en ambos años y en ambas zonas. En la Isla Socorro son más abundantes los haplotipos A+ seguidos de los E y A-, mientras que en la Bahía de Banderas predominan los tipos F y E. El haplotipo E10 se encontró como exclusivo de la Bahía de Banderas. Se encontró una diferenciación primaria entre la Bahía de Banderas e Isla Socorro y no hubo diferencias entre los años 2004 y 2005 en ninguna de las dos regiones. La variación entre etapas invernales mostró que la Bahía de Banderas presenta una estructuración fuertemente estacional mientras que Isla Socorro presenta una ligera estructuración en parte anual y en parte estacional. En general, la Bahía de Banderas presenta valores más elevados para todos los índices de diversidad con respecto a la Isla Socorro. El análisis de neutralidad de Tajima sugiere que el *stock* al que pertenecen las ballenas de la Bahía de Banderas ha pasado por un cuello de botella

mientras que el *stock* de la Isla Socorro se encuentra en expansión actual. De acuerdo al análisis de Ewens-Watterson, ambos grupos poblacionales parecen estar sujetos a exogamia. Estos resultados muestran que las ballenas jorobadas en el Pacífico Norte tienen una estructura genética determinada no solo por la estructura migratoria histórica sino también por los procesos demográficos actuales los cuales son afectados por las actividades humanas.

ABSTRACT

The humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) shows an annual migration cycle of feeding and reproduction. During the summer, the whales feed in subpolar regions of high productivity and in the winter, they migrate to subtropical regions where they perform reproductive activities. There are three humpback whale populations in the world corresponding to the North Pacific, North Atlantic and Southern Ocean. The North Pacific population is subdivided into *stocks* using the terminology of the International Whaling Commission. Although the stocks have specific feeding areas, they can mix in the breeding regions; anyway, for demography and reproduction, breeding areas are genetically differentiated as a result of migration fidelity that calves learn from their mothers during the first year of life. The stocks show the differentiation in the lineages of mitochondrial DNA (mtDNA) and thus, the genetic structure of populations reflects their migration structure. In this thesis the structure of the humpback whale migration in the Mexican Pacific was analyzed based on annual and seasonal variation of mtDNA lineages at the Revillagigedo Islands and the mainland coast between Mexico and Central America. A total of 352 skin samples of humpback whales in the Socorro Island, Revillagigedo and the Bahía de Banderas, Nayarit, Jalisco were analyzed during the winters 2003-2004 and 2004-2005. DNA was extracted and 531 bp fragment of the mtDNA control region was amplified. The amplified fragments were sequenced and/or examined as restriction polymorphisms (RFLP) to characterize mitochondrial haplotypes. This allowed to identify haplotypes A+, A-, E, E7, E10 and F. According to sampling, we identified three seasonal groups for both years in both areas. In Socorro Island haplotypes A+ were predominant followed by haplotypes E and A-; in Bahía de Banderas types F and E predominate. The E10 haplotype was found as exclusively for Bahía de Banderas. There was a primary differentiation between Bahía de Banderas and Isla Socorro and there was no difference between the 2004 and 2005 winters for any of the two regions. Variation between winter stages showed that Bahía de Banderas has a strong seasonal structure while Isla Socorro has a slight structure due in part to annual and in part to seasonal variation. In general, Bahía de Banderas shows higher values for all diversity indices over Socorro Island. The Tajima neutrality analysis suggests that the *stock* in Bahía de Banderas has gone through a bottleneck while the *stock* of Isla Socorro is expanding. According to the analysis of Ewens-Watterson, both populations appear to be subject to exogamy. These results show that humpback whales in the North Pacific have a genetic structure determined not only by historical processes but also by the current demographic processes which are affected by human activities.

1. INTRODUCCIÓN

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*, Borowski, 1781) es un mamífero marino que tiene una distribución cosmopolita. Su distribución está regida estacionalmente ya que presentan un ciclo migratorio anual de alimentación-reproducción. Durante el verano se alimentan en latitudes altas asociadas a aguas de alta productividad, para durante el invierno migrar hacia aguas tropicales y subtropicales de aguas someras cerca de costas insulares o continentales en donde realizan actividades reproductivas (Dawbin 1966, Medrano-González y Urbán-Ramírez, 2002).

Las ballenas jorobadas tienen un ciclo de reproducción asociado a sus migraciones. Las crías de estos rorcuales nacen durante el invierno después de un periodo de gestación entre 11 y 12 meses y su nacimiento se da en bajas latitudes. Las crías son precoces; comienzan la migración con sus madres hacia las altas latitudes de alimentación con solo pocas semanas de nacidos y se cree que durante este tiempo aprenden la fidelidad a sus destinos migratorios (Baker, *et al.* 1987, Clapham 2000).

Actualmente se distinguen tres poblaciones de ballenas jorobadas en el mundo, una en el Océano Pacífico Norte, otra en el Océano Austral y finalmente la del Océano Atlántico Norte. Estas tres poblaciones están segregadas a su vez en unidades más pequeñas denominadas “stocks”, esto es unidades demográficas relativamente aisladas entre las que hay flujo génico (Baker *et al.*, 1986; Urbán *et al.*, 2000; Medrano-González *et al.*, 2001).

A partir de datos de foto-identificación y de análisis genéticos, se considera que la población del Océano Pacífico Norte se divide en tres *stocks*: el que se alimenta entre las costas de California y del sur de la Columbia Británica y se reproduce en aguas del Pacífico mexicano y Centroamérica; el *stock* que se alimentan entre la zona Norte de la Columbia Británica y el sureste de Alaska y se reproduce alrededor de las Islas Hawai y el tercer *stock* que se alimenta en el mar de Bering e Islas Aleutianas y se reproduce en islas diversas desde el sur de Japón hasta las Filipinas (Baker *et al.*, 1986., Baker *et al.*, 1998; Medrano-González *et al.* 1995).

En México, la distribución de las ballenas jorobadas se ha dividido en tres subregiones geográficas a) Baja California Sur b) Costa continental del Pacífico Oriental y c) Islas Revillagigedo (Rice, 1974, Urbán-Ramírez y Aguayo, 1987, Medrano-González *et al.*, 1995;

Urbán *et al.*, 2000; Calambokidis *et al.*, 2008). Datos de fotoidentificación y de genética proponen que las aguas mexicanas sirven como área de estancia invernal para dos unidades poblacionales distintas de ballena jorobada: el *stock* costero y el *stock* Revillagigedo (Medrano-González *et al.*, 1995, Urbán-Ramírez *et al.*, 2002, González-Peral, 2006.).

Diversas investigaciones muestran que las ballenas jorobadas son más fieles a sus destinos de alimentación que a los de reproducción, esto como resultado de la filopatría que aprenden las crías de sus madres durante el ciclo migratorio anual. Durante el invierno, las ballenas jorobadas provenientes de distintas zonas de alimentación se mezclan en regiones de reproducción dentro de las cuales se mueven continuamente. La mezcla en las zonas de reproducción por su parte promueve el flujo génico dentro de la población (Medrano-González y Urbán-Ramírez, 2002). Así, cada uno de los destinos invernales posee una combinación de distintos *stocks* la cual puede llegar a generar variaciones y una estructuración migratoria.

Generar conocimientos sobre la variación genética de la ballena jorobada nos ayudan a comprender la estructura y dinámica migratoria de esta especie; así como sus posibilidades de recuperación y sus respuestas evolutivas a las actividades humanas. Durante los siglos XIX y XX, las ballenas jorobadas se cazaron comercialmente a gran escala. Su abundancia poblacional prístina se calculó entre 15 000 y 20 000 individuos y después de la caza comercial apenas quedaron cerca de 1000 individuos (Rice, 1974). Actualmente se ha calculado la abundancia poblacional en aproximadamente 21 000 individuos, un poco más que su abundancia poblacional original. En México, para inicios de los 1990 se estimó una población de 1800 animales en la costa Pacífica y en la actualidad se estima que hay 4,000. En las Islas Revillagigedo, se calcula que había 900 ballenas y actualmente se cree que existen 2600 individuos (Calambokidis *et al.*, 2008). Hoy en día, la cacería comercial a gran escala cesó y todas las poblaciones se encuentran en aparente recuperación. En nuestro país la ballena jorobada se encuentra protegida por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Sin embargo, las pesquerías, colisiones con barcos, degradación del hábitat y competencia por recursos afectan negativamente a las ballenas jorobadas (Perry *et al.* 1999). Por otro lado, la dependencia de las ballenas jorobadas de aguas muy productivas para la alimentación y de aguas someras y tibias para la reproducción, hacen del cambio climático un factor que podría estar afectando la dinámica poblacional y la estructura filogeográfica naturales en la especie.

1.1 La genética como herramienta en el estudio de las ballenas jorobadas.

Las variaciones en moléculas con información genética (proteínas, RNA y DNA) pueden reflejar diferentes aspectos de la historia de las especies. La existencia de polimorfismos genéticos en las poblaciones es de gran importancia para el estudio de los procesos biológicos en la ecología evolutiva y la sistemática. Por ejemplo, algunas de las relaciones filogenéticas en cetáceos han sido inferidas de esta manera (Árnason *et al.*, 2004; Hatch *et al.*, 2006). Gracias a que existe variación a nivel individual, poblacional y específico, es posible determinar la identidad de los organismos, así como su pertenencia a alguna población o especie en particular. En el DNA existen marcadores cuya caracterización puede ayudarnos a inferir si existen relaciones de tipo evolutivo, filogenético y ecológico. Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) son unos de ellos (Awise, 2004).

El descubrimiento de las endonucleasas de restricción en 1968 revolucionó la biología molecular. Las enzimas de restricción de tipo II pueden cortar el DNA en una secuencia particular de nucleótidos. Estas enzimas encuentran una amplia aplicación en los ensayos de laboratorio (Awise, 2004). El análisis de RFLP involucra el corte o restricción del DNA con una o más endonucleasas separando los fragmentos resultantes de acuerdo a su peso molecular. La separación de los fragmentos se hace usualmente en geles de agarosa o poliacrilamida por medio de electroforesis. Las diferencias individuales de esta digestión pueden resultar de la presencia/ausencia del sitio de restricción que obedece a sustituciones, adiciones, deleciones o rearrreglos del DNA. Con cada punto de variación en los sitios de corte se producen cambios en el patrón de bandas. La principal ventaja del uso de los RFLP radica en su sencillez y capacidad para detectar muchos sitios polimórficos. (Awise, 2004). Con el desarrollo de las técnicas modernas de secuenciación e hibridación de DNA, el uso de los RFLP ha caído en cierto desuso pero no han dejado de ser útiles.

Un marcador fundamental en el estudio de la variación genética en los animales es el DNA mitocondrial (mtDNA) el cual posee una estructura circular de entre 15 y 20 Kb y está compuesto por 37 genes que codifican 22 tRNAs, 2 rRNAs y 13 mRNAs para proteínas específicas involucradas en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Posee una región control de 1 Kb que inicia la replicación y transcripción (Awise, 2004). En los mysticetos el tamaño y la secuencia de la región control es muy similar con diferencias solo en los primeros 160 pb. En las ballenas jorobadas casi un 85% del polimorfismo se ha registrado en

los primeros 410 pb de la región control siendo una de las porciones del mtDNA con más alta tasa de sustitución (Árnason *et al.*, 1993, Baker y Medrano-González, 2002). Debido a estas características, la región control del mtDNA es particularmente adecuada para estudios de evolución intraespecífica (Palumbi *et al.* 1991).

El análisis del mtDNA es una herramienta útil para describir la estructura genética de los linajes maternos entre poblaciones y es sensible a los cambios en la estructura demográfica histórica. Este marcador tiene dos ventajas principales sobre los marcadores nucleares, 1) Por ser estrictamente de herencia materna no es recombinante y refleja las relaciones filogenéticas y 2) Debido a su alto índice de evolución, que es de 5 a 10 veces más rápido que las regiones codificantes del DNA nuclear de la mayoría de los mamíferos, permite detectar procesos de diferenciación entre poblaciones de una misma especie y analizar algunos aspectos demográficos históricos dentro de las poblaciones (Hoelzel y Dover 1991).

Estudios basados en la exploración del mtDNA con la técnica de RFLP han encontrado una marcada segregación de los haplotipos entre subpoblaciones de ballenas jorobadas. Debido a la ausencia de barreras geográficas y a una gran movilidad por la especie, esta segregación puede ser la consecuencia de la fidelidad a los destinos de migración heredada vía materna por los animales durante su primer año de vida (Baker *et al.*, 1990, 1993; Baker y Palumbi, 1995,1997; Larsen *et al.* 1996; Baker *et al.*, 1998; Rosenbaum *et al.*, 2002; Witteveen *et al.*, 2004).

2. ANTECEDENTES

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) es un rorcual de cuerpo robusto que se estrecha después de la aleta dorsal. Su coloración dorsal es negra y la ventral varía del blanco al negro (Figura1).

Presenta dimorfismo sexual invertido, las hembras adultas tienen una longitud promedio de 15 m y los machos de 14 m con un peso aproximado de 30-40 toneladas. En cada lado del paladar, las ballenas jorobadas presentan un promedio de 270-400 barbas de un máximo 80 cm. Las ballenas jorobadas presentan surcos guloventrales que se extienden desde el mentón hasta el ombligo. Las aletas pectorales son muy largas, aproximadamente un tercio de la longitud total y

de esta característica deriva el nombre del género. Existe una aleta dorsal situada en el tercio posterior de altura cercana a 30 cm, esta se encuentra sobre una giba de longitud y robustez variables, de la que deriva el nombre común de estos animales. La aleta caudal es aproximadamente un tercio de la longitud total y su borde anterior está marcadamente curvado hacia atrás (Leatherwood, 1988; Clapham, 2002).

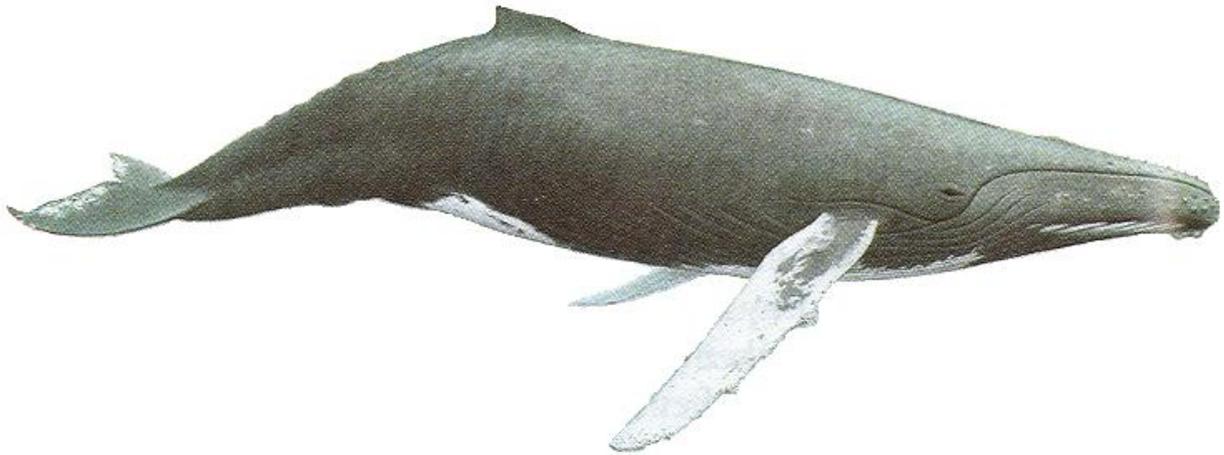


Figura 1. Ballena jorobada. Imagen de P. Folkens en Perry *et al*, 1999.

La ballena jorobada se clasifica de la siguiente manera:

- Reino: Animalia.
- Phylum: Chordata.
- Subphylum: Vertebrata.
- Superclase: Amniota.
- Clase: Mammalia.
- Subclase: Theria.
- Infraclasse: Eutheria.
- Superorden: Laurasiatheria.
- Orden: Cetacea.
- Suborden: Mysticeti.
- Familia: Balaenopteridae.
- Género y especie: *Megaptera novaeangliae* (Borowski, 1781).
(Hershkovitz, 1966; Kellogg, 1932; Rice, 1998; Watson, 1985).

Las ballenas jorobadas se distribuyen en tres océanos, Pacífico Norte, Atlántico Norte y Océano Austral y su distribución se extiende desde los trópicos hasta el margen de los hielos subpolares. En las diferentes etapas de su ciclo de vida se encuentran asociadas a aguas someras, en los márgenes de la plataforma continental o aguas adyacentes a islas oceánicas. Como otros misticetos, las ballenas jorobadas tienen un ciclo migratorio anual. Durante el verano se alimentan en latitudes de 35 a 65° y temperatura superficial de 2 a 21 °C. Estas regiones de alta productividad están asociadas a parches con elevada densidad de sus presas. No se conoce con detalle la composición de la dieta de las ballenas jorobadas pero esta consiste en general de peces pequeños que forman cardúmenes y krill. Los hábitos alimentarios de la especie son oportunistas y varían dependiendo la región geográfica donde se localizan. Durante el invierno migran a regiones subtropicales entre las latitudes de 0 a 35° y temperatura superficial entre 20-25 °C donde se aparean, paren y crían a sus recién nacidos durante sus primeros meses de vida. La distribución invernal de las ballenas jorobadas es bastante regular pero pueden modificarse sus patrones de distribución y abundancia debido a variaciones oceanográficas anuales como El Niño/La Niña (Medrano-González *et al.* 2001).

En México las ballenas jorobadas se encuentran distribuidas en la zona continental desde Sinaloa, las costas de Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas pero se agregan particularmente en la región de la Bahía de Banderas donde se les puede observar desde fines de octubre hasta principios de mayo con mayor abundancia durante enero y febrero. Las ballenas jorobadas en las Islas Revillagigedo se han observado desde noviembre hasta mayo con mayor abundancia en marzo particularmente en las Islas Socorro y Clarión (Urbán y Aguayo 1987).

Las ballenas jorobadas migran cerca de 10 000 Km cada año entre sus zonas de alimentación en zonas cercanas al polo Norte y las zonas de apareamiento y alumbramiento en aguas tropicales. Los tiempos de arribo están estratificados por clase de edad y sexo (Nishiwaki, 1959) y el ciclo migratorio puede estar influenciado por otros factores incluido el estatus reproductivo (Brown, 1995). Los patrones de distribución y migración son reflejados en la estructura genética de las poblaciones. Debido a una ausencia de barreras geográficas y una alta movilidad por parte de la especie esta segregación puede ser la consecuencia de la fidelidad materna a los destinos migratorios (Baker *et al.*, 1990; Palsbøll *et al.*, 1995), sin embargo las rutas y estructuras migratorias de todo el Pacífico Norte aún no han sido del todo entendidas (Calambokidis *et al.*, 2001).

A partir del desarrollo de las técnicas moleculares se ha caracterizado la variación genética de la ballena jorobada asociada a la mayor parte de su distribución mundial habiéndose examinando al menos la región control del mtDNA, el intrón 1 de la actina y varios *loci* de microsatélites. Previa descripción de los linajes mitocondriales de las ballenas jorobadas han demostrado que existe una diferenciación en tres principales poblaciones a nivel mundial describiendo los grupos de mtDNA en tres clados CD, IJ y AE con diferencias significativas en sus frecuencias en los tres océanos. El clado CD fue encontrado en los tres océanos pero es más abundante en el hemisferio Sur, el clado IJ es más abundante en el Atlántico Norte mientras que el AE en el Pacífico Norte. El clado AE es el más divergente en la filogenia y el más abundante en el Pacífico Norte sugiriendo que esta región es su origen. En los tres océanos parece haber clinas mitocondriales en la distribución de estos clados que se han interpretado como eventos de dispersión y cambios de distribución asociados a las glaciaciones. El origen de la población mitocondrial del Pacífico norte asimismo se estima al fin de la glaciación Illinoiana hace 100,000 - 120,000 años. Las ballenas jorobadas de Revillagigedo y la costa pacífica continental mexicana son genéticamente muy similares pero se distinguen por la presencia de haplotipos raros en la zona costera y la divergencia de ambas se estima en hace 4000 9000 años que es el periodo de la última deglaciación (Palumbi y Baker, 1994; Medrano-González *et al.*, 1995, 2001, 2006; Baker y Medrano-González, 2002; Baker *et al.* 1993, 1998; Vázquez-Cuevas, 2008).

La población del Pacífico Norte está compuesta por los clados AE y CD. El clado CD incluye los haplotipos F mientras que el AE incluye los haplotipos A y E. Las enzimas *NcoI*, *DraI*, *Sau96I* usadas en la región control por Baker *et al.* (1998) demostraron ser útiles para distinguir los dos clados y los tres haplotipos más comunes presentes en el Pacífico Norte. El clado AE puede ser distinguido del CD con la enzima *NcoI* y *DraI*. Dentro del clado AE los tipos A y E fueron distinguidos por *DraI*. Los tipos A+ y A- fueron distinguidos por *Sau96I* (Baker *et al.*, 1993, 1998; Medrano-González *et al.*, 1995).

Medrano-González *et al.* (1995) así como Baker *et al.* (1998) encontraron que los haplotipos A+ y A- son más comunes en el sureste de Alaska y los F y E en California. En México, ocho haplotipos han sido identificados con el uso de enzimas de restricción: A, AE, E1, E2, E3, E4, F1 y F2, dominando los haplotipos E y siendo menos frecuentes los A (que son más comunes hacia el Norte) y los F (que se encuentran más frecuentemente hacia el Sur). Actualmente con el uso de secuencias se han encontrado un total de 31 haplotipos para todo el Pacífico Norte en un fragmento de 565pb de mtDNA. Gracias a la distinción de estos clados, las composiciones

haplotípicas de las ballenas en sus áreas de alimentación y de estancia invernal pueden compararse para inferir patrones migratorios.

La comparación del DNA mitocondrial entre los destinos de reproducción en México y las zonas de alimentación, muestran que los destinos migratorios principales para las ballenas del Continente son el oeste del Golfo de Alaska, el norte de la Columbia Británica y el Sur de la Columbia Británica - Washington; y para Revillagigedo el Mar de Bering, oeste del Golfo de Alaska, y el este de las Islas Aleutianas, sin embargo aunque llegaran a compartir algunas conexiones migratorias, lo que hace la diferencia, es que se encuentran relacionadas con estas zonas en diferente proporción (González-Peral, 2011; Calambokidis *et al.*, 2008).

Vázquez-Cuevas (2007) y Robles-Saavedra (en elaboración), analizaron 285 muestras de piel de ballena de 1990 a 1996. Vázquez-Cuevas (2007) exploró la distribución en tiempo y espacio de cuatro microsátélites (GATA 28, GATA 53, GATA 417, TAA 31) y encontró que los rorcuales jorobados de estas zonas parecen tener patrones de arribo migratorio específicos. Sin embargo, los microsátélites, por ser marcadores nucleares heredados biparentalmente y considerando que los machos se dispersan más que las hembras, mostraron poca diferenciación genética (F_{st}) entre las tres zonas de reproducción del Pacífico mexicano aunque tal diferenciación es observable y con un patrón reconocible. Mientras que Robles-Saavedra encontró una estructuración espacial y estacional de la variación genética mitocondrial y una diferenciación nuclear nula para el sitio de restricción Kpn I del intrón 1 de la actina.

González-Peral (2011) con el uso de 1,114 secuencias de la región control encontró 27 haplotipos mitocondriales en el Pacífico mexicano para en un fragmento de 565pb; algunos de estos haplotipos se encontraron en bajas frecuencias y como exclusivos de ciertas zonas de agregación. Los tipos A+, A-, E1 y F2 fueron los más comunes como se había descrito con la técnica RFLP. Esta autora concluyó que existe diferenciación entre el Archipiélago de Revillagigedo y la Bahía de Banderas así como diferencias anuales en ambas regiones. Sin embargo a partir de una partición arbitraria de sus datos en dos mitades una primera que comprende los meses de enero y febrero; y una segunda que comprende marzo y abril, González Peral (2011) no encontró ninguna diferenciación dentro de las temporadas invernales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se piensa que la migración de las ballenas jorobadas se da por etapas, con animales de diferente sexo y estado reproductivo llegando y partiendo de los destinos migratorios en tiempos diferentes. Las hembras que están lactando son las primeras en abandonar las áreas de alimentación, seguidas de los animales inmaduros, machos maduros y el resto de las hembras (que no están lactando ni preñadas). Durante el invierno el orden es inverso con las nuevas hembras preñadas como las primeras en la migración de retorno a altas latitudes. (Clapham, 2000). Se ha observado que las ballenas utilizan algunas áreas de reproducción como zonas de tránsito pudiendo permanecer en ellas por periodos largos o cortos y otras presentan movimientos entre regiones de reproducción (Baker *et al.*, 1986; Calambokidis *et al.*, 2008; Lagerquist, 2008; Urbán *et al.*, 2000). Se ha demostrado que aunque los *stocks* utilizan áreas de alimentación muy específicas, pueden mezclarse en las zonas de reproducción. Sin embargo, aún mezclándose en zonas de reproducción, los *stocks* presentan divergencias en la variación del mtDNA. Se cree que este fenómeno está influenciado por la fidelidad que presentan las hembras a destinos migratorios y que presumiblemente aprenden las crías durante su primer año de vida. De esta manera, la estructura genética de las poblaciones es un reflejo de su estructura migratoria (Baker *et al.*, 1990). Estudios de variación genética sobre la heterogeneidad estacional de la población de ballenas jorobadas en nuestro país, algunos mediante el análisis del mtDNA (Medrano-González *et al.*, 1995; Robles-Saavedra, en elaboración, González-Peral, 2011) y otros que exploraron la variación a nivel nuclear (Vázquez-Cuevas, 2007), enfrentan el problema de tener muestras de tejido con tamaños poco representativos para distinguir la variación regional y estacional. En este trabajo planteamos realizar una exploración de la variación en la estructura migratoria de la ballena jorobada en el Pacífico mexicano con base en el análisis del mtDNA con una muestra más adecuada que incluye una muestra amplia de los *stocks* continental y de Revillagigedo, con réplicas temporales de dos ciclos reproductivos (inviernos 2004 y 2005) y con una partición estacional de los datos determinada por el patrón de muestreo y no por una decisión arbitraria.

4. HIPOTESIS

Las ballenas jorobadas en el Pacífico mexicano tienen una estructura genética regional y estacional asociada con una conducta filopátrica y con diferencias en la temporalidad migratoria que deriva de las diferentes zonas de alimentación de donde provienen estos animales. Es posible observar esta temporalidad migratoria mediante el registro de la composición de linajes maternos.

5. OBJETIVOS

5.1 General

- Analizar la variación genética mitocondrial de la ballena jorobada regional y temporalmente para determinar la estructura migratoria de esta especie en el Pacífico mexicano.

5.2 Particulares

- Identificar la composición haplotípica y la filogenia intraespecífica del DNA mitocondrial de las ballenas jorobadas en el Pacífico mexicano.
- Examinar la diversidad y la diferenciación genética mitocondrial de la ballena jorobada a lo largo del invierno, durante dos años en dos regiones de agregación del Pacífico mexicano.

6. METODOLOGÍA

6.1 Muestras analizadas

Un total de 418 muestras de piel de ballenas jorobadas se colectaron en la Bahía de Banderas y la Isla Socorro, México (Figura 2) entre los meses de noviembre y abril de los inviernos 2003-2004 y 2004-2005 (a los que respectivamente se denominarán como invierno 2004 e invierno 2005; (Cuadro 1). La obtención de estos tejidos se hizo a bordo de embarcaciones con motor fuera de borda por personal del Grupo de Mastozoología Marina de la Facultad de Ciencias UNAM como parte del proyecto SPLASH (Structure Population, Levels of Abundance and Status of Humpbacks; Calambokidis *et al.*, 2008). Las muestras se colectaron utilizando ballestas con flechas modificadas que penetran en la piel del animal y cuya potencia oscila entre los 23 y 60 Kg de empuje (Medrano-González, 1993). En algunos casos, se colectó la piel descamada de las ballenas al realizar saltos o golpear el agua con sus aletas (Clapham *et al.*, 1993). Se verificó mediante fotoidentificación que no existiera re muestreo, las muestras fueron debidamente etiquetadas y colocadas en etanol de grado molecular 70% para su conservación y posteriormente se almacenaron a -80 °C.

Cuadro 1. Número de muestras por sitio y por año.

Año	Bahía de Banderas	Isla Socorro	Total
2004	73	132	205
2005	115	98	213
Total	188	230	418

6.2 Extracción de DNA

El DNA se extrajo mediante el método descrito por Baker *et al.*, (1991). Lisis celular con Tris 10 mMol/L pH=7.4, NaCl 10 mMol/L, EDTA 25 mMol/L), SDS (dodecil, sulfato de sodio) al 10% y de Proteinasa K (20 mg/mL) incubado a 55°C por tres horas. Las extracciones con fenol equilibrado, cloroformo, alcohol isoamílico (24:24:1); cloroformo, alcohol isoamílico (24:1); las precipitaciones con acetato de amonio (7.5 mol/L), etanol 95% y etanol al 70% y resuspendidos en Tris 5 mMol/L pH=8.0, EDTA 0.05 mMol (Figura 3, Anexo 1).

6.3 PCR

Se amplificó mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) un fragmento de 531 pb de la región control del mtDNA usando los primers tPro-whale ó Dlp1.5 (5'-TCACCCAAAGCT GRARTTCTA-3') y Dlp5 (5'- CCATCGWGATGTCTTATT TAAGRGGAA-3'). Se utilizó el protocolo adaptado de Palumbi (1991) (Anexo 2), (94°C/120'', 1x) (92°C/30'', 55°C/30'', 72°C/25'', 36x) (72°C/420'', 1x) para una reacción de 30µl. Los fragmentos fueron visualizados en geles de agarosa 1.6% teñidos por bromuro de etidio e iluminados con luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989), (Figura 4). Para las muestras de las que se extrajo DNA de menor calidad, se sustituyó la *Taq* polimerasa por PFU polimerasa la cual tiene mayor fidelidad en la síntesis. Algunos productos de PCR fueron sometidos a una limpieza posterior para mejorar su calidad, en este caso se corrió el producto de PCR en geles de agarosa de bajo punto de fusión, se incubó a 20°C con 1/10 de acetato de sodio 3 M más 2.5 volúmenes de EtOH absoluto durante 10 minutos. Se centrifugó, se extrajo el sobrenadante y se le hicieron lavados con EtOH al 70%. El producto finalmente fue resuspendido en 10 µL de H₂O.

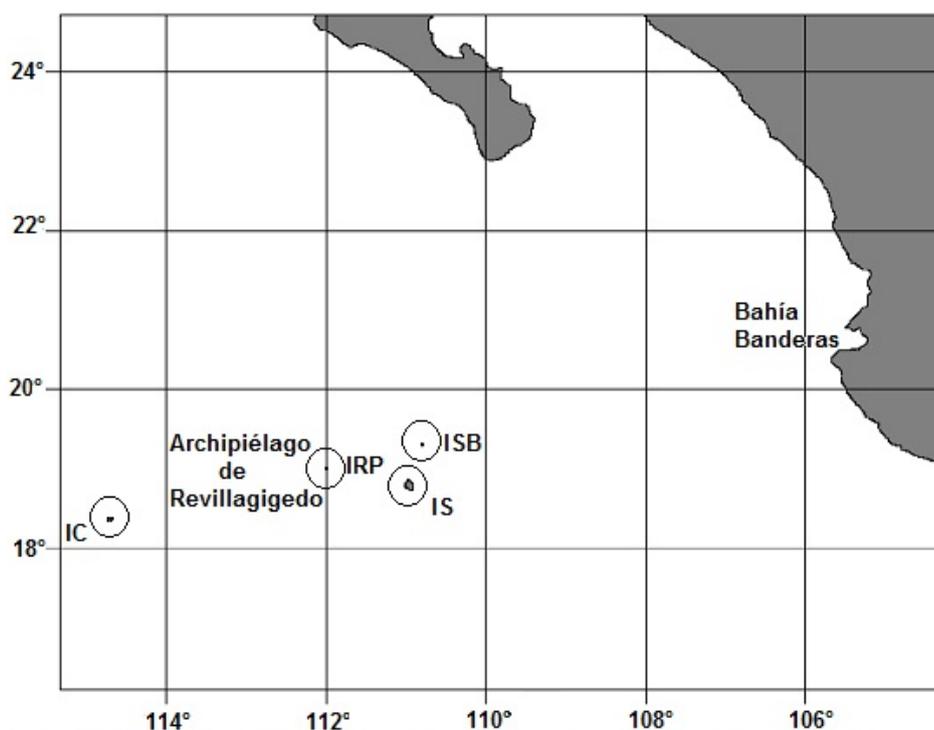


Figura 2. Localización de las zonas de estudio. La primera, la Bahía de Banderas ubicada entre Nayarit y Jalisco y la Segunda Isla Socorro (IS) que es parte del Archipiélago de Revillagigedo del cual también forman parte Isla Clarión (IC), Isla Roca partida (IRP) e Isla San Benedicto (ISB).

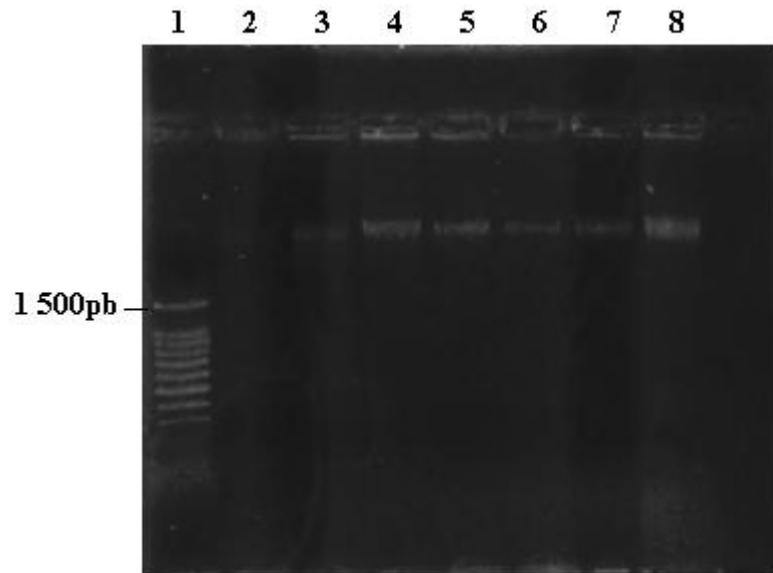


Figura 3. Extracciones de DNA de piel de ballena jorobada. Carril 1 marcador, carriles 2-8 extracciones DNA ballenas jorobadas 2004,

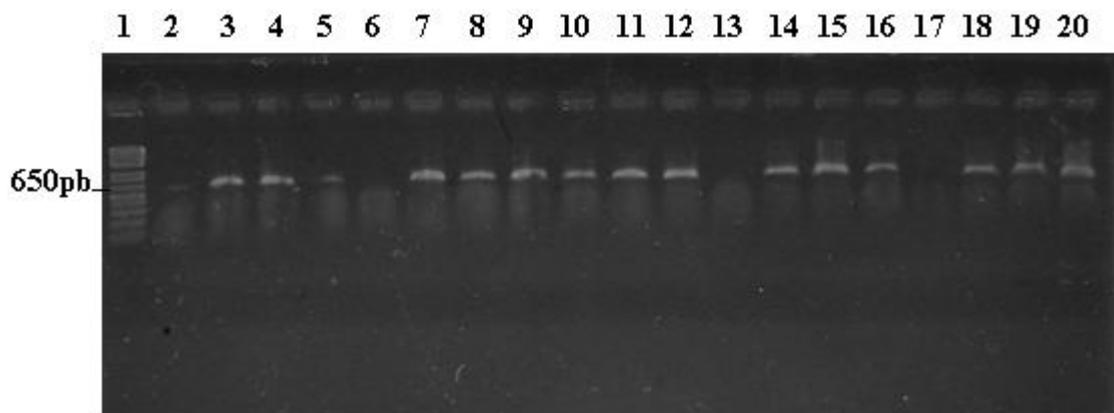


Figura 4. Amplificaciones de aproximadamente 531 pb con los primers Dlp 5 y Dlp 1.5 mtDNA. Carril 1 marcador 1 Kb plus, carriles 2-20 muestras correspondientes a ballenas jorobadas del Pacífico mexicano del año 2005.

6.4 RFLP

Siguiendo el procedimiento de Baker *et al.*, (1998), el producto amplificado de mtDNA fue digerido con las enzimas de restricción *Nco*I (C'CATG_G), *Dra*I (TTT'AAA), *Sau*96I (G'GnC_C). El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante; para una reacción de 17µL se utilizó buffer 1x (2.5mL) y 2 unidades de enzima para 7 µL de producto de PCR.

Se realizó una incubación a 37° C durante toda la noche. A continuación se corrieron 17 µL de la reacción en geles de agarosa al 2% para visualizar los fragmentos.

Los fragmentos de restricción obtenidos para cada enzima fueron separados y visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2.0%, teñidos por bromuro de etidio e iluminados con luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989). Se hizo un registro fotográfico para la documentación de los linajes mitocondriales identificados (Figura 5, Figura 6 y Figura 7).

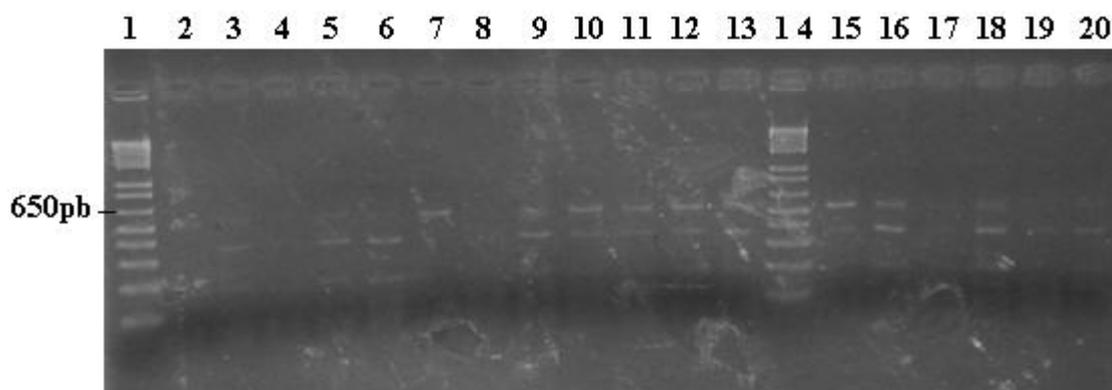


Figura 5. Digestiones con la enzima *NcoI*. Carril 1 marcador 1 Kb plus, carriles 2-20 muestras del año 2005. La presencia de dos bandas indica un sitio de corte para esta enzima.

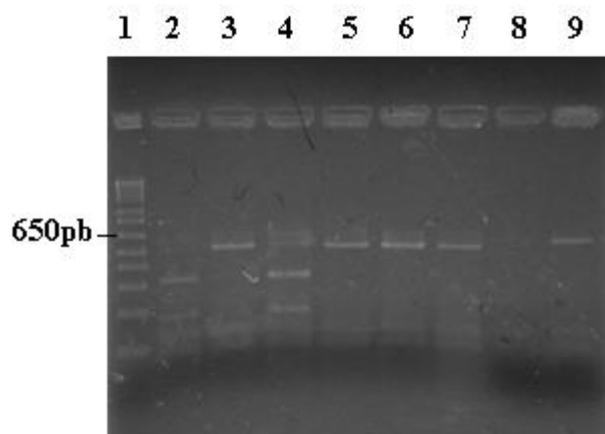


Figura 6. Digestiones con la enzima *DraI*. Carril 1, marcador 1 Kb plus, carriles 2 – 6, muestras del año 2005. Carril 9, producto de PCR sin digerir. La presencia de dos bandas indica que existe un sitio de corte para esta enzima.

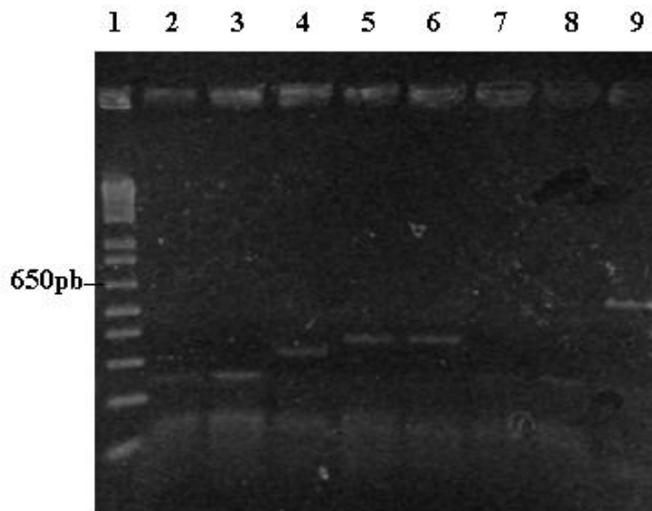


Figura 7. Digestiones con la enzima *Sau96I*. Carril 1, marcador 1 Kb plus, carriles 2-7 digestiones de producto de PCR correspondientes al año 2005, carril 8 producto de PCR sin digerir. Se muestran las tres posibles combinaciones de cortes. Carril 1, 2 (abc), carril 3, (bc) carril 4, 5 (ac).

6.5 Secuenciación

Una muestra representativa (N = 36) de los diferentes haplotipos identificados mediante la técnica de RFLP fue enviada a secuenciar para robustecer la información obtenida previamente. Para ello se amplificó el mismo fragmento de la región control utilizado para identificar los sitios de restricción, de 531 pb delimitados por los primers Dlp1 y Dlp1.5 con las técnicas previamente descritas, se verificó la calidad del producto obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa de 1.6%, el producto de PCR fue purificado y secuenciado en un secuenciador 3100 de 16 capilares marca Applied Biosystems. Los electroferogramas fueron revisados visualmente para verificar su calidad, se obtuvo un total de 36 secuencias de 426 pb que fueron comparadas con las de Baker y Medrano-González (2002) y las de González Peral (2011).

6.6 Determinación de los linajes mitocondriales

La determinación de los linajes mitocondriales se llevó a cabo mediante el método de RFLP y posteriormente se validó mediante la secuenciación de algunas muestras representativas de cada uno de los haplotipos. Para la determinación de los haplotipos mediante la técnica de RFLP se hizo un registro fotográfico digital de cerca de 131 geles.

Se calcularon regresiones exponenciales para el recorrido del marcador molecular de cada uno de los geles. Las regresiones fueron hechas en el programa SIGMAPLOT 6. Los coeficientes obtenidos fueron utilizados para inferir el peso molecular de los productos de RFLP. Una vez obtenido el valor de cada uno de los fragmentos digeridos fue posible asociarlos con uno o varios sitios específicos de corte. Algunos geles por la naturaleza de la agarosa y las condiciones del método de electroforesis no corren de manera uniforme. Para estos casos, la determinación se realizó teniendo como referencia una muestra secuenciada y tipificada dentro del gel o por la relación de las proporciones que guardan los fragmentos digeridos entre sí.

Una vez determinados los patrones de corte enzimático del total de las muestras por el método de RFLP, los resultados se contrastaron con mapas de los sitios de corte de restricción generados en el programa BioEdit (Hall, 1999) a partir de secuencias de referencia y de las obtenidas en el presente trabajo. De esta manera validamos con el método de secuenciación la existencia de los haplotipos previamente identificados mediante el método de RFLP. Con esta información se generó un cuadro con el total de haplotipos identificados con este fragmento para el Pacífico mexicano, con sus sitios variables y sus respectivos sitios de corte para las enzimas de restricción.

Finalmente las secuencias obtenidas fueron alineadas en el programa BioEdit (Hall, 1999) y comparadas con secuencias previamente tipificadas. (Baker y Medrano-González, 2002; González-Peral, 2011). Se identificaron las secuencias redundantes en el programa MacClade (Maddison y Maddison, 2001) y posteriormente se llevó a cabo una reconstrucción filogenética por el método bayesiano haciendo una búsqueda con el programa MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Ronquist y Huelsenbeck, 2003) utilizando el modelo GTR+G y una temperatura de 0.5 con 10 000 000 simulaciones de las que se retiraron el primer 10%.

6.7 Análisis de datos

Para realizar el análisis de la estructura estacional se identificaron agrupaciones a lo largo del invierno las cuales congregan muestras de acuerdo a la fecha de muestreo. Esta división se llevó a cabo bajo tres criterios: similar número de muestras, separación temporal entre las agrupaciones y comparabilidad entre los grupos.

Una vez tipificadas todas las muestras e identificadas las diferentes agrupaciones regionales, anuales y estacionales, se llevaron a cabo análisis de diferenciación y diversidad genética en el programa *Arlequín* (Excoffier y Schneider 2005).

Se calcularon los índices de diversidad haplotípica h y π . El índice de diversidad haplotípica h (Nei, 1987) se define como la probabilidad de que dos haplotipos elegidos aleatoriamente sean distintos:

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

donde n es el número de copias del gen en la muestra, k es el número de haplotipos, y p_i es la frecuencia de la muestra del haplotipo i -ésimo.

El valor de diversidad nucleotídica π por su parte se define como la probabilidad de que dos sitios homólogos (*loci* L) elegidos aleatoriamente (nucleótido o fragmentos de restricción) sean diferentes. Se calcula bajo los supuestos de que no hay recombinación y hay neutralidad. Esta medida se define como la heterocigosidad media por sitio de RFLP (Tajima, 1983; Nei, 1987).

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j d_{ij}}{L}$$

donde d_{ij} es la distancia entre los haplotipos i y j . Se calcularon los estimadores de diversidad genética θ_s , θ_k , θ_h y θ_π . Estos estimadores utilizan el parámetro $\theta = 2M\mu$ del modelo de sitios infinitos donde M es igual a $2N$ para las poblaciones diploides de tamaño n , o igual a N para las poblaciones haploides, y μ es la tasa de mutación total en el nivel de haplotípico.

θ_h se calcula a partir de la relación de la homocigosis esperada en una población en equilibrio entre la deriva y la mutación (Ohta y Kimura, 1973) como sigue:

$$h = \frac{1}{\theta + 1}$$

θ_k se estima a partir del número de alelos observados; utiliza la relación del equilibrio de alelos infinitos (Ewens, 1972) entre el número esperado de alelos (k) en donde el tamaño de la muestra es (n):

$$E k = \theta \sum_{i=0}^{n-1} \frac{1}{\theta + 1}$$

θ_s se estima a partir de la relación del equilibrio de sitios infinitos (Watterson, 1975) entre el número de sitios segregantes (S), el tamaño de la muestra (n) y θ para una muestra de DNA no recombinante.

$$\theta = \frac{S}{a_1}$$

donde:

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$$

θ_π se estima a partir de la relación del equilibrio de sitios infinitos entre el número medio de diferencias pareadas (π) y theta (θ) (Tajima, 1983).

$$E \pi = \theta$$

Finalmente se calcularon dos pruebas de neutralidad. La prueba de Tajima se basa en el modelo de sitios infinitos no recombinantes, apropiado para secuencias cortas de DNA o haplotipos RFLP. Esta prueba compara los estimados de θ_π y θ_s . La estadística de prueba D se define como:

$$D = \frac{\theta_\pi - \theta_s}{\text{Var}(\theta_\pi - \theta_s)}$$

donde $\theta_\pi = \pi$ y, $\theta_s = \frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}}$ y S es el número de sitios segregantes en la muestra. (Tajima, 1993; Aris-Brosou y Excoffier, 1996; Tajima 1996).

Finalmente se analizó la homocigosis utilizando la prueba de Ewens-Watterson-Slatkin (1978, 1986), el cual es una prueba que se utiliza como una estadístico F basado en la teoría de muestreo de los alelos neutros Ewens (1972). Watterson (1978) demostró que la distribución de las frecuencias haplotípicas bajo selección neutral puede resumirse como la suma de la frecuencia de los haplotipos, equivalente a la homocigosis esperada para organismos diploides. Esta prueba puede resumirse como la distribución de la frecuencia alélica. La distribución nula de F se genera mediante la simulación de un muestreo aleatorio bajo neutralidad con el mismo

número de genes y el mismo número de haplotipos utilizando el algoritmo de Stewart (1977). La probabilidad de observar muestras aleatorias con valores de F idénticos o menores que la muestra original se graba. Esta prueba está limitada a tamaños de muestra de 2000 genes o menos y 1000 alelos diferentes (haplotipos) o menos. Se puede utilizar para probar la hipótesis de selección neutral y equilibrio poblacional contra la selección balanceadora o la presencia de alelos ventajosos.

Los índices de diferenciación genética entre subpoblaciones F_{st} (diferenciación entre las frecuencias haplotípicas) y ϕ_{st} (diferenciación molecular), se obtuvieron mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA), (Excoffier *et al.*, 1992). En términos de coeficientes de endogamia y tiempos de coalescencia, el índice F_{st} se puede expresar como:

$$F_{st} = \frac{f_0 - f_1}{1 - f_1} = \frac{t_1 - t_0}{t_1}$$

donde f_0 es la probabilidad de que dos genes que provienen de la misma población sean idénticos, f_1 es la probabilidad de que dos genes que provienen de poblaciones diferentes sean idénticos por descendencia. t_1 es el tiempo medio de coalescencia de dos genes que provienen de diferentes poblaciones y t_0 es el tiempo medio de coalescencia de dos genes que provienen de la misma población. Esta prueba se realiza llevando a cabo permutaciones (1000 o más) de los haplotipos entre poblaciones para obtener una distribución nula, por lo tanto no es necesario suponer igualdad de varianza entre las poblaciones. El mismo marco puede extenderse a otros niveles jerárquicos (Reynolds *et al.*, 1983; Slatkin, 1995).

Con las matrices obtenidas de los valores de F_{st} y ϕ_{st} entre conjuntos de región, etapa invernal y año, se generaron dendrogramas por el método de agrupación por promedios ponderados (WPGMA) con el programa STATISTICA 6. Este método fenético utiliza las distancias genéticas y asume que las unidades taxonómicas operativas (OTU) son mutuamente independientes. Las distancias se miden usando frecuencias alélicas, sustitución de nucleótidos etc. Se construye una matriz pareada en donde se comparan las distancias genéticas con un algoritmo de apareamiento entre el grupo i y el grupo j , se eligen las menores distancias y se agrupan, se vuelve a hacer la matriz y nuevamente se eligen los dos grupos con las menores distancias y así sucesivamente.

Finalmente se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP), técnica estadística de tipo exploratorio desarrollada por Pearson a finales del siglo XIX y Hotelling (1933). Este análisis permite identificar mediante una matriz de varianzas y covarianzas los factores que explican la mayor parte de la variación. En este caso se utilizó como herramienta para determinar cuáles son los factores que están determinando la estructura migratoria.

En todos los casos los gráficos para las diferentes pruebas se realizaron con los programas SIGMAPLOT 8, STATISTICA 6 y COLORALI (desarrollado *ad hoc* por Luis Medrano González).

7. RESULTADOS

7.1 Identidad haplotípica y filogenia

Se identificó un total de 12 haplotipos; 11 por secuenciación (A-, A+, A3, A4, E1, E3, E5, E6, E7, F2 y F4) y 1 por método de RFLP (E10), de los 31 descritos en el Pacífico Norte y de los 27 descritos para el Pacífico mexicano (Baker y Medrano-González, 2002; González-Peral, 2011). Se encontró un sitio polimórfico para la enzima de restricción *NcoI*, uno para *DraI* y tres para *Sau96I* con los cuales se pudieron definir 6 haplotipos para todas las muestras: A-, A+, E, E7, E10 y F. La enzima *NcoI* permite distinguir los tipos A y los E de los F. La enzima *DraI* sirve para diferenciar los A de los E y los F los cuales no tienen el sitio de corte para esta enzima y finalmente la enzima *Sau96I* sirve para diferenciar los diferentes subtipos de A, E y F (Figura 8, Cuadro 2).

Cuadro 2. Patrones de corte enzimático para los diferentes haplotipos. Para *NcoI* y *DraI*, 0 = ausencia del sitio de corte, 1= existe el sitio de corte. Para la enzima *Sau96I*, existen tres diferentes sitios de corte, que denominamos a = sitio de corte en la posición 23, b = sitio de corte en la posición 262 y c = sitio de corte en la posición 371.

HAPLOTIPO	<i>NcoI</i>	<i>DraI</i>	<i>Sau96I</i>
A+	1	1	abc
A-	1	1	bc
E	1	0	abc
E7	0	0	abc
E10	1	0	ac
F	0	0	ac

Las relaciones filogenéticas de un total de 58 secuencias de la región control de ballenas jorobadas de todo el Océano Pacífico, incluidas las generadas en este trabajo, fueron obtenidas a partir de una búsqueda por el método bayesiano (Figura 9, Anexo 3), se encontró una clara separación en tres clados AE, CD e IJ anteriormente referidos. El clado CD se encontró representado tanto en el Pacífico Sur como en el Pacífico Norte, mientras que el clado AE solo se encontró en el Pacífico Norte, aunque se sabe que se encuentra presente en menor frecuencia en el Pacífico Sur. El clado IJ se encontró exclusivamente representado en ballenas del Pacífico Sur lo cual es consistente con lo anteriormente reportado (Baker *et al.*, 1993; Medrano-González *et al.*, 2001; Baker y Medrano-González, 2003). En el Pacífico mexicano se encuentran representados dos clados, el AE donde se agrupan los haplotipos A y E, los A característicos de Alaska y los E de California; y el CD donde se encuentran los F provenientes de California (Figura 9).

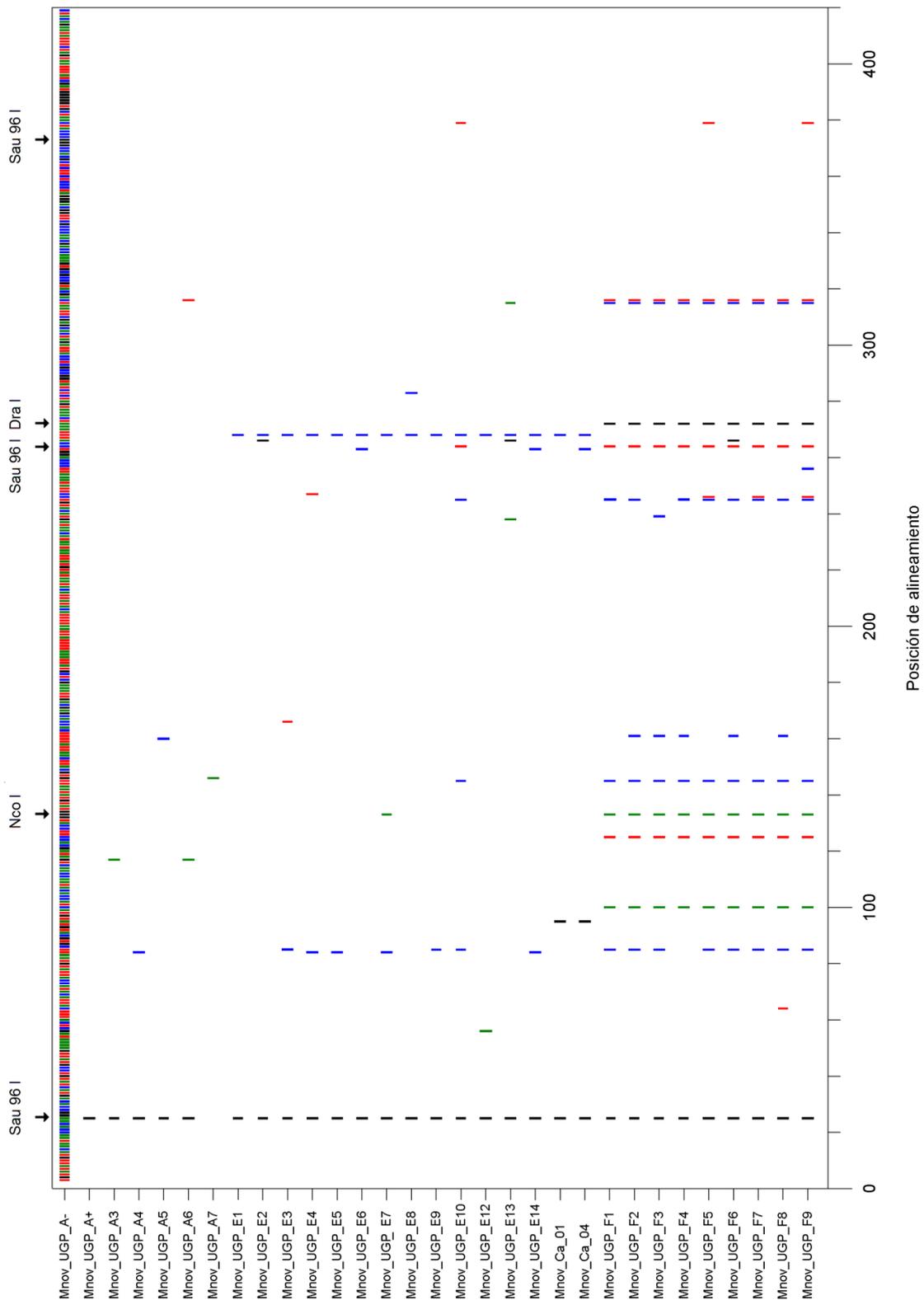


Figura 8. Haplotipos identificados, sitios variables y sitios de restricción. Haplotipos identificados en el Pacífico Norte para la secuencia de un fragmento de 426 pb de la región control de la posición 1278 a la 1703 del mtDNA de las ballenas jorobadas. Cambios en los nucleótidos: adenina (azul), guanina (negro), timina (rojo) y citocina (azul). En la parte superior se muestran los sitios de corte para las enzimas *NcoI*, *DraI* y *Sau96I*.

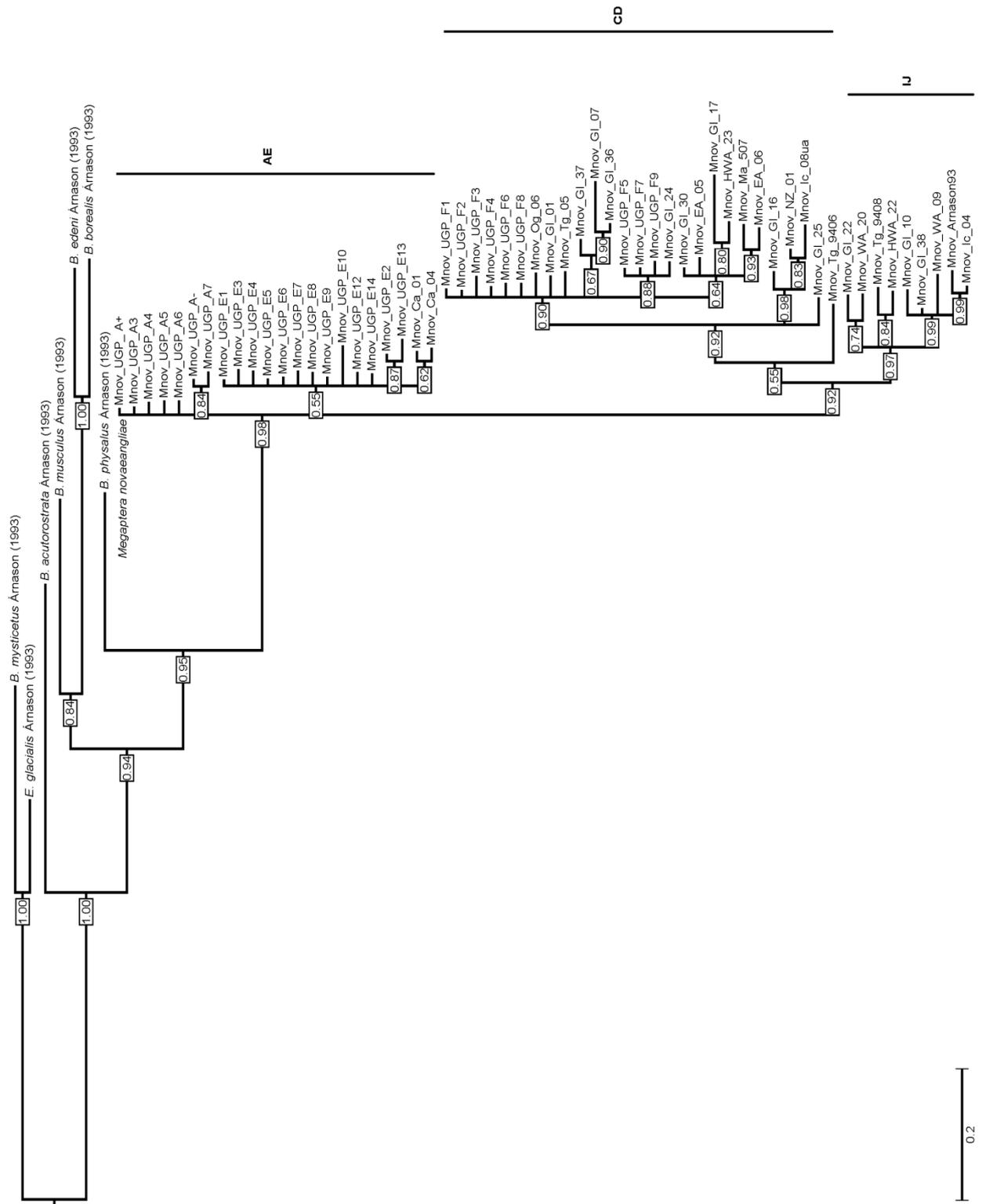


Figura 9. Reconstrucción filogenética de 58 secuencias de la región control del mtDNA de las ballenas jorobadas con sus probabilidades posteriores ver Anexo 3.

7.2 Diversidad y neutralidad

Se realizó la extracción de un total de 418 muestras de ballena jorobada de las cuales de 352 fue posible realizar la amplificación así como su tipificación haplotípica y de 36 de ellas se obtuvo su secuencia. Las muestras que no se lograron identificar presentaron problemas de calidad en la extracción o la amplificación del fragmento deseado, asociado quizá a una posible degradación del tejido (Cuadro 4).

La distribución de las muestras a lo largo de la temporada bajo tres criterios: similar número de muestras, separación temporal entre las agrupaciones y comparabilidad entre los grupo permitió identificar tres etapas invernales generales: invierno temprano = 0, invierno medio = 1 e invierno tardío = 2. El invierno medio para Isla Socorro a su vez fue subdividido en los subgrupos A y B. A partir de esta división se obtuvieron un total 10 grupos naturales para los dos años a lo largo de las temporadas a partir de los cuales se analizó la variación genética (Cuadro 3, Anexo 4 y 5).

Cuadro 4. Número de muestras de las cuales se logró extraer DNA, número de muestras que se logró tipificar y número de muestras enviadas a secuenciar.

Región	Extracción DNA	Amplificación y tipificación	Secuencias
Bahía de Banderas 2004	73	52	5
Bahía de Banderas 2005	115	98	17
Isla Socorro 2004	132	114	11
Isla Socorro 2005	98	88	3
Total	418	352	36

Cuadro 3. Diez agrupaciones naturales identificadas para la Bahía de Banderas (BB03-04 y BB04-05) e Isla Socorro (IS03-04 y IS04-05). Se muestra un resumen de las muestras encontradas cada cuatro días, excepto para los días donde la diferencia entre agrupaciones es muy cercana.

	Día	BB03-04	BB04-05	IS03-04	IS04-05	Total
Invierno Temprano	20-nov		6			6
	25-nov					0
	30-nov					0
	05-dic		8			8
	10-dic		5			5
	15-dic					0
	20-dic					0
	25-dic					0
	30-dic					0
	31-dic					0
	05-ene					0
	10-ene					0
	15-ene					0
A	20-ene		3	1		4
	25-ene		17	2		19
	30-ene	8	8	3		19
	04-feb	1	10	6		17
	09-feb	1	9	7	3	20
	14-feb	2	7	12	6	27
	19-feb		12	9	12	33
	24-feb	8	9	5	13	35
	29-feb	3	2	6	7	18
	05-mar	10	2	2	5	19
B	06-mar	2				2
	07-mar			2	4	6
	08-mar					0
	09-mar			4	3	7
	10-mar			5	2	7
	15-mar	7		11	19	37
	16-mar	1			2	3
	17-mar			3		3
	18-mar			2		2
	23-mar	7		7	1	15
Invierno Tardío	28-mar			2	1	3
	02-abr	2		12	3	17
	07-abr			4	2	6
	12-abr				3	3
	17-abr			9	2	11
	Total	52	98	114	88	352

El mayor número de haplotipos se encontró en la etapa BB05_1 mientras que el menor se encontró en IS05_1B. El valor más alto de diversidad genética (h) se encontró en la etapa BB04_1 mientras que los valores más bajos los tiene IS04_2. La Bahía de Banderas tiene una mayor diversidad haplotípica. De igual manera encontramos una mayor diversidad nucleotídica en la Bahía de Banderas que la encontrada en las etapas invernales de Isla Socorro lo cual se encuentra asociado a una mayor frecuencia en esta zona del haplotipo F (Cuadro 5).

Cuadro 5. Diversidad genética mitocondrial para las etapas invernales de Isla Socorro y la Bahía de Banderas. Se indica el tamaño de muestra (N), número de haplotipos (k), diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π).

Etapa invernal	N	k	h	π
BB04_1	35	5	0.787	0.012
BB04_2	17	5	0.757	0.015
BB05_0	19	5	0.637	0.015
BB05_1	79	6	0.765	0.010
IS04_1A	53	5	0.690	0.004
IS04_1B	22	4	0.645	0.004
IS04_2	39	4	0.539	0.003
IS05_1A	46	4	0.665	0.002
IS05_1B	30	3	0.653	0.002
IS05_2	12	4	0.742	0.006

La Bahía de Banderas presenta valores más elevados para todos los índices de diversidad calculados a partir del estimador θ con respecto a los obtenidos para Isla Socorro (Cuadro 6). La relación entre la diversidad calculada a partir de la homocigosis (θh) y la diversidad alélica (θk) nos muestra que para ambas poblaciones la diversidad alélica es menor que la diversidad calculada a partir de la homocigosis. Los valores de diversidad θh nos separan ambas regiones, los grupos de Isla Socorro se agrupan con los valores más bajos mientras que los grupos de la Bahía de Banderas se agrupan con valores más altos. La única etapa con valores de diversidad alélica (θk) superiores a sus valores de diversidad (θh) es BB05_0 (Figura 10). El análisis de neutralidad de Tajima muestra valores positivos para la Bahía de Banderas mientras que para Isla Socorro arroja resultados negativos (Cuadro 6, Figura 11).

Cuadro 6. Pruebas de neutralidad para las etapas invernales de Isla Socorro y la Bahía de Banderas.

Etapa invernal	θ_h	θ_k	θ_s	θ_π	D Tajima	P Tajima
BB04_1	2.900	1.356	3.400	5.106	1.620	0.960
BB04_2	2.430	2.007	4.141	6.206	1.910	0.983
BB05_0	1.330	1.864	4.292	6.409	1.840	0.986
BB05_1	2.540	1.328	3.036	4.106	1.010	0.846
IS04_1A	1.700	1.155	3.085	1.678	-1.370	0.071
IS04_1B	1.370	1.152	3.566	1.693	-1.860	0.013
IS04_2	0.870	0.905	3.075	1.117	-2.000	0.010
IS05_1A	1.500	0.854	0.910	1.004	0.240	0.641
IS05_1B	1.420	0.612	0.505	0.791	1.160	0.882
IS05_2	2.230	1.672	4.305	2.667	-1.610	0.038

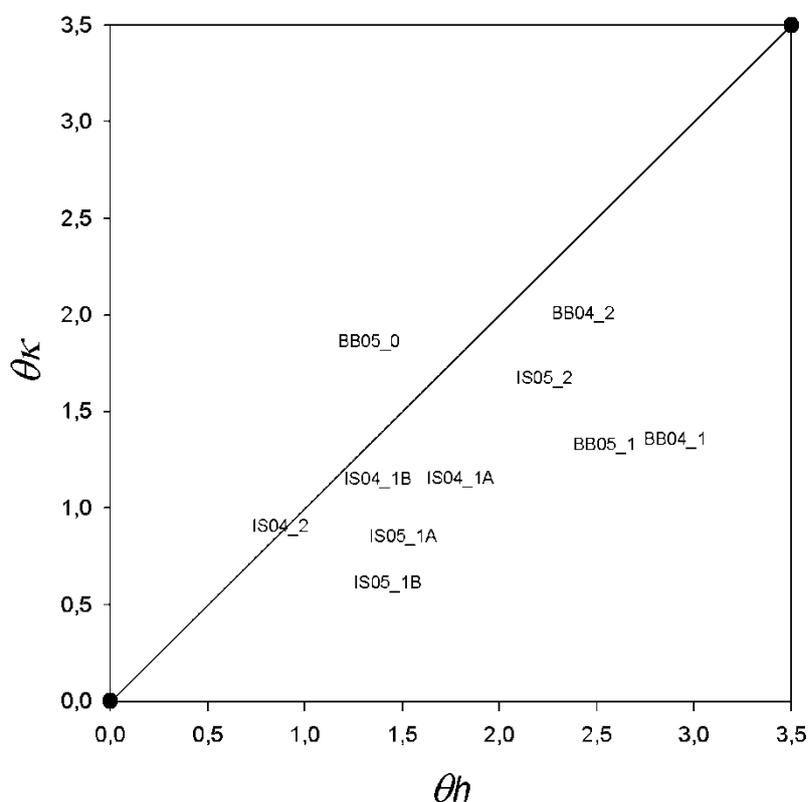


Figura 10. Relación entre los índices θ_k y θ_h para las etapas las diferentes etapas invernales de las ballenas jorobadas en el Pacífico mexicano.

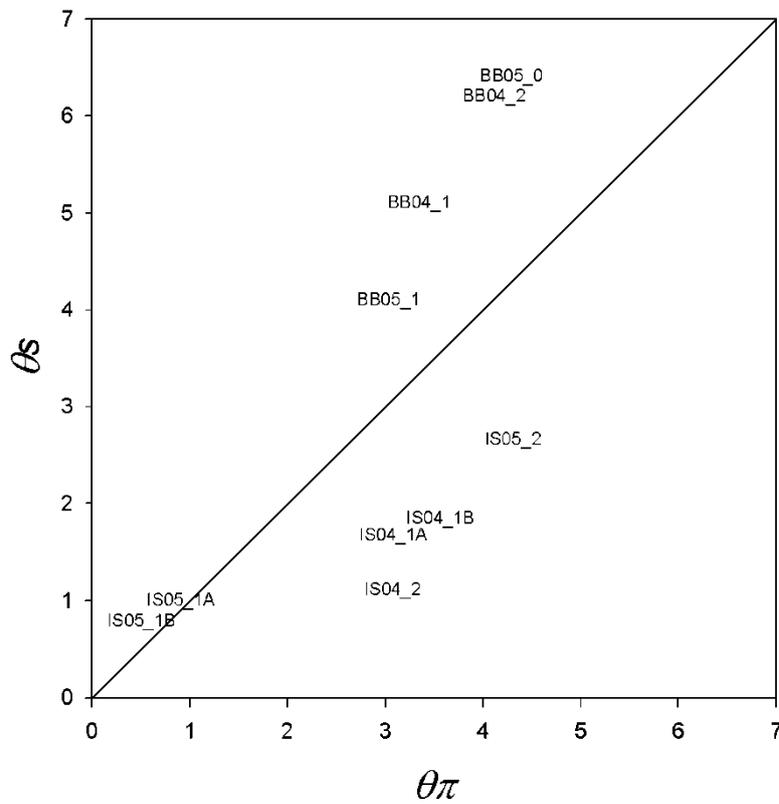


Figura 11. Relación entre los índices θ_s y θ_π para las etapas las diferentes etapas invernales de las ballenas jorobadas en el Pacífico mexicano.

Cuadro 7. Valores de endogamia. Valores de endogamia observados y esperados calculados a partir de la prueba de E-W así como su respectivo valor de probabilidad (P).

Etapa invernal	Fis esp	Fis obs	P E-W
BB04_1	0.407	0.236	0.019
BB04_2	0.341	0.287	0.336
BB05_0	0.350	0.396	0.786
BB05_1	0.406	0.245	0.069
IS04_1 ^a	0.448	0.323	0.209
IS04_1B	0.450	0.384	0.365
IS04_2	0.508	0.475	0.501
IS05_1 ^a	0.512	0.350	0.138
IS05_1B	0.590	0.369	0.047
IS05_2	0.387	0.319	0.295

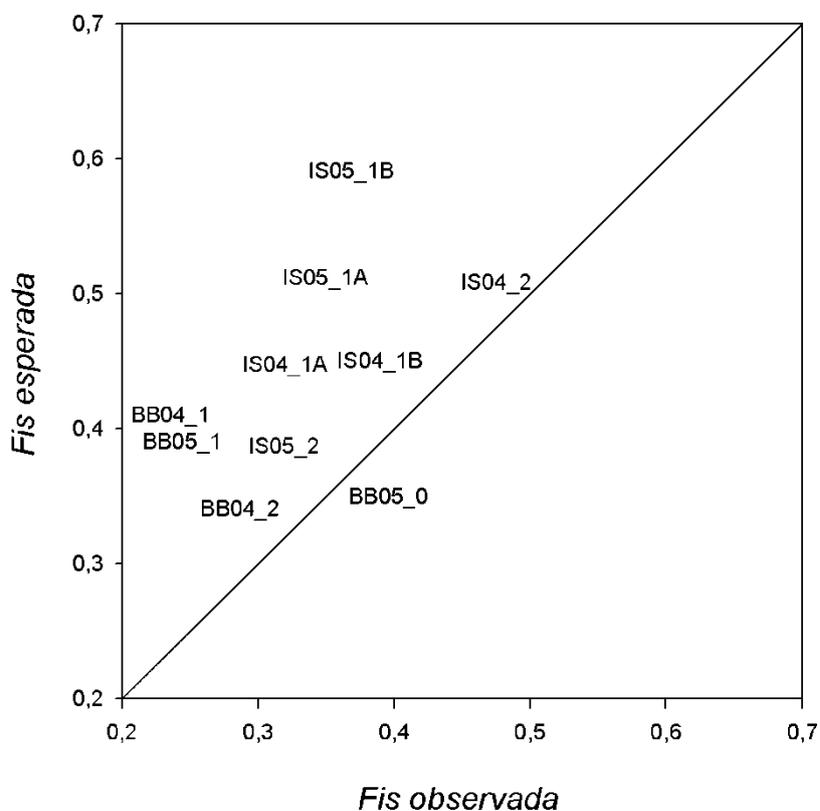


Figura 12. Relación entre la Fis observada y la Fis esperada para las diferentes etapas invernales identificadas.

Para la prueba Ewens-Watterson encontramos la mayor desviación en BB05_0 en donde los valores observados son mayores que los esperados, en el resto de las etapas invernales la relación entre las Fis observadas y las Fis esperadas nos muestra que las Fis esperadas son más altas que lo observado (Cuadro 7 y Figura 12).

7.3 Diferenciación Genética

Con el uso de RFLP fue posible identificar seis diferentes haplotipos de los 27 reportados para el Pacífico mexicano. Los haplotipos más frecuentes son los A+, A- y E, los menos frecuentes E7, E10 y F (Figura 13). Al comparar las frecuencias haplotípicas **entre regiones** encontramos que en Isla Socorro son más abundantes los haplotipos A+ seguidos de los E y A-, estos últimos característicos de Alaska, mientras que en la Bahía de Banderas predominan los E y los F, estos últimos provenientes de California. El haplotipo E10 lo encontramos como exclusivo de la Bahía de Banderas, sin embargo en otros trabajos se ha reportado su presencia en Isla Socorro aunque en frecuencias bajas (González-Peral, 2011); (Figura 13).



Figura 13. Frecuencias haplotípica entre regiones. Composición haplotípica global para la región de Isla Socorro y la región de la Bahía de Banderas.

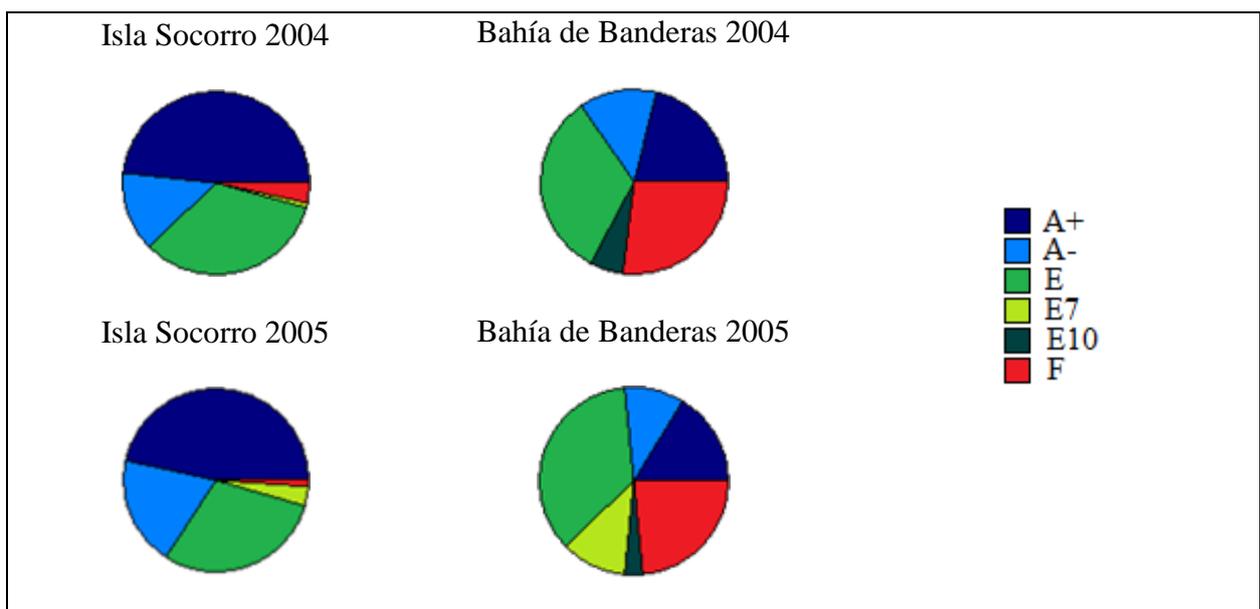


Figura 14. Frecuencias haplotípica entre regiones por año. Composición haplotípica para Isla Socorro y la Bahía de Banderas para los años 2004 y 2005.

Al analizar las frecuencias haplotípicas **para los dos años** las proporciones parecen no tener un cambio significativo, sin embargo la Bahía de Banderas 2004 no muestra la presencia del haplotipo E7 respecto al 2005 y en Isla Socorro su presencia es mínima en 2004 y aumenta en el 2005 (Figura 14).

Al analizar las frecuencias haplotípicas **a lo largo de la temporada en Isla Socorro** para ambos años, vemos que el haplotipo A+ es el dominante, seguido del A- y el E. Para la temporada del 2004 observamos que la frecuencia del haplotipo A+ aumenta conforme

avanza la temporada, mientras que el haplotipo E parece ser más frecuente al inicio, alcanza un pico máximo a la mitad de la temporada y decrece al finalizar la misma (Figura 15). Para el año 2005 sin embargo encontramos que el comportamiento del haplotipo E respecto al anterior es diferente, comienza con una frecuencia baja y crece hasta alcanzar su pico máximo al finalizar la temporada mientras que el haplotipo A+ se comporta de manera inversa (Figura 15).

Si revisamos las frecuencias **a lo largo de la temporada para la Bahía de Banderas** encontramos una marcada dominancia del haplotipo F y E para ambos años. La presencia del haplotipo F varía respecto a ambos años, en el 2004 la abundancia de los F es menor al inicio de la temporada y al avanzar alcanza un pico máximo; por el contrario, en el año 2005 comienza la temporada con una alta frecuencia de este haplotipo y conforme avanza la temporada disminuye (Figura 15).

a) Índices de diferenciación genética

Los valores de F_{st} y ϕ_{st} de las comparaciones pareadas de distintas regiones y etapas invernales muestran valores similares a lo descrito por otros autores (Medrano-González *et al.*, 1995; Robles-Saavedra en elaboración, Baker *et al.*, 1998; González-Peral, 2011). Los valores de diferenciación más altos se encontraron entre las etapas invernales de la Bahía de Banderas con respecto a las de Isla Socorro. BB05_0 (invierno temprano) muestra para ambos estimadores una diferencia significativa respecto al resto de las etapas, lo que puede deberse a la alta frecuencia del haplotipo F en la misma (Cuadro 8 y Cuadro 9).

Se observa una mayor diferenciación entre las comparaciones temporales cuando se estiman a nivel molecular (ϕ_{st}) que cuando se hacen a nivel haplotípico (F_{st}) a excepción de las etapas invernales de Isla Socorro. El contraste de F_{st} y ϕ_{st} hace referencia al tipo de aislamiento poblacional. Se encontraron valores de ϕ_{st} superiores a F_{st} en el caso de la relación entre las muestras de las etapas invernales de la Bahía de Banderas y de estas respecto a las de Isla Socorro. Mientras en el caso de la relación entre etapas de Isla Socorro se encontraron valores de F_{st} superiores a ϕ_{st} (Figura 16).

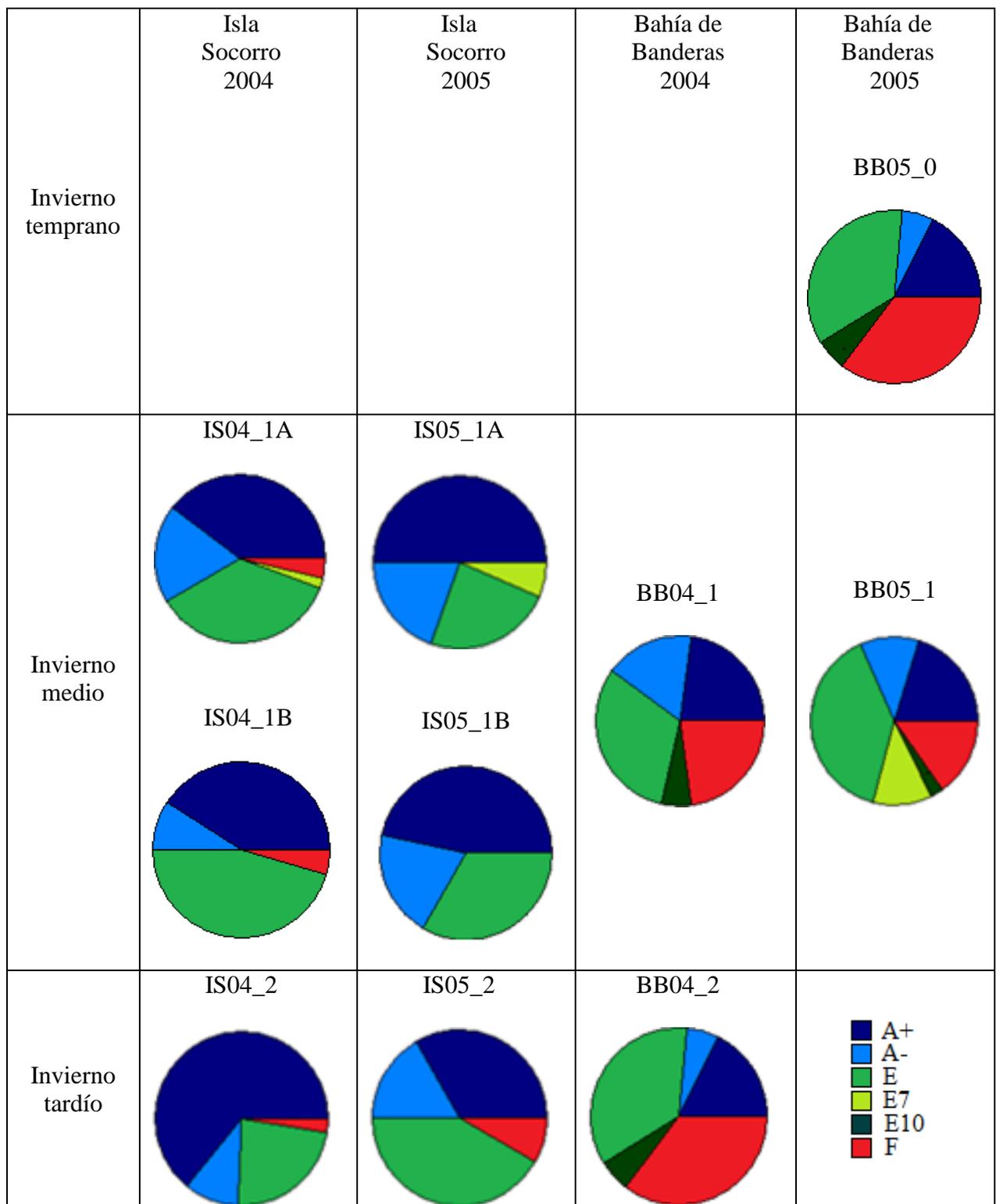


Figura 15. Distribución temporal de las frecuencias haplotípicas para el Pacífico mexicano.

El dendrograma elaborado utilizando las *Fst* muestra una clara separación entre Isla Socorro y la Bahía de Banderas, así también sugiere una estructuración temporal de esta última región. Además separa a BB05_0 como un grupo muy distinto a los demás, mientras que para las ϕst no se muestra una estructuración muy clara (Figura 17).

Cuadro 8. Matriz de índices *Fst*. Variación genética mitocondrial de las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano entre las diversas etapas invernales para los dos años. El signo + indica significancia estadística sobre 0.05.

	BB04_1	BB04_2	BB05_0	BB05_1	IS04_1A	IS04_1B	IS04_2	IS05_1A	IS05_1B	IS05_2
BB04_1	0.000	-	+	-	-	-	+	+	+	-
BB04_2	-0.023	0.000	-	-	+	-	+	+	+	-
BB05_0	0.093	0.026	0.000	+	+	+	+	+	+	+
BB05_1	-0.001	0.003	0.125	0.000	+	-	+	+	+	-
IS04_1 ^a	0.024	0.074	0.250	0.029	0.000	-	-	-	-	-
IS04_1B	0.027	0.062	0.266	0.019	-0.018	0.000	-	-	-	-
IS04_2	0.127	0.195	0.377	0.138	0.043	0.052	0.000	-	-	-
IS05_1A	0.067	0.134	0.300	0.076	0.001	0.021	0.004	0.000	-	-
IS05_1B	0.045	0.109	0.298	0.054	-0.021	-0.015	0.014	-0.017	0.000	-
IS05_2	-0.027	0.006	0.198	-0.023	-0.046	-0.057	0.059	0.000	-0.035	0.000

Cuadro 9. Matriz de índices ϕst . Variación genética mitocondrial de las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano entre las diversas etapas invernales para los dos años. El signo + indica significancia estadística sobre 0.05.

	BB04_1	BB04_2	BB05_0	BB05_1	IS04_1A	IS04_1B	IS04_2	IS05_1A	IS05_1B	IS05_2
BB04_1	0.000	-	+	-	+	-	+	+	+	-
BB04_2	-0.010	0.000	-	-	+	+	+	+	+	-
BB05_0	0.180	0.041	0.000	+	+	+	+	+	+	+
BB05_1	0.008	0.071	0.304	0.000	+	-	+	+	+	-
IS04_1A	0.123	0.297	0.546	0.057	0.000	-	-	-	-	-
IS04_1B	0.082	0.218	0.462	0.028	-0.023	0.000	-	-	-	-
IS04_2	0.144	0.327	0.565	0.085	0.000	0.006	0.000	-	-	-
IS05_1A	0.180	0.380	0.606	0.096	-0.004	0.014	0.001	0.000	-	-
IS05_1B	0.162	0.349	0.575	0.091	-0.012	0.003	-0.002	-0.018	0.000	-
IS05_2	0.014	0.115	0.353	-0.016	-0.040	-0.056	-0.003	0.013	0.006	0.000

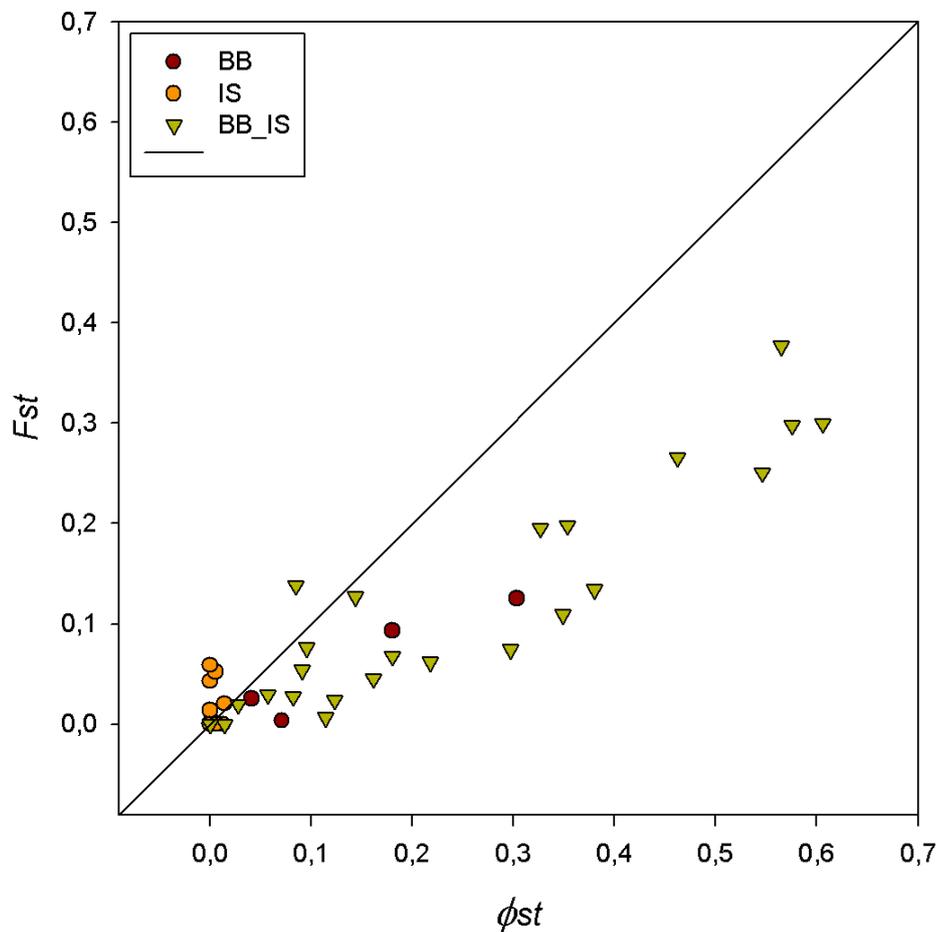


Figura 16. Diferenciación molecular (ϕ_{st}) y por frecuencias de haplotipos (F_{st}) entre las diferentes etapas invernales de las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano. BB = comparación entre etapas de la Bahía de Banderas, IS = comparación entre etapas de Isla Socorro, BB_IS = comparación entre etapas de la Bahía de Banderas e Isla Socorro.

El análisis de la variación **entre regiones** (todas las etapas invernales agrupadas en regiones) mostró una diferencia significativa entre Bahía de Banderas e Isla Socorro con una $F_{st} = 0.032$ ($p = 0.004$) y $\phi_{st} = 0.296$ ($p = 0.014$). No se encontraron diferencias significativas **entre los años** 2004 y el 2005 para ninguna de las dos regiones. El análisis de la variación **entre etapas invernales** (considerando la misma etapa para los dos años) de la Bahía de Banderas mostró **una alta diferenciación** entre etapas $F_{st} = 0.024$, sin embargo no es una diferencia estadísticamente significativa (Cuadro 11). La variación entre las etapas de Isla Socorro no era muy evidente por lo que fue analizada a mayor detalle. Para encontrar las diferencias se formaron tres grupos de comparación; haciendo diferentes combinaciones entre etapas y entre años (Cuadro 10). Solo se encontraron diferencias significativas $F_{st} = 0.012$ ($p = 0.022$) entre etapas con un componente anual y otro estacional (IS_AE) (Cuadro 11).

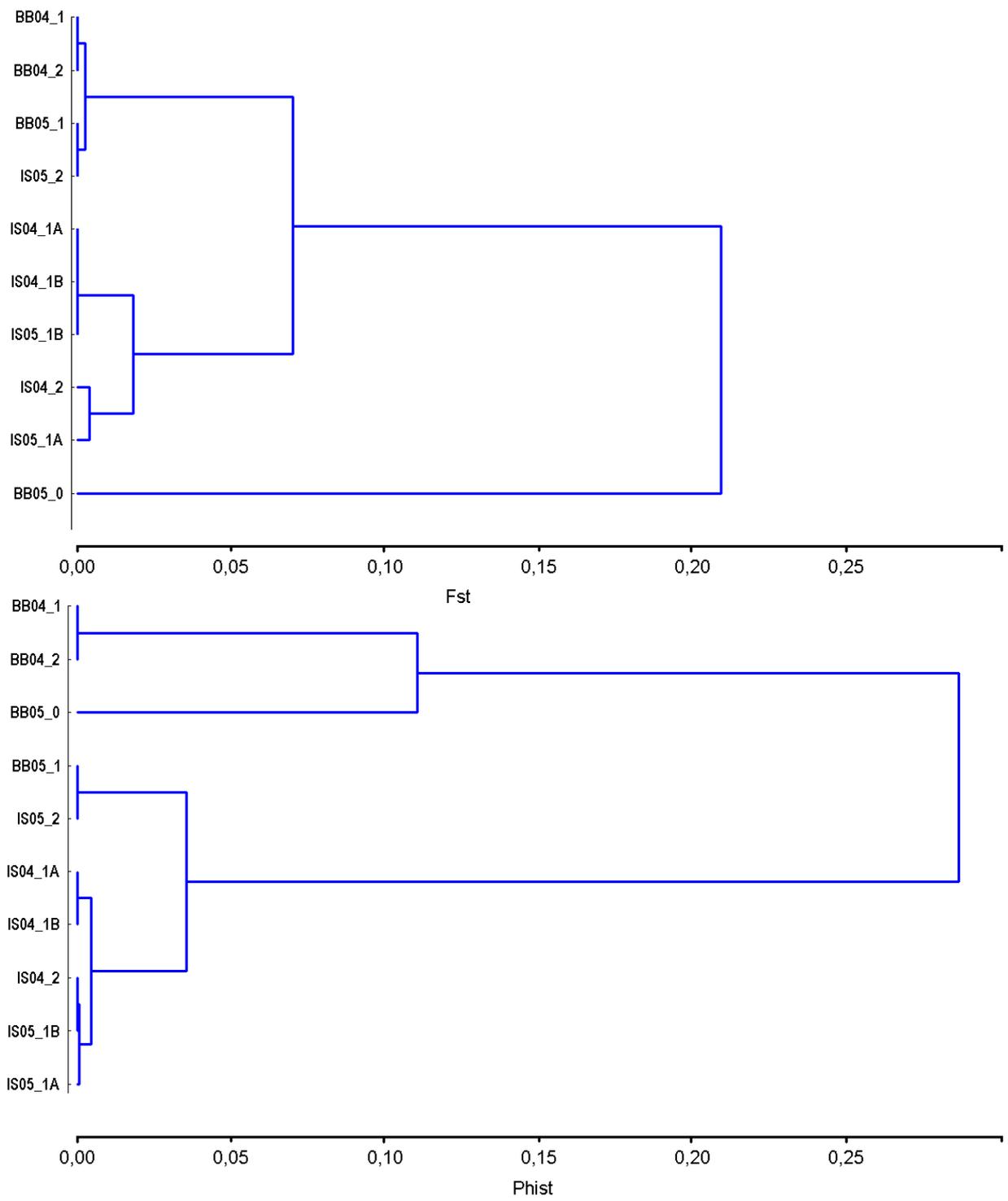


Figura 17. Estructura espacio temporal de la variación genética mitocondrial para los índices F_{st} y ϕ_{st} .

La relación entre los valores de F_{st} y ϕ_{st} como anteriormente se mencionó nos indica el tipo de aislamiento poblacional. Se encontraron valores de ϕ_{st} superiores a F_{st} en el caso de la relación entre la población de Isla Socorro y la Bahía de Banderas así como entre estaciones invernales de esta última. Por otro lado se encontraron valores de F_{st} superiores a ϕ_{st} en el caso de la comparación entre años de la Bahía de Banderas. Finalmente se encontró una relación congruente entre los valores de F_{st} y ϕ_{st} para la población de Isla Socorro (Figura 18).

Cuadro 10. Grupos de comparación formados y sus abreviaturas para analizar la variación en Isla Socorro (ver Cuadro 3, Anexo 4 y 5).

Anual Estacional 1 (IS_AE1)	Anual Estacional 2 (IS_AE2)	Estacional (IS_E)
"IS04_1B"	"IS04_1B"	"IS04_1A"
"IS05_2"	"IS05_2"	"IS05_1A"
"IS04_1A"	"IS04_1A"	"IS04_1B"
"IS05_1B"	"IS05_1B"	"IS05_1B"
"IS04_2"	"IS04_2"	"IS04_2"
	"IS05_1A"	"IS05_2"
"IS05_1A"		

Cuadro 11. Diferenciación molecular (ϕ_{st}) y diferenciación entre haplotipos (F_{st}) así como sus valores de P, comparación entre regiones (BB-IS), entre años (BB04-05; IS04-05) y a lo largo de las temporadas para la Bahía de Banderas (BB_E) y la Isla Socorro (IS_E; IS_AE1; IS_AE2; ver Cuadro 10). En negritas indica significancia estadística sobre 0.05.

	F_{st}	P F_{st}	ϕ_{st}	P ϕ_{st}
BB-IS	0.032	0.004	0.296	0.014
BB04-05	-0.018	1.000	-0.355	1.000
BB_E	0.024	0.352	0.475	0.168
IS04-05	-0.003	0.783	-0.001	0.481
IS_E	-0.001	0.725	-0.003	0.681
IS_AE1	0.012	0.022	0.012	0.076
IS_AE2	0.008	0.072	0.006	0.290

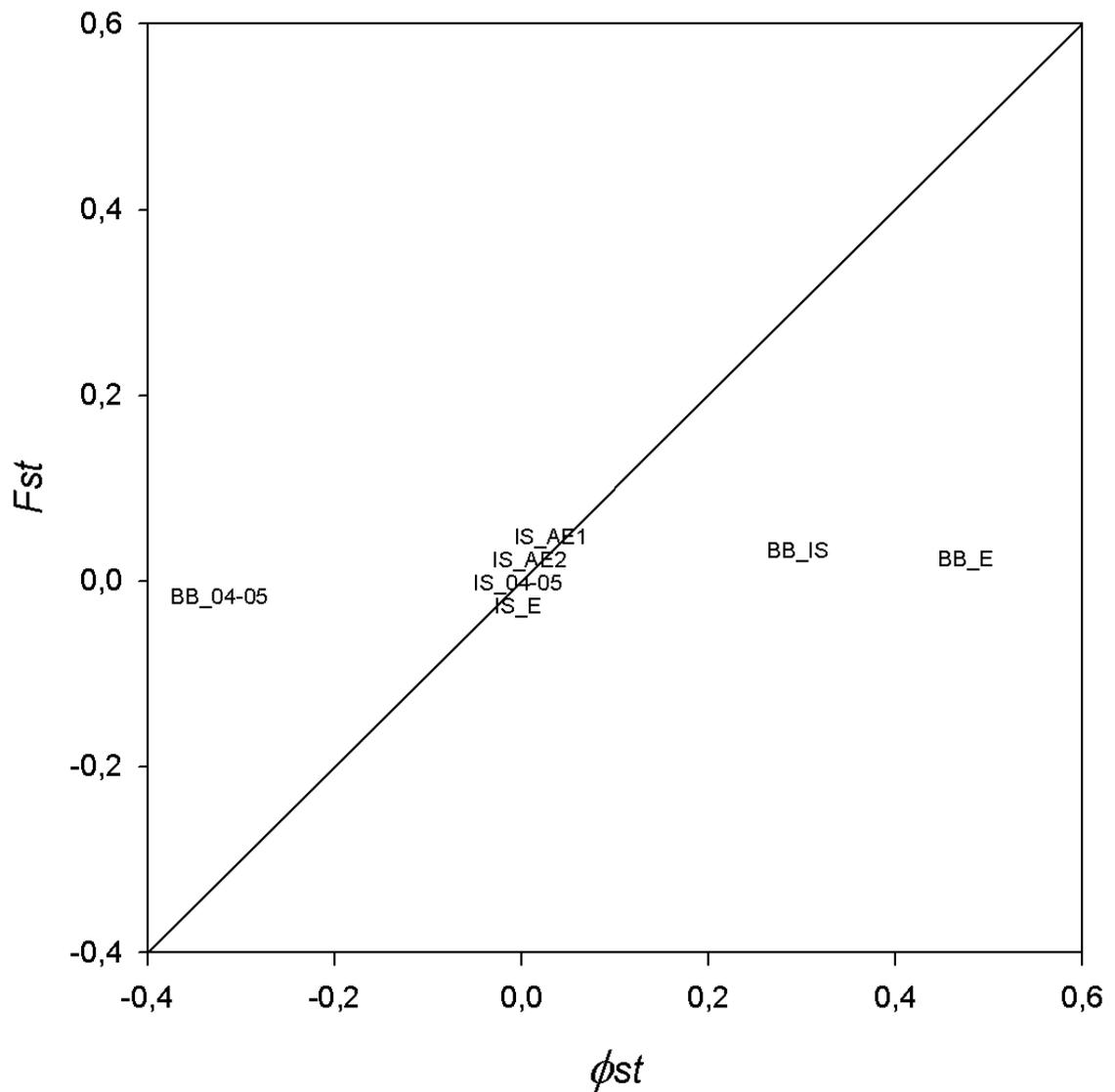


Figura 18. Diferenciación molecular (ϕ_{st}) y por frecuencias de haplotipos (F_{st}) anual (2004-2005), regional (BB = Bahía de Banderas, IS = Isla Socorro) y estacional (entre etapas invernales, para Isla Socorro ver los grupos comparativos Cuadro 10) de las ballenas jorobadas de Pacífico mexicano.

b) Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales para los casos de estudio (etapas invernales) y variables (haplotipos) mostró que el Factor 1 explica el 57.164% de la variación mientras que el factor 2 explica un 18.793%, en conjunto explican un total de 75.957% de la misma (Cuadro 12). En el análisis de casos encontramos que los valores asociados a los grupos de Isla Socorro son los que más contribuyen a la variación, mientras que los de la Bahía de Banderas lo hacen en el sentido contrario, por lo que podemos llamarlo Factor asociado a la

región. Para el análisis de las variables encontramos que los haplotipos A+, A- y E explican la mayor parte de la variación del Factor 1 y 2, es decir son posiblemente los haplotipos que nos separan a los diferentes grupos (Cuadro 13).

Cuadro 12. Eigenvalores y varianza, proporciones relativas y acumuladas. Eigenvalores y varianza para los primeros seis factores del análisis de componentes principales.

Factor	Eigenvalor	% Varianza total	Eingenvvalor acumulado	%Acumulado
1	3.430	57.164	3.430	57.164
2	1.128	18.793	4.557	75.957
3	0.757	12.618	5.314	88.575
4	0.576	9.593	5.890	98.168
5	0.110	1.832	6.000	100.000

Cuadro 13. Contribución de cada variable a los seis principales factores. Se muestra la contribución de cada grupo invernal a los factores del análisis de componentes principales. Para el factor 1 y 2 marcados en negritas los grupos que más contribuyen a dicho factor.

Casos	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
BB04_1	-0.758	0.350	-0.727	-1.437	0.337
BB04_2	-1.959	1.221	-0.970	0.105	0.211
BB05_0	-3.918	-1.033	0.077	0.246	-0.484
BB05_1	-1.006	0.037	1.761	0.341	0.501
IS04_1 ^a	1.314	0.013	0.372	-0.414	-0.233
IS04_1B	0.966	1.493	0.207	1.036	-0.023
IS04_2	1.286	-1.052	-1.335	1.132	0.154
IS05_1 ^a	1.220	-1.794	0.353	-0.224	0.160
IS05_1B	1.752	-0.176	-0.109	-0.539	-0.158
IS05_B	1.103	0.940	0.370	-0.246	-0.465

En el caso de los Factores 1 y 2 para el análisis de los haplotipos muestran una clara distinción entre regiones, se obtuvieron valores positivos para los haplotipos con mayor frecuencia en Isla Socorro y negativos para los haplotipos asociados a la Bahía de Banderas (Cuadro 14).

Se encontró que la separación previa por grupos naturales a lo largo de la temporada invernal muestra una clara variación asociada a un componente regional y a otro haplotípico. Al graficar los Factores 1 y 2 para los diferentes grupos naturales encontramos que hay una marcada separación entre ellos. Se obtuvieron valores positivos en el Factor 1 el cual está asociado a la región, éste presenta para Isla socorro valores positivos y negativos para la Bahía de Banderas. Por otro lado observamos que el Factor 2 está asociado en el caso de la Bahía de Banderas a la estructura estacional. Se obtuvieron valores negativos para el invierno temprano y valores positivos para el invierno tardío (Figura 19).

Cuadro 14. Contribución de cada variable a los seis principales factores. Se muestra la contribución de cada haplotipo a los factores del análisis de componentes principales. Para el Factor 1 y 2 marcados en negritas los haplotipos que más contribuyen a dicho factor.

Variables	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
A+	0.904	-0.236	-0.243	0.235	0.115
A-	0.711	-0.216	0.189	-0.640	-0.037
E	0.287	0.869	0.401	0.034	0.035
E7	-0.545	-0.498	0.656	0.133	0.087
E10	-0.880	0.151	-0.240	-0.299	0.238
F	-0.976	0.021	-0.120	-0.044	-0.173

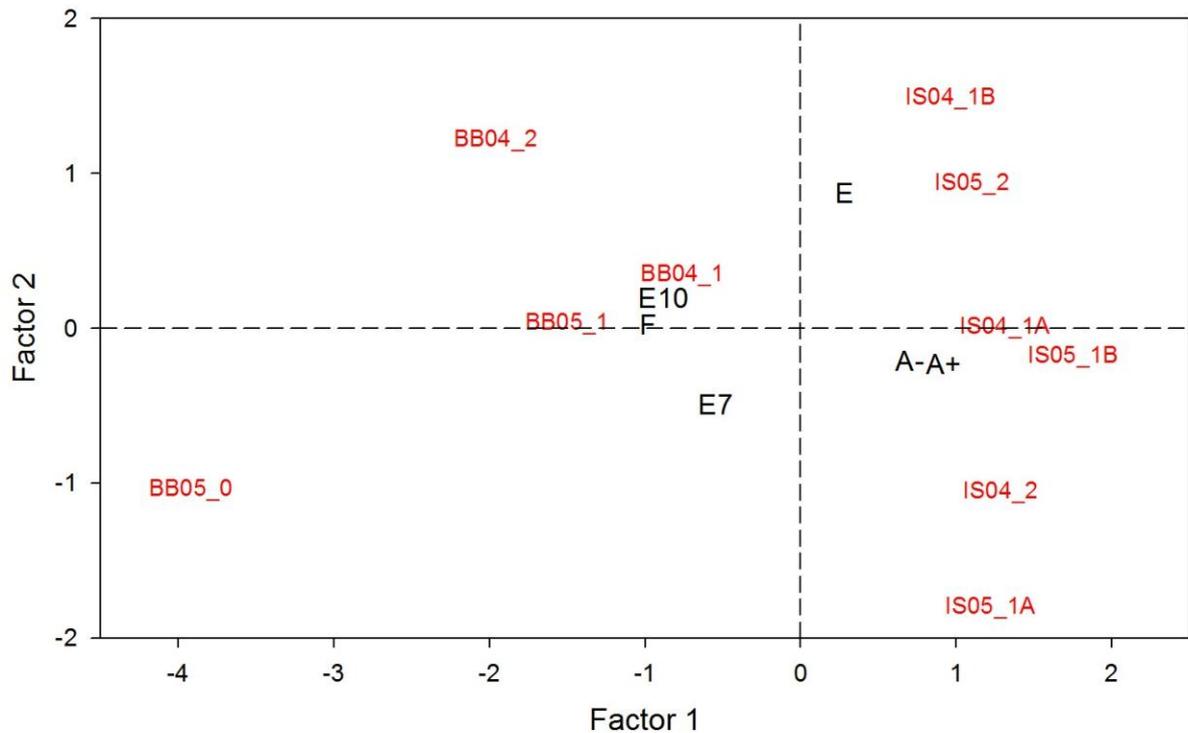


Figura 19. Distribución de los grupos invernales y haplotipos para los dos primeros factores principales. Se observa una clara diferenciación para los grupos preestablecidos: el Factor 1 separa claramente las regiones.

8. DISCUSIÓN

La composición haplotípica de las ballenas jorobadas en el Pacífico mexicano está dominada por los haplotipos A+, A- y E. En la Isla Socorro son más abundantes los haplotipos A+ seguidos de los E y A-, mientras que en la Bahía de Banderas predominan los tipos F y E, composición que parece derivar de las conexiones migratorias con las zonas de alimentación siendo los A aquellos que se alimentan en el Golfo de Alaska en particular entre las Islas Aleutianas y el mar de Bering y con baja frecuencia en California. En cambio, los tipos F y E predominan en la Bahía de Banderas y son característicos de los grupos que se alimentan en California (Baker *et al.*, 1990; 1993). El haplotipo E10 que se encontró como exclusivo de la Bahía de Banderas solo se ha registrado en grupos de alimentación de California y Oregón (González Peral, 2011).

Respecto a análisis anteriores, encontramos que existen en Isla Socorro, discrepancias notorias como resultado del aumento en la frecuencia del haplotipo A con respecto a la primera mitad de la década 1990 en la que predominaban los haplotipos E. Este cambio puede estar asociado a un crecimiento poblacional de los grupos de alimentación que provienen de Alaska debido a la expansión de sus zonas de alimentación a causa del calentamiento global (Calambokidis *et al.*, 2008; Medrano-González *et al.*, 1995).

Anteriormente, la presencia del haplogrupo E en la Isla Socorro sugería que provenía de sitios de alimentación no descritos ya que presenta una divergencia nucleotídica del 0.018% respecto al mismo haplogrupo presente en la Bahía de Banderas calculada en 9000 años por Medrano-González *et al.* (2001) (Calambokidis, 2001; Medrano-González *et al.*, 1995). Datos del proyecto SPLASH (Baker *et al.* 2008; González Peral, 2011) han encontrado los haplotipos E de la Isla Socorro en *stocks* de alimentación del Oeste del Golfo de Alaska, Mar de Bering y el Norte del Golfo de Alaska lo cual es consistente con la teoría de que el *stock* de Revillagigedo al que pertenece la Isla Socorro y el *stock* Costero o Continental al que pertenece la Bahía de Banderas son grupos poblacionales distintos.

Las relaciones filogenéticas del mtDNA de las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano parecen reflejar los patrones de diferenciación y los eventos históricos de flujo génico previamente descritos y también concuerdan con la descripción previa de la división de los *stocks* y su conexión migratoria con los grupos de reproducción invernales. Se cree que durante los periodos interglaciales las ballenas jorobadas se dispersaron y diferenciaron al buscar nuevas zonas de alimentación y reproducción. Se ha propuesto la hipótesis que de este proceso surgieron las poblaciones que migran de Alaska a Hawai y a las Islas Revillagigedo mientras que durante las glaciaciones, las zonas polares se expanden y se reducen las zonas de alimentación provocando un aumento del flujo génico entre las poblaciones; algunas de las ballenas incluso pueden llegar a cambiar de hemisferio (Medrano-González *et al.*, 1995, 2001; Baker *et al.*, 1990, 1993; Baker y Medrano- González, 2002).

Los clados AE y el CD encontrados en el Pacífico mexicano se han encontrado en otros océanos sin embargo su patrón de distribución local parece ser consistente con las hipótesis de expansión y diferenciación de las ballenas jorobadas después de las glaciaciones. El clado AE es el más abundante en el Pacífico Norte y muestra una clina decreciente en el subtipo A, se encuentra fijado en las zonas de alimentación de Alaska y en bajas frecuencias en California

mientras que el clado CD, que parece provenir del Pacífico Sur, se encuentra en una alta frecuencia en los grupos invernales de México, grupos que se alimentan en California. Lo anterior es consistente con la evidencia de un flujo génico como resultado de al menos dos periodos de mezcla de las poblaciones del Pacífico Norte y Sur relacionados con las glaciaciones (Medrano-González *et al.*, 1995, 2001; Baker *et al.*, 1990, 1993; Baker y Medrano- González, 2002).

Dentro de la estructura genética poblacional observamos que en general, la Bahía de Banderas presenta valores más elevados en las comparaciones temporales para todos los índices de diversidad genética con respecto a las de Isla Socorro. Las estimaciones de diversidad nucleotídica y haplotípica son consistentes con las reportadas para la Isla Socorro $\pi = 1.17\% \pm 0.69$, $h = 0.538 \pm 0.098$ y para la Bahía de Banderas $\pi = 1.46\% \pm 0.84$, $h = 0.805 \pm 0.053$ (Baker *et al.*, 1993; Baker y Medrano-González, 2002).

La baja diversidad encontrada en los *stocks* del Pacífico Norte puede ser producto del surgimiento de nuevos linajes mitocondriales posteriores a la glaciación, un remanente de una reciente colonización de los grupos de alimentación debido el efecto fundador o producto de la intensa caza comercial durante cerca de 200 años (Hoelzel y Dover, 1991; Baker *et al.*, 1993; Baker y Medrano-González, 2002).

La alta diversidad de la Bahía de Banderas respecto a Isla Socorro se debe en parte a la alta frecuencia del haplotipo F y la exclusividad del haplotipo E10 en esta zona así como a los altos índices de recambio reportados entre estas regiones. En cambio, en la Isla Socorro pareciera mantenerse un grupo relativamente homogéneo de ballenas a lo largo del invierno. Las poblaciones con valores de π más elevados son en principio las más antiguas tal es el caso de las ballenas del *stock* Costero al que pertenece la Bahía de Banderas, mientras que las ballenas jorobadas del *stock* Revillagigedo, al que pertenece la Isla Socorro, surgieron a partir de colonizaciones desde la costa americana (Medrano-González, 2006).

La relación entre la diversidad calculada a partir de la homocigosis (θ_h) y la diversidad alélica (θ_k) nos muestra que ambas regiones poseen una composición haplotípica segregada (Medrano-González, 2006), es decir, se componen de pocos alelos y éstos provienen de regiones de alimentación muy específicas lo cual es reflejo de la existencia de dos grupos poblacionales distintos y su fidelidad a los destinos migratorios de alimentación y reproducción. La única

etapa con un valor de θ_k superior al de θ_h es BB05_0 lo cual significa que posee una mayor riqueza de haplotipos los cuales provienen de varias zonas de alimentación.

La población del Pacífico Norte pasó de la estimación de 20,000 individuos (Rice 1978), antes de la caza comercial a entre 1000-1400 individuos al finalizar la misma (Rice, 1974; Gambell, 1976; Johnson y Wolman, 1984). El análisis de neutralidad de Tajima sugiere que las ballenas de la Bahía de Banderas han pasado por cuellos de botella recientes, resultado de decrementos en la abundancia y/o fragmentación poblacional. Esto podría ser un reflejo de la disminución poblacional después de la caza comercial a la que fueron sometidas estas poblaciones y/o a cuellos de botella asociados a las glaciaciones en las que se congelan zonas de alimentación subpolares. El *stock* al que pertenecen las muestras de Isla Socorro se encuentra actualmente en expansión como resultado de su origen postglacial. Se sabe que al cambiar las condiciones locales las especies pueden cambiar su abundancia relativa y absoluta (Lemoine y Boehning-Gaese, 2003; Genner *et al.*, 2004). El cambio climático global ha descongelado zonas subpolares lo que ha ampliado la distribución de estos mamíferos. Esto podría estar reflejando en un aumento de abundancia. Actualmente las áreas de alimentación relacionadas al *stock* Revillagigedo, el oriente de Alaska y la Columbia Británica son las áreas de mayor abundancia con 6,000 individuos seguidos de la del Golfo de Alaska con 4,000 individuos mientras que California y Oregón, relacionadas con el *stock* continental, apenas llegan a los 2,000 individuos (Calambokidis *et al.*, 2008).

De acuerdo al análisis de Ewens-Watterson, ambos grupos poblacionales parecen estar sujetos a exogamia, debido a migración reciente, flujo génico y a crecimiento poblacional. El flujo génico puede darse a partir de movimientos entre zonas de reproducción como los intercambios registrados entre México y Hawai (Baker *et al.*, 1986). También se sabe que las ballenas del Archipiélago de Revillagigedo visitan y utilizan las otras dos áreas de reproducción del Pacífico mexicano (Urbán *et al.*, 2000; González-Peral, 2008; Lagerquist, 2008).

El análisis de la variación **entre regiones** (considerando todas las etapas de los dos años) mostró diferencias entre la Bahía de Banderas e Isla Socorro. Estas diferencias son aún mayores que las encontradas en las comparaciones temporales y quizás están relacionadas con la alta frecuencia del haplotipo F y la exclusividad del haplotipo E10 en esta zona. No se encontraron diferencias significativas **entre los años** 2004 y el 2005 para ninguna de las dos regiones. Sin embargo se encontraron ligeras variaciones en las frecuencias de los haplotipos

siendo el E7 el más evidente. Estas variaciones pueden estar relacionadas con el fenómeno del Niño (2005) y la Niña (2004). Anteriormente ya se habían reportado estas fluctuaciones anuales vinculadas a estos eventos (Robles-Saavedra en elaboración, Vázquez-Cuevas, 2007). Se sabe que el calentamiento global puede tener efectos severos en la ecología de los océanos, incluso puede generar variaciones de los patrones de productividad marina en las regiones de alimentación de las ballenas jorobadas (Chittleborough, 1991). La distribución invernal de las ballenas jorobadas es bastante regular pero pueden modificarse sus patrones de distribución y abundancia debido a variaciones oceanográficas anuales como El Niño/La Niña (Medrano-González *et al.*, 2001).

La variación a lo **largo de la temporada invernal** mostró diferencias significativas para la **Bahía de Banderas**. Esta región presenta una estructuración fuertemente estacional; se observa que existen diferentes tiempos de arribo a las zonas de alimentación. El alto grado de diferenciación del invierno temprano en la Bahía de Banderas está relacionado a la aparición de un primer grupo con altas frecuencias de los tipos F, haplotipos característicos de California; a juzgar por los cambios de frecuencia haplotípica, este primer grupo puede estar utilizando la región como zona de tránsito hacia otros sitios de reproducción más sureños. Posteriormente se registra la llegada de un segundo grupo cuya composición haplotípica está relacionada con grupos de alimentación de latitudes más altas. Estas observaciones coinciden con lo encontrado en otros trabajos (Medrano-González *et al.*, 1995, 2001; Vázquez-Cuevas, 2007; Calambokidis *et al.*, 2008; Robles-Saavedra en elaboración).

La diferenciación a lo **largo de la temporada de Isla Socorro** no es tan evidente. Sin embargo, al empatar la primera fase del invierno medio del 2004 (IS04_1A) con la segunda fase del invierno medio del 2005 (IS05_1B), es decir, considerando que el arribo de los animales durante la temporada invernal del 2005 comenzó más temprano se pueden apreciar diferencias significativas. Se encontraron variaciones menores en las frecuencias de los haplotipos A+ y E a lo largo de la temporada. La variación más importante en la Isla Socorro es la anual. Las variaciones de las frecuencias haplotípicas de las etapas invernales pueden deberse a 1) A variaciones climáticas; se sabe que las ballenas pueden alargar su distribución temporal y espacial en los grupos invernales debido a este fenómeno (Ladrón de Guevara, 2001) y 2) A los diferentes tiempos de llegada y partida de los animales hacia sus zonas de alimentación así como al recambio entre regiones a lo largo de la temporada. Lagerquist (2008) probó mediante el uso de marcas satelitales que animales que iniciaron la temporada en Isla Socorro se

observaron en el continente al final de la misma temporada mientras que Urbán *et al.* (2000) y González-Peral (2011) reportaron que las ballenas de Isla Socorro presentan movimientos hacia el continente en el mismo año.

El contraste de la diferenciación haplotípica y molecular indica el tipo de aislamiento poblacional. Valores de ϕ_{st} superiores a F_{st} son indicativos de flujo génico reciente entre poblaciones antiguamente aisladas o coancestría (Medrano-González, 2006) como es el caso de la relación entre todas las etapas invernales de la Bahía de Banderas y de estas respecto a las de Isla Socorro. Esto puede reflejar el hecho de que las agregaciones invernales costeras forman un gran continuo, al menos entre Nayarit y Baja California Sur, permitiendo que los machos se muevan fácilmente y se dispersen en toda la agregación. Sin embargo en las agregaciones de ballenas que arribaron en las distintas etapas a la Isla Socorro se encontraron valores de F_{st} superiores a ϕ_{st} los cuales indican una ligera interrupción del flujo génico. Una posible explicación es que el área de agregación en las Islas Revillagigedo forma parches más pequeños y aislados haciendo que las ballenas se congreguen más y tengan menos movimientos entre islas en comparación a los movimientos entre zonas vecinas en la costa continental (Medrano-González *et al.*, 2001).

La relación entre la diferenciación haplotípica y molecular muestra que entre las regiones existe flujo génico. A lo largo de la estación invernal de la Bahía de Banderas también existe evidencia de flujo génico sin embargo, anualmente si se observa una interrupción del mismo. Esto indica un movimiento dinámico de los destinos migratorios, en donde arriban un mayor número de ballenas de diferentes zonas de alimentación cada año. La población de Isla Socorro no muestra diferencias entre los índices de diferenciación haplotípica y nucleotídica al considerar las divisiones anual, estacional o regional; parece así, una población aislada a partir de una población homogénea.

Los índices de diferenciación F_{st} muestran diferencias significativas entre regiones así como un patrón de diferenciación estacional en la Bahía de Banderas a lo largo de ambos años y una combinación de diferenciación anual y estacional poco definida en la Isla Socorro. El flujo génico entre regiones y etapas invernales se asocia a la dispersión invernal de las ballenas y a su estancia diferencial en distintas zonas. Podemos concluir que la diferenciación está dada por los diferentes tiempos de arribo de grupos de animales a las zonas invernales y el flujo génico por el traslape espacio temporal dentro de las regiones de reproducción.

En concordancia con los análisis de estructura genética poblacional, el análisis de ACP nos permite concluir que el 57% de la variación molecular entre Isla Socorro y la Bahía de Banderas está explicada por la región geográfica a la que pertenecen. En el caso de la Bahía de Banderas se separa claramente el invierno temprano del invierno medio y tardío. En la Isla Socorro la estructuración temporal es menor y combina un componente anual y otro estacional.

9. CONCLUSIONES

1. Se identificaron seis haplotipos por el método RFLP para las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano: A+, A-, E, E7, E10 y F. En las ballenas de la Isla Socorro son más abundantes los haplotipos A+ seguidos de los E y A-, mientras que en las ballenas de la Bahía de Banderas predominan los tipos F y E. El haplotipo E10 se encontró como exclusivo de la Bahía de Banderas. Esta composición parece derivar de las conexiones migratorias con las zonas de alimentación en el Pacífico Norte.
2. En la Isla Socorro, de la década de 1990 a 2000, se registró un aumento de la frecuencia del haplotipo A que proviene de zonas de alimentación en Alaska. Este cambio puede estar asociado a un aumento poblacional de los grupos de alimentación que provienen de Alaska, debido a la expansión de sus zonas de alimentación a causa del calentamiento global.
3. Los haplotipos identificados se encuentran agrupados en los clados AE y el CD. La relaciones filogenéticas del mtDNA de las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano parece reflejar los patrones de diferenciación producto de la expansión de las poblaciones en nuevos grupos de alimentación después de las glaciaciones. La composición haplotípica refleja los eventos históricos de flujo génico entre el Pacífico Norte y Sur.
4. En general, las ballenas de la Bahía de Banderas presentan valores de diversidad genética mayores que los de la Isla Socorro. Las estimaciones de diversidad nucleotídica y haplotípica son congruentes con las reportadas en un estudio mundial.
5. La relación de las pruebas de neutralidad muestran que ambas regiones poseen una composición haplotípica segregada. El análisis de Tajima sugiere que las ballenas de la

Bahía de Banderas han pasado por cuellos de botella recientes, resultado de decrementos en la abundancia poblacional, mientras que las ballenas de la Isla Socorro se encuentra en expansión actual. Este crecimiento poblacional podría estar asociado a la ampliación de sus zonas de alimentación en el Pacífico Norte por el cambio climático global. Según la prueba de Ewens-Watterson ambos grupos poblacionales parecen estar sujetos a exogamia.

6. Se encontró una diferenciación primaria entre la Bahía de Banderas e Isla Socorro y no hubo diferencias entre los años 2004 y 2005 para ninguna de las dos regiones. La variación entre etapas invernales mostró que la Bahía de Banderas presenta una estructuración fuertemente estacional mientras que Isla Socorro presenta una ligera estructuración en parte anual y en parte estacional.
7. La dinámica de la migración de las ballenas jorobadas en el Pacífico Mexicano parece estar ligada a la clina de haplotipos mitocondriales que existe en los *stocks* de alimentación en el Pacífico Norte y las conexiones migratorias de estos grupos con las regiones invernales. En la Bahía de Banderas se observan dos grupos con diferentes temporalidades de arribo a la zona, un primer grupo dominado por los tipos F y un segundo grupo con una composición haplotípica característica de latitudes más altas.
8. Los resultados muestran que las ballenas jorobadas en el Pacífico Norte tienen una estructura genética determinada no solo por la estructura migratoria histórica sino también por los procesos demográficos actuales que se ven influenciados por las actividades humanas.

10. LITERATURA CITADA

- Aris-Brosou, S., and L. Excoffier, 1996. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Mol. Biol. Evol.* 13: 494-504.
- Árnason, U., Gullberg A., Janke A., 2004. Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution. *Gene* 333:27-34.
- Árnason, U., Gullberg, A. & Widegren, B. 1993. Cetacean mitochondrial DNA control region: sequences of all extant baleen whales and two sperm whales species. *Mol. Ecol. Evol.* 10(5):960-970.
- Awise, J. C. 1994. Natural History of genetic markers. Chapman and Hall, New York.
- Awise, J. C. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution, 2nd Ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA. 683pp.
- Baker, C.S., L. Flores-González, B. Abernethy, H.C. Rosenbaum, R.W. Slade, J. Capella y J.L. Bannister. 1998. Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among Humpback whales of the Southern Hemisphere. *Mar. Mamm. Sci.*, 14(4):721-737. C-392.
- Baker, C.S., Herman LM, Perry *et al.* 1986. Migratory movements and population structure of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the central and eastern North Pacific. *Marine Ecology. Progress Series*, 31, 105-119
- Baker, C. S., Medrano-González L., Calambokidis J., Perry A., Pichler F. B., Rosenbaum H., Straley J. M., Urbán-Ramírez J-, Yamaguchi M. y Ziegeler O.v. 1998. Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variations among humpback whales in the North Pacific. *Molecular Ecology* 7: 695-707.
- Baker, C.S. y Medrano-González L. 2002. World-Wide distribution and diversity of humpback whale mitochondrial DNA lineages. En: Pfeiffer C.J. (ed.) *Molecular and cell biology of marine mammals*. Krieger Publishing Co. Melboure, Florida.
- Baker, C.S., Palumbi S.R., Lambertsen R. H., Weinrich M.T., J Calambokidis & SJ O'Brien. 1990. Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nature* 344: 238-340.
- Baker, C.S., and Palumbi S.R. 1995. Population structure, molecular systematic and forensic identifications of whales and dolphins. In *conservations genetics: Case Histories from Nature*. J. Awise and J. L. Hamrick, editors. Chapman and Hall, New York. 10-49.

- Baker, C.S., and Palumbi S.R. 1997. The genetic structure of whale populations implications for management. In *Molecular Genetics of Marine Mammals*. A. E. Dizon, S. J. Chivers, and W. F. Perrin, editors. Allen Press, La Jolla, CA. 117-146.
- Baker, C.S., A. Perry y L.M. Herman. 1987. Reproductive histories of female humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the North Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 41:103-114.
- Baker, C.S., Lambertsen, R. H., Weinrich, M. T., Calambokidis, J., Early, G., and O'Brien, S. J. 1991. Molecular genetic identification of the sex of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). Rep. International Whaling Commission, Special Issue N°13. Pp 105-111.
- Baker, C.S., Perry, A., Bannister, J. L., Weinrich, M. T., Abernethy, R. B., Calambokidis, J., Lin, J., Lambertesen, R. H., Urbán, J. R., Vasquez, O., Clapham P. J., Alleng, A., O'Brien, S.J. & Palumbi, S.R. 1993. Abundant mitochondrial DNA variation and worldwide population structure in humpback whales. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 90: 8239-824.
- Calambokidis, J., E.A. Falcone, T.J. Quinn, A.M. Burdin, P.J. Clapham, J.K.B. Ford, C.M. Gabriele, R. LeDuc, D. Mattila, L. Rojas-Bracho, J.M. Straley, B.L. Taylor, J.U. R., D. Weller, B.H. Witteveen, M. Yamaguchi, A. Bendlin, D. Camacho, K. Flynn, A. Havron, J. Huggins y N. Maloney. 2008. SPLASH: Structure of Populations, Levels of Abundance and Status of Humpback Whales in the North Pacific. U.S. Dept of Commerce, Western Administrative Center, Seattle, Washington.
- Calambokidis, J.C., G., Steiger, J.M. Straley, L.M. Herman, S. Cerchio, D.R. Salden, J. Urbán R. J.K. Jacobsen, O. von Ziegesar, K.C. Balcomb, C.M. Gabriele, M.E. Dahleim, S. Urchida, G. Ellis, Y. Miyamura, P. Ladrón de Guevara P., M. Yamaguchi, F. Sato, S.A. Mizroch, L. Schlender, K. Rasmussen, J. Barlow y T.J. Quinn II. 2001. Movements and population structure of Humpback whales in the North Pacific. *Mar. Mamm. Sci.*, 17 (4):769:794.
- Chittleborough, R.G. 1991. Potential impacts of climatic change on the Southern Ocean ecosystem. *Memoirs of the Queensland Museum* 30: 243-247.
- Clapham, P.J. 2000. The humpback whale: seasonal feeding and breeding in a baleen whale. In *Cetacean societies: field studies in behavior*. Edited by J. Mann, R. Connor, P. Tyack and H. Whitehead. University of Chicago Press, Chicago, IL.

- Clapham, P.J., P.J. Palsbøll y D.K. Mattila. 1993. High-energy behaviors in Humpback whales as a source of sloughed skin for molecular analysis. *Mar. Mamm. Sci.*, 9(2):213-220.
- Colorali. Programa desarrollado por Medrano-González L. 2012 en TURBO Pascal 3.01A.
- Dawbin, W.H. 1966. The seasonal migratory cycle of humpback whales. pp 145-169. En: Norris K.S. (ed). *Whales, dolphins and porpoises*. University of California Press. Berkeley, CA.
- Ewens, W.J. 1972 The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Popul. Biol.* 3:87-112.
- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Gambell, R. 1976. World whale stocks. *Mammal Review* 6:41-53.
- González-Peral, U. 2006. Identidad poblacional de las ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) que se congregan en Baja California Sur. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, Baja California Sur, México. 58 pp.
- González-Peral, U. 2011. Definición y características de las unidades poblacionales de las ballenas jorobadas que se congregan en el Pacífico mexicano. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, Baja California Sur, México. 92pp.
- Genner, M.J., Sims, D.W., Wearmouth, V.J., Southall, E.J., Southward, A.J., Henderson, P.A., Hawkins, S.J., 2004. Regional climatic warming drives long-term community changes of British marine fish. *Proceedings of the Royal Society, Series B* 271, 655–661.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit v7.0.9: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hatch, L.T., E.B. Dopman and Harrison R.G. 2006. Phylogenetic relationships among the baleen whales based on maternally and paternally inherited characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 12–27.
- Hershkovitz, P. 1966. Catalog of living whales. Smithsonian Institution. Bulletin 246. Washington, DC.
- Hoelzel, A.R. & Dover, G.A. (1991). *Molecular Genetic Ecology*. Oxford: Oxford University Press.

- Hotteling, H., 1933. Analysis of a Complex of Statistical Variables Into Principal Components. *Journal of Educational Psychology*, volume 24, pages 417-441 and 498-520.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Kellogg, A.R. 1932. New names for mammals proposed by Borowski in 1780 and 1781. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 45: 147-148.
- Ladrón de Guevara Porras, P. 2001. Distribución temporal y estructura de las agrupaciones de los rorcuales jorobados (*Megaptera novaeangliae*) en dos áreas de reproducción del Pacífico Mexicano. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
- Lagerquist, B. A., B. R. Mate, J. G. Ortega-Ortiz, y M. Winsor. 2008. Migratory movements and surfacing rates of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) satellite tagged at Socorro Island, Mexico. *Marine Mammal Science*, 24(4): 815–830.
- Larsen, AH, Sigurjónsson J, Øren N, Vikingsson G, Palsbøll PJ. 1996. Population genetic analysis of nuclear and mitochondrial loci in skin biopsies collected from central and northeastern North Atlantic humpback whales (*Megaptera novaeangliae*): population identity and migratory destinations. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263: 1611-1618.
- Leatherwood S., Reeves, R. R, Perrin W. F. y Evans E. 1988. Ballenas, delfines y marsopas del Pacífico Nororiental y de las aguas Árticas adyacentes. Una guía para su identificación. Comisión Interamericana de Atún Informe Especial No. 6 La Jolla, California USA.
- Lemoine, N., Boehning-Gaese, K., 2003. Potential impact of global climate change on species richness of long-distance migrants. *Conservation Biology* 17, 577–586-
- Maddison, D. R. y Maddison, W. P. 2001. MacClade: Analysis of phylogeny and character evolution, versión 4.03. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Medrano González, L. M. y J. Urbán Ramírez. 2002. “La Ballena Jorobada (*Megaptera novaeangliae*) en la Norma Oficial Mexicana 059-ECOL-1994, 2000. Ficha de la Especie, Categorización de Riesgo y Propuesta para un Plan Nacional de Investigación y Conservación”, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad Proyecto W024, CONABIO, Ciudad de México, México, 69 pp. 116.
- Medrano-González L., Aguayo-Lobo A., Urbán-Ramírez J. y Baker C. S. 1995. Diversity and distribution of mitochondrial DNA lineales among humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, in the Mexican Pacific ocean. *Canadian Journal of Zoology* 73:1735-1743.

- Medrano-González, L., Baker C. S., Robles-Saavedra M. R., Murrell J., Vázquez-Cuevas M. J., Congdon B.C., Straley J.M., Calmbokidis J., Urbán-Ramírez J., Flórez- González L., Olavarría-Barrera C., Aguayo-Lobo A., Nolasco-Soto J., Juárez-Salas R.A. y Villavicencio-Llamosas K. 2001. Trans-oceanic population genetic structure of humpback whales in the North and South Pacific. *Memoirs of the Queensland Museum* 47(2): 465-479.
- Medrano-González, L. 2006. Hacia una dinámica de la mastofauna marina mexicana: Análisis de composición funcional y de algunas estructuras genéticas poblacionales. 9-19. En: Vázquez-Domínguez E. y D.J. Hafner (eds). *Genética y mamíferos mexicanos: Presente y futuro*. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin 32.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Univ. Press. New York.
- Nishiwaki, M. 1959. Humpback whales in Ryukuan waters. *Scientific Reports of Whales Research Institute Tokyo*, 14, 49-87.
- Ohta, T, Kimura M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet Res* 22:201-204.
- Palsbøll, P.J., P.J. Clapham, D.K. Matilla, F. Larsen, R. Sears, H.R. Siegismund, J. Sigujonsson, O. Vasquez y P. Arctander. 1995. Distribution of mtDNA haplotypes in North Atlantic Humpback whales: the influence of behavior on population structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*,116:1-10.
- Palumbi, S.R., A.P. Martin, B. Kessing y W.O. McMillan. 1991. Detecting population structure using DNA mitochondrial. pp 271-278. En: Hoelzel, A.R. y G.P. Donovan (Eds). *Genetic ecology of whales and dolphins*. Rep. Int. Whal. Comm. Special Issue 13. Cambridge. 311 pp. C-230.
- Palumbi S.R. y Baker C.S. 1994. Contrasting population structure from nuclear intrón sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution* 11: 426-435.
- Perry, S. L., DeMaster D. P. y Silver G. K. 1999. The Great Whales. History and status of Six Species Listed as Endangered Under the U.S. Endangered Species Act of 1973. *Marine fisheries Review Special Issue* 61(1): 1-6.
- Reynolds, J., Weir, B.S., and Cockerham, C.C. 1983 Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105:767-779.

- Rice, D. W. 1998. Marine Mammals of the World: Systematics and Distribution, Special Publications of the Society for Marine Mammals, no. 4, The Society for Marine Mammalogy, Lawrence, KS, EE. UU., 231 pp.
- Rice, D.W. 1974. Whales and whale research in the eastern North Pacific. Pages 170-195 in W.E. Schevill, D.G. Ray, K.S. Norris (eds.). The Whale Problem. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Rice, D.W. 1978. The humpback whale in the North Pacific: distribution, exploitation and numbers. pp 29-44. En: Norris K.S. & Reeves R. (eds). Report on a workshop on problems related to humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in Hawaii. U.S. Marine Mammal Commission. Washington, DC.
- Robles-Saavedra, M. R. En elaboración. Tesis de maestría. Variación genética mitocondrial y nuclear de la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) en el Pacífico mexicano. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México D.F.
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rosenbaum, HC, Weinrich MT, Stoleson SA, Gibbs JP, Baker CS, DeSalle R. 2002. The effect of differential reproductive success on population genetic structure: correlations of life history with matriline in humpback whales of the gulf of Maine. *The American Genetic Association* 93(6):389-399.
- Sambrook, J., Fritsch E. F. y Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- SigmaPlot version 11.0, from Systat Software, Inc., San Jose California USA, www.sigmaplot.com.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- StatSoft Inc. 2001 STATISTICA VERSION 6.0 para Windows.
- Stewart, F. M. 1977. Computer algorithm for obtaining a random set of allele frequencies for a locus in an equilibrium population. *Genetics* 86:482-483.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.
- Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. In: Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology, edited by Takahata, N. and Clark, A.G., Tokyo, Sunderland, MA: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., p. 37-59.

- Tajima, F., 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics* 143: 1457-1465.
- Urbán, J.R., Jaramillo A. L., Aguayo A. L., Ladrón de Guevara P. P., Salinas M. Z., Alvarez C. F., Medrano L. G., Jacobsen J. K., Balcomb K. C., Claridge D. E., Calambokidis J., Steiger G. H., Straley J.M., Ziegesar O. v., Waite J. M., Mizroch S., Dahlheim M. E., Darling J.D. y Baker C. S. 2000. Migratory destination of humpback whales wintering in the Mexican Pacific. *The Journal of Cetacean Research and Management* 2(2): 101-110.
- Urbán, J. y A. Aguayo. 1987. “Spatial and Seasonal Distribution of the Humpback Whale *Megaptera novaeangliae*, in the Mexican Pacific”, *Marine Mammal Science*, 3(4): 333-344.
- Vázquez-Cuevas, M. J. G., 2007. Distribución espacial y temporal de microsatélites de las ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) en el Pacífico mexicano. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
- Watson, L. 1985. *Sea guide to the whales of the world*. E.P. Dutton. New York, NY.
- Watterson, G. 1978. The homozygosity test of neutrality. *Genetics* 88:405-417
- Watterson, G., 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.* 7: 256-276.
- Witteveen, B.H., Straley, J.M., von Ziegesar, O., Steel, D., Baker, C.S., 2004. Abundance and mtDNA differentiation of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the Shumagin Islands, Alaska. *Canadian Journal of Zoology* 82, 1352–1359.

11. ANEXOS

Anexo 1

Técnica de extracción de DNA para piel de cetáceos (Baker, 1991)

- Se toma de 0.1 a 0.5 g de tejido sobre una superficie aséptica el cual se disgrega utilizando pinzas y bisturíes estériles o flameados con etanol. El tejido se pone en un tubo Eppendorf de 2 mL con 700 μ L de solución RSB (Tris 10 mMol/L pH=7.4, NaCl 10 mMol/L, EDTA 25 mMol/L), 100 μ L de SDS (dodecil, sulfato de sodio) al 10% y 40 μ L de Proteinasa K (20 mg/mL).
- Se sella el tubo con parafilm y se incuba con rotación suave a 55 °C por al menos tres horas, durante la noche o en general hasta que el tejido esté por completo digerido y tenga el aspecto de una suspensión (una sopa negra en el caso de la piel de cetáceos). Si el tejido es difícil de digerir, se agregan 40 μ L adicionales de Proteinasa K durante la segunda o tercera hora de incubación.
- Si el tejido no está conservado en alguna solución salina saturada, se agrega 10 μ L de solución salina saturada. Se agrega 0.8 mL de Fenol equilibrado, cloroformo, alcohol isoamílico (24:24:1), se sella el tubo con parafilm y se incuba por 20 min en rotación suave. Se centrifuga por 20 min en una microfuga (~13,000 rpm) y se retiene el sobrenadante en otro tubo Eppendorf de 2 mL. Si el sobrenadante no es transparente, repetir esta operación.
- Se agrega 0.8 mL de Cloroformo, alcohol isoamílico (24:1), se sella el tubo con parafilm y se incuba por rotación suave durante 20 min. Se centrifuga por 20 min en una microfuga y se retiene el sobrenadante en un tubo de centrifuga de 5 mL.
- Se agrega 0.3 mL de acetato de amonio (7.5 mol/L), 2.25 mL de etanol 95% frío, se mezcla con una inversión rápida y se deja en el congelador durante la noche.
- Se toma el DNA precipitado con la punta de una micropipeta y se pone en un tubo Eppendorf o en un criotubo de 1 mL marcado como "a". El tubo con el acetato de amonio y el etanol se centrifuga a 3200 rpm para obtener un precipitado adicional de DNA "b". En

algunas muestras puede no haber precipitado visible ni después de la incubación e incluso ni después de la centrifugación aún habiendo DNA.

- A las muestras “a” y “b” se agrega 1 mL de etanol 70% frío, se separa el botón de DNA del fondo del tubo con una breve agitación y se deja reposar a temperatura ambiente por una hora aproximadamente.
- El tubo “a” se centrifuga en la microfuga por 10 min y el tubo de 5 mL “b” se centrifuga por 10 min a 3200 rpm. Se retira el etanol y los tubos se voltean cuidadosamente sobre un papel toalla limpio para escurrir todo el etanol. Puede secarse el etanol incubando los tubos abiertos y cubiertos con un papel toalla limpio a 37 °C durante 30 min.
- En dependencia de los precipitados obtenidos, se agrega de 0.1 a 0.3 mL de solución TE 0.5X (Tris 5 mMol/L pH=8.0, EDTA 0.05 mMol/L) y se resuspende incubando sin agitación por tres horas a 55 °C.

Anexo 2

Concentraciones de reactivos para amplificación de un fragmento del D-loop en una reacción de un total de 30 µl.

Reactivo	Volumen en µl.
Buffer 1X	3.00
dNTP's 25mMol	0.29
MgCl ₂ 50mMol	1.80
Primer Dlp 5 100pMol	0.30
Primer Dlp1.5 100pMol	0.30
<i>Taq</i> 5Uµl	0.15
DNA	0.70
BSA 0.5mg	0.60
H ₂ O	22.86

Anexo 3

Nomenclatura y referencias de las 58 secuencias de la región control del mtDNA utilizadas para la construcción de la filogenia de las ballenas jorobadas así como el grupo externo.

Nomenclatura	Descripción de la nomenclatura	Referencia
<i>B. mysticetus</i>	<i>Balaenoptera mysticetus</i>	Árnason 1993
<i>E. glacialis</i>	<i>Eubalaena glacialis</i>	Árnason 1993
<i>B. acutorostrata</i>	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Árnason 1993
<i>B. musculus</i>	<i>Balaenoptera musculus</i>	Árnason 1993
<i>B. edeni</i>	<i>Balaenoptera edeni</i>	Árnason 1993
<i>B. borealis</i>	<i>Balaenoptera borealis</i>	Árnason 1993
<i>B. physalus</i>	<i>Balaenoptera physalus</i>	Árnason 1993
Mnov_UGP_A+	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_A3	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_A4	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_A5	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_A6	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_A-	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_A7	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_E1	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_E3	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_E4	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_E5	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_E6	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_E7	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_E8	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_E9	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_E10	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_E12	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico Norte	González-Peral 2011
Mnov_UGP_E14	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_E2	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_E13	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_Ca_01	<i>Megaptera novaeangliae</i> California	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_Ca_04	<i>Megaptera novaeangliae</i> California	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_UGP_F1	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_F2	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	Presente trabajo
Mnov_UGP_F3	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_F4	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_F6	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_F8	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico Norte	González-Peral 2011
Mnov_Og_06	<i>Megaptera novaeangliae</i> Ogasawara	Baker y Medrano-González 2002

Mnov_GI_01	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_Tg_05	<i>Megaptera novaeangliae</i> Tonga	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_GI_37	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_GI_07	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_GI_36	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_UGP_F5	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_F7	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_UGP_F9	<i>Megaptera novaeangliae</i> Pacífico mexicano	González-Peral 2011
Mnov_GI_24	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_GI_30	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_EA_05	<i>Megaptera novaeangliae</i> Este de Australia	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_GI_17	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_HWA_23	<i>Megaptera novaeangliae</i> Oeste de Australia	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_Ma_507	<i>Megaptera novaeangliae</i> Massachusetts	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_EA_06	<i>Megaptera novaeangliae</i> Este de Australia	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_GI_16	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_NZ_01	<i>Megaptera novaeangliae</i> Nueva Zelanda	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_Ic_08ua	<i>Megaptera novaeangliae</i> Islandia	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_GI_25	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_Tg_9406	<i>Megaptera novaeangliae</i> Tonga	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_GI_22	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_WA_20	<i>Megaptera novaeangliae</i> Oeste de Australia	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_Tg_9408	<i>Megaptera novaeangliae</i> Tonga	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_HWA_22	<i>Megaptera novaeangliae</i> Oeste de Australia	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_GI_10	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_GI_38	<i>Megaptera novaeangliae</i> Isla Gorgona	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_WA_09	<i>Megaptera novaeangliae</i> Oeste de Australia	Baker y Medrano-González 2002
Mnov_Árnason_93	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Árnason 1993
Mnov_Ic_04	<i>Megaptera novaeangliae</i> Islandia	Baker y Medrano-González 2002

Anexo 4

Nomenclatura y descripción los diferentes grupos naturales obtenidos para dos años a lo largo de las temporadas invernales.

Nomenclatura	Descripción de la nomenclatura
BB04_1	Bahía de Banderas 2003-2004 invierno medio
BB04_2	Bahía de Banderas 2003-2004 invierno tardío
BB05_0	Bahía de Banderas 2004-2005 invierno temprano
BB05_1	Bahía de Banderas 2004-2005 invierno medio
IS04_1A	Isla Socorro 2003-2004 invierno medio A
IS04_1B	Isla Socorro 2003-2004 invierno medio B
IS04_2	Isla Socorro 2003-2004 invierno tardío
IS05_1A	Isla Socorro 2004-2005 invierno medio A
IS05_1B	Isla Socorro 2004-2005 invierno medio B
IS05_2	Isla Socorro 2004-2005 invierno tardío

Anexo 5

Etapas invernales obtenidas para las ballenas jorobadas del Pacífico Mexicano con sus fechas de inicio y término así como el número de individuos (N).

	Bahía de Banderas 2003-2004	Bahía de Banderas 2004-2005	Isla Socorro 2003- 2004	Isla Socorro 04-05
Invierno temprano		BB05_0 20 Noviembre - 07 Diciembre N = 19		
	BB04_1 26 Enero -06 Marzo N = 35	BB05_1 17 Enero - 04Marzo N = 79	IS04_1A 20 Enero -03Marzo N = 53	IS05_1A 08 Febrero -05 Marzo N = 46
Invierno medio			IS04_1B 07 - 13Marzo N = 22	IS05_1B 07Marzo -16Marzo N = 30
	BB04_2 11Marzo -02Abril N = 17		IS04_2 17 Marzo - 03Abril N = 39	IS05_2 21Marzo -14Abril N = 12