

198612



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM**

**ESTUDIO GENETICO DEL RORCUAL JOROBADO
EN EL PACIFICO MEXICANO**

TESIS

que para obtener el grado académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS
(Biología)**

presenta

LUIS MEDRANO GONZALEZ

**Directores: Dr. Germinal Cocho Gil
MV. Anelio Aguayo Lobo**



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.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
RESUME.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCION.....	4
ANTECEDENTES.....	11
La genética de los cetáceos.....	11
Sobre el rorcual jorobado.....	17
Planteamiento de la investigación.....	22
METODOS.....	24
Recolecta de biopsias.....	24
Extracción de DNA.....	26
Amplificación de DNA mitocondrial.....	27
Secuenciación de DNA mitocondrial.....	28
Determinación del sexo.....	29
Análisis de datos.....	30
RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
Variabilidad en el asa D mitocondrial.....	32
Historia de la especie en el Pacífico mexicano.....	41
Interpretación genética de la coloración caudal.....	49
Dinámica del asa D mitocondrial.....	52
Inferencias sobre la identificación del sexo.....	71
CONCLUSIONES.....	78
AGRADECIMIENTOS.....	81
REFERENCIAS.....	83

RESUMEN

En el Pacífico mexicano se reproducen aproximadamente 2 000 ballenas jorobadas, *Megaptera novaeangliae*, lo que representa poco menos de la mitad de estos animales en el Pacífico norte. Una parte se encuentra en la zona costera desde el extremo sur de Baja California hasta Costa Rica y otra porción alrededor de las Islas Revillagigedo. Las ballenas que en invierno se reproducen en la costa mexicana se alimentan en verano frente a la costa de California. En las zonas de reproducción existe cierta mezcla con las ballenas que se alimentan en Alaska y se reproducen principalmente en Hawai. Se desconocen las zonas de alimentación de las ballenas de Revillagigedo. El presente estudio genético se realizó con el objetivo de determinar la relación entre las ballenas del Pacífico mexicano y, en general, del Pacífico norte. Se colectaron 21 muestras de piel en la Bahía de Banderas de 1990 a 1992 y 28 muestras en la Isla Socorro de 1991 a 1992 con un sistema de dardo para biopsias desarrollado en la Facultad de Ciencias UNAM. En la Universidad de Hawai se analizó la variabilidad en un fragmento de 320 pb en el asa D del genoma mitocondrial mediante extracción de DNA, amplificación por reacción de polimerización en cadena y secuenciación por el método de reacción de terminación. Asimismo, se determinó el sexo de los animales mediante un ensayo de restricción en una región homóloga de los cromosomas X e Y. Se encontraron ocho haplotipos que forman dos cúmulos principales, uno de los cuales está relacionado con tipos del Hemisferio sur. La comparación con otras regiones del Pacífico norte refuerza la hipótesis de que existe una subpoblación Alaska/Hawai y otra California/México con cierta mezcla en las zonas de reproducción. Existe una distribución clinal de haplotipos en la costa del Pacífico nororiental, lo que involucra una estructura genética temporal en la costa del Pacífico mexicano y una relación de la identidad mitocondrial con el patrón de coloración caudal. Las ballenas jorobadas del Archipiélago Revillagigedo están relacionadas con la subpoblación California/costa mexicana aunque existen diferencias en el umbral de la significancia estadística. Esto puede interpretarse como una separación reciente que se ha estimado alrededor de hace 10 000 años. La distribución de los tiempos de coalescencia sugiere que, a largo plazo, la población de ballenas jorobadas en el Pacífico nororiental se aproxima a la panmixia. Se analizaron algunas propiedades físicas del DNA en la secuencia del asa D para explicar su variabilidad la cual parece originarse en las vecindades donde el DNA es menos estable. El asa D presenta una periodicidad de 5 pb en la estabilidad del DNA que podría estar relacionada con su función reguladora de la replicación y la transcripción. La identificación del sexo corrobora otros estudios, notando la evidencia de tres cantores identificados como machos y de dos casos de hembras que formaron pareja con cantores. Asimismo, se observa que, en la Bahía de Banderas, los machos arriban antes que las hembras.

80

New Mexico
1990

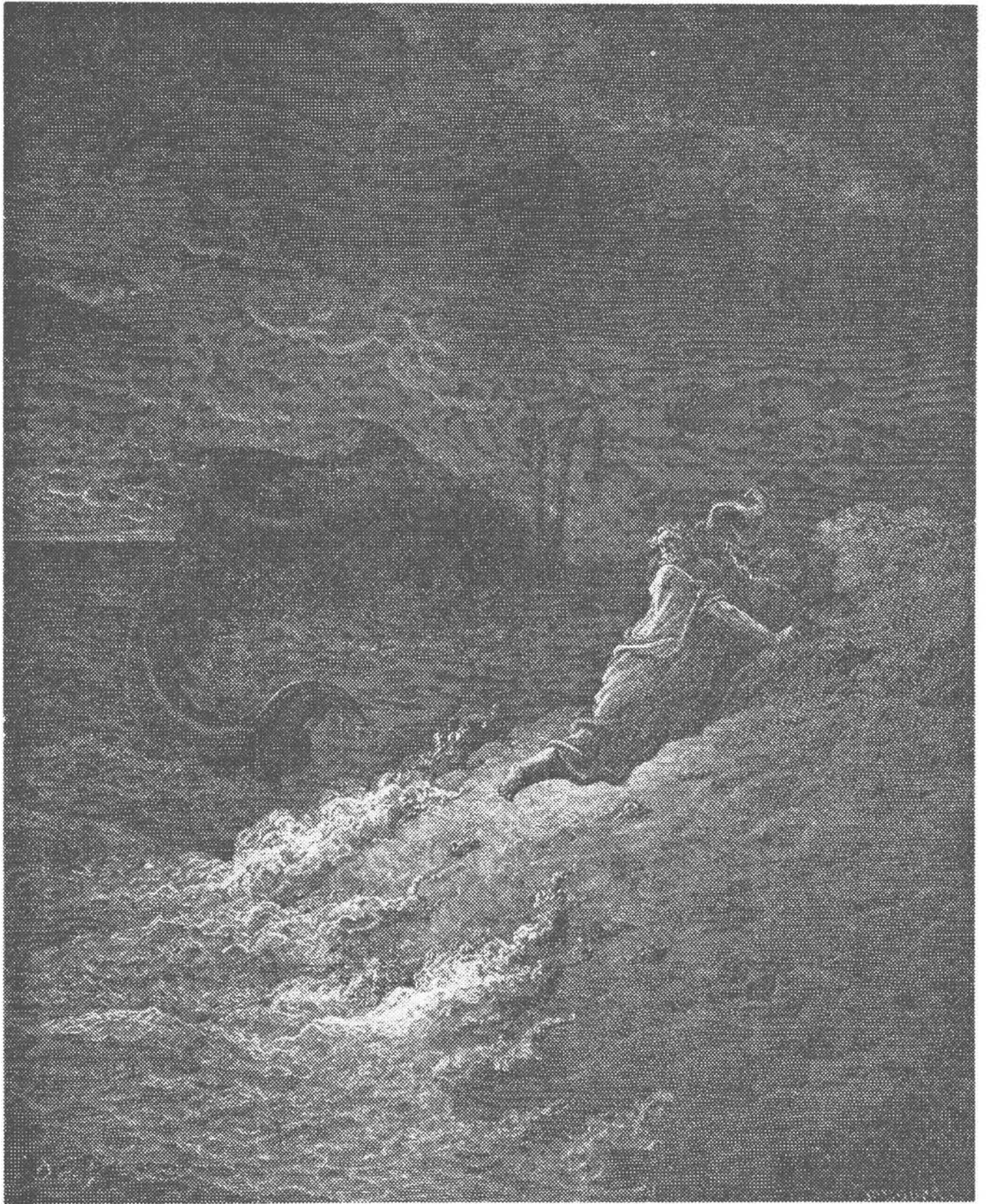
Genetics

RESUME

A peu près 2 000 baleines à bosse, *Megaptera novaeangliae*, se reproduisent dans le Pacifique mexicain et elles représentent un peu moins de la moitié de tous ces animaux dans le Pacifique nord. Une partie se trouve dans la région de la côte dès l'extrême sud de la Basse Californie jusqu'à Costa-Rica et une autre portion aux environs des Iles Revillagigedo. Les baleines qui se reproduisent pendant l'hiver dans la côte mexicaine se nourrissent pendant l'été face à la côte de la Californie. Il y a un certain mélange dans les zones de reproduction, avec les baleines qui se nourrissent en Alaska et qui se reproduisent principalement au Hawaii. Les zones d'alimentation des baleines de Revillagigedo ne sont pas connues. La présente étude génétique a été réalisée avec le but de déterminer la relation parmi les baleines du Pacifique mexicain et, en général, du Pacifique nord. 21 biopsies de la peau à la Baie de Banderas depuis 1990 jusqu'à 1992, et 28 biopsies aux Iles Revillagigedo pendant 1991 et 1992, ont été recueillies par un système à dard pour biopsies développé à la Facultad de Ciencias UNAM. A l'Université de Hawaii on a analysé la variabilité dans un fragment de 320 pb à l'anse D du génome mitochondrial moyennant l'extraction du DNA, amplification par la réaction de polymérisation en chaîne et la séquence par la méthode de la réaction à terminaison. Aussi, le sexe des animaux a été déterminé par un essai de restriction dans une région homologue aux chromosomes X et Y. On a trouvé huit haplotypes qui forment deux groupes principaux, un desquels est relationné avec les types de l'Hémisphère sud. La comparaison avec d'autres régions du Pacifique nord renforce l'hypothèse qu'il existe une souspopulation Alaska/Hawaii et une autre Californie/Mexique avec certain mélange aux zones de reproduction. Il y a une distribution clinelle des haplotypes sur la côte du Pacifique nord-est et celle-ci insère une structure génétique temporaire à la côte du Pacifique mexicain ainsi que d'une relation parmi l'identité mitochondrielle et le patron de la coloration caudal. Les baleines à bosse de l'Archipel Revillagigedo sont similaires à la souspopulation Californie/Mexique mais il y a quelques différences au seuil de la signifiante statistique. Ceci peut s'interpréter comme une séparation récente, qu'on a estimé d'environ 10 000 ans. La distribution des temps de coalescence suggère que, à long terme, la population des baleines à bosse au Pacifique nord-est s'approche à la panmixie. On a analysé quelques caractéristiques physiques du DNA pour expliquer la variabilité dans l'anse D laquelle paraît prendre son origine aux alentours où le DNA est moins stable. L'anse D a une périodicité de 5 pb à la stabilité du DNA qui pourrait être en relation avec sa fonction régulatrice de la réplication et la transcription. L'identification du sexe confirme d'autres études et on dénote l'évidence de trois baleines chanteurs identifiées comme mâles, ainsi que deux cas de femelles qui rejoignent les mâles chanteurs pour former des couples. Aussi, on observe que, dans la Baie de Banderas, les mâles arrivent avant que les femelles.

ABSTRACT

Approximately 2 000 humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, breed in the Mexican Pacific and this represents a little less than half of all those animals in the North Pacific. One part is found in the coastal region from Southern Baja California down to Costa Rica, and the remaining portion is found around Revillagigedo Islands. The whales that reproduce during winter in the Mexican coast feed in summer facing the California coast. In breeding regions there is some mixture with the whales which feed in Alaska and breed mainly in Hawaii. The feeding grounds of whales from Revillagigedo are unknown. The present genetic study was carried out in order to determine the relationship between humpback whales at Mexican Pacific and in all the North Pacific in a general sense. 21 skin samples of Bahía Banderas from 1990 to 1992 and 28 samples of Isla Socorro from 1991 to 1992 were collected with a dart biopsy system developed at Facultad de Ciencias UNAM. The variability in a 320 bp fragment of the mitochondrial D-loop was analyzed in the University of Hawaii by means of DNA extraction, amplification by the polymerase chain reaction and sequencing with the method of termination reaction. The sex of animals was determined by a restriction assay in an homologous region of chromosomes X and Y. Eight haplotypes were found forming two main clusters, one of which is related to Southern Hemisphere types. The comparison with other North Pacific regions reinforces the hypothesis about the existence of one subpopulation Alaska/Hawaii and another California/México with some mix in the breeding zones. There is a clinal distribution in the East North Pacific coast involving a time genetic structure at Mexican Pacific coast and a relationship between mitochondrial identity and fluke color pattern. Humpback whales of Revillagigedo Archipelago are related with the subpopulation California/Mexican coast, though some differences do exist at thresholds of statistical significance. This can be interpreted as a recent separation, which has been estimated to occur around 10 000 years ago. The distribution of coalescence times suggests that, at long term, the humpback whales population at North East Pacific approaches to panmixy. Some physical properties of DNA were analysed in order to explain the distribution of variability in the D-loop. Sequence variations seem to originate in the neighborhoods where DNA is less stable. Also, the D-loop has a 5 bp periodicity which could be related with its regulatory function on replication and transcription. Sex identification agrees with other studies noting the evidence of three singers identified as males and two cases of females which joined singers to form couples. Also, in Bahía Banderas is observed that males arrive before females.



INTRODUCCION

La historia de Jonás sublima una de las imágenes más intimidantes en la ensoñación; la oscuridad que hecha sustancia con el agua, abismal, vertiginosa, pesada y animada en una gran bestia, se vuelve un todo que nos absorbe. Un biólogo, como representante del pensamiento objetivo, dejará de lado la metafísica y se preguntará más bien por la identidad taxonómica e histórica del supuesto monstruo marino sin darse cuenta que es quizá en lo profundo y oscuro de lo mítico donde debe comprender lo que por profesión busca.

El libro de Jonás designa al enorme animal con el vocablo hebreo *dag gaddol*, que significa gran pez y cuyo significado se conserva en la Biblia. La traducción al griego por los setenta y dos rabinos de Alejandría en el siglo III a.n.e. como *ketei megalo* o gran cetáceo inmediatamente se interpretó como la ballena y así se ha extendido popularmente hasta nuestros días. En 1851 Melville desarticula esta línea lógica y en *Moby Dick* decide que, siguiendo a Jonás, considera a la ballena como un pez. Pese a que Aristóteles había distinguido a las ballenas como diferentes de los peces, su identidad siempre fue motivo de confusión hasta que, con la teoría de la evolución y la taxonomía moderna, se les clasificó como mamíferos. Así, las representaciones y mitos de ballenas monstruosas abundan en la literatura hasta mediados del siglo XIX. Esta condición indefinida y el drama del profeta Jonás los encontramos plasmados por Paul Gustav Doré en uno de los magníficos grabados que en 1865 hiciera para ilustrar la Biblia.

Ahí se encuentra Jonás sobre una roca, expiado, en un aparente primer plano, en medio de un paisaje de tinieblas. Una luz tenue, cuyo origen no se ve proveniente de algún hueco entre las nubes, ilumina la orilla donde Jonás ha sido recién arrojado por el monstruo marino. A la vez que con expresión de profundo arrepentimiento contempla la claridad que anuncia su salvación, el

profeta parece arrastrarse a un lugar más a resguardo de las olas que también alumbradas se insinúan amenazantes sobre la orilla, como advertencia.

Contrastante, pero no en forma abrupta, la luminosidad se restringe a una pequeña porción de la imagen cediendo ante la oscuridad que la envuelve. Al fondo, una claridad lejana y leve por encima de las nubes sólo hace evidente el horizonte lejano en el que se extiende el océano inmenso e insondable, henchido y denso de sombras como diría Poe o, en palabras de Melville.

"...for here, millions of mixed shades and shadows, drowned dreams, somnambulisms, reveries; all that we call lives and souls, lie dreaming, dreaming still; tossing like slumberers in their beds; the ever-rolling waves but made so by their restlessness."

Al borde de las aguas iluminadas, pero sin ser tocada por la luz, sobresale el lóbulo de una cola de cetáceo que ondulante apunta a Jonás y se aleja de él hacia un gran dorso sobre el que se alojan dos aletas falcadas que se sacuden como velas ante un viento fuerte, un cuerpo cuya fuerza también parece inconmensurable y alrededor del cual el agua se agita turbulenta. La cabeza del cetáceo ya se ha sumergido y sólo se ve un soplo que, junto con las olas rompiendo en la orilla y la cola que concentra el impulso del animal, traza una parábola imaginaria que se cierne sobre el profeta, aunque la ballena se aleja ya hacia el fondo, una región de oscuridad con la que se confunde. Este es un espacio hacia el cual la luz nos impide asomar, de él no percibimos sino la profundidad, absoluta, sin dirección o hacia todos lados, y un silencio pesado y lejano que contrasta con el romper de las olas iluminadas. Las tinieblas, el océano animado, la ballena devienen así en un todo indivisible; la oscuridad es tan densa como el agua, la ballena tan grande como el océano. En

una noche tempestuosa en altamar, un hombre que cae por la borda más que sumergirse en el agua, es tragado, absorbido por una sombra enorme y terrible como cuenta el profeta náufrago.

"Cercáronme las aguas hasta el punto de quitarme la vida; encerrado me he visto en el abismo: el inmenso piélago ha cubierto mi cabeza." Jonás (II.6.).

La imagen que Doré nos ha legado con su Jonás, la misma que Melville insinúa en Moby Dick y Poe con toda su obra, parece una imagen híbrida de lo que Bachelard (1942) describe como el agua muerta y el agua violenta. Así, al identificar un mismo ensueño en tres hombres distintos que comparten el mismo momento histórico, tal vez podamos indagar sobre lo real en lo metafísico. Como condenados por lo objetivo en el desarrollo del pensamiento, casi al mismo tiempo en que Bachelard alumbró lo imaginario, Olson (1947) encuentra la transición a la realidad. Moby Dick, la alba sombra de la gran ballena, atormenta y envuelve al Capitán Ahab, norteamericano exaltado o más bien alienado, deshumanizado por la obsesión de la venganza. Como si estuviese perdido en la profunda oscuridad del cuadro de Doré habiendo transgredido la luz de la redención, Ahab confiesa su profundo destino:

"...This lovely light, it lights not me; all loveliness is anguish to me, since I can ne'er enjoy. Gifted with the high perception, I lack the low, enjoying power; damned, most subtly and most malignantly ! damned in the midst of paradise !"

Su empeño no es sino la búsqueda por el dominio de la naturaleza, la caza de la gran ballena que, allende el Cabo de Hornos, abre la expansión de una de las industrias más importantes de los Estados Unidos en el siglo XIX, cubriendo y dominando los océanos de todo el mundo. El desarrollo del capitalismo no pudo superar la oscuridad, las leyendas y terrores sobre las ballenas de ninguna forma que no fuese la oscuridad misma, la muerte de los grandes cetáceos, la apropiación de los recursos naturales. La invención del arpón disparado por un cañón en 1864 y de los buques fábrica a principios del siglo XX, hicieron posible la caza de ballenas y su procesamiento en altamar en gran escala dando acceso también a la captura de los rorcuales cuya velocidad y mayor densidad que el agua de mar los había marginado de la industria ballenera. Pronto desaparecieron los mitos de los grandes cetáceos dejando su lugar al exterminio. La Comisión Ballenera Internacional, creada en 1946, intentó regular estas actividades para mantener una captura máxima autosostenible que no pudo evitar la depleción de las poblaciones de todos los grandes y muchos pequeños cetáceos y en 1983 se debió declarar una moratoria para la caza comercial. El capital, con cierta ayuda de la dictadura proletaria, había triunfado sobre la oscuridad consumando la venganza de Ahab.

Ya haya sido por la acción de grupos conservacionistas que, a partir de la década de los setentas han desarrollado una labor intensa en contra de la industria ballenera, pero sobre todo por motivos de conveniencia política y económica, la captura comercial de los grandes cetáceos ha desaparecido quedando solamente algunas formas de caza para subsistencia. A partir de ello, las poblaciones de las grandes ballenas se han recuperado en distinta medida habiendo especies como la ballena gris, *Eschrichtius robustus*, que en la actualidad es incluso más abundante de lo que fue antes de su caza, y otras como la ballena de Groelandia, *Balaena mysticetus*, cuya población es muy pequeña y se encuentra

amenzada. Ahora un biólogo puede preguntarse qué clase de dominio es este que, habiendo llevado al borde de la extinción a muchas especies de grandes ballenas y habiéndolas tenido al acceso de la disección, no se tienen conocimientos elementales sobre muchas de ellas. Aunque la industria ballenera promovió la investigación sobre los grandes cetáceos, particularmente de sus poblaciones y su reproducción, y a pesar de que mucho de lo que sabemos deriva de eso, no se tiene información completa sobre el tamaño de las poblaciones, su estructura en subgrupos, su estructura en edades y sexos ni de muchos aspectos de la reproducción. Es generalizado entre las especies de mamíferos marinos que éstas se explotaron hasta casi extinguirlas sin que hubiese conocimientos biológicos básicos (Gaskin 1982).

El estudio de los mamíferos marinos, como toda la biología, atraviesa un periodo de transformaciones en la búsqueda de información más sistemática y relevante (Gaskin 1991). Este proceso suele asociarse y confundirse con la aplicación de alta tecnología y el abandono de los métodos de investigación tradicionales. Aparejada, la aproximación naturalista hacia un conocimiento íntegro, para algunos ingenua, es desplazada por la especialización extrema tan común en la biomedicina, de modo que el estudio de los mamíferos marinos parece fragmentarse y depender de los adelantos técnicos, como si el concepto de una investigación fuese una cuestión de moda. Animados por la aventura, muchos estudios y observaciones de mamíferos marinos aportan información poco importante en relación al esfuerzo, independientemente de si usan o no recursos técnicos sofisticados. El problema de avanzar en el conocimiento de los mamíferos marinos consiste, en opinión del autor, en integrar la información proveniente de disciplinas distintas y en buscar su formalización científica de modo que, el trabajo de colaboración también optimice los esfuerzos de investigación. El estudio de los mamíferos marinos deviene así como un problema conceptual y de organización de la comunidad científica más que una cuestión sola de técnica.

La investigación no es ajena al contexto socioeconómico y deben reconocerse las tendencias de la actividad científica en cada lugar de acuerdo a ello. Así, en dos situaciones extremas, mientras que en países como Estados Unidos, el uso de alta tecnología en el estudio de los mamíferos marinos y sus costos elevados deriva en parte de intereses militares y políticos, a veces con el disfraz del ecologismo, en países como México no existe o falta información básica de los animales habiendo problemas de conservación que afectan actividades económicas como la pesca, a la que se dedica uno de los sectores más pobres de la población, y problemas de extinción inminente como el caso de la vaquita de mar, *Phocoena sinus*, en el alto Golfo de California.

El estudio de las poblaciones naturales ha avanzado en gran medida por la aplicación de las técnicas bioquímicas a finales de los sesentas y de la genética molecular durante los setentas y ochentas. Asimismo, con la genética de poblaciones se han desarrollado métodos de estudio de las poblaciones naturales con una base teórica formal (Lande 1991). El concepto de variabilidad genética, por ejemplo, es por sí mismo un criterio de evaluación del estado de una población. Gracias a las aplicaciones de la genética molecular en la investigación de las poblaciones naturales se han podido además inferir diversos aspectos de su estructura, dinámica e historia así como conocer los hábitos en la reproducción, individuales y colectivos. El estudio de la genética de las poblaciones, por ello, ha permitido fundamentar estrategias de conservación de diversas especies amenazadas (Cohn 1990) e incluso preservar especies formalmente extintas como el gorrión *Ammodramus maritimus nigrescens* mediante hibridación (Li y Graur 1991).

Al respecto de los mamíferos marinos, uno de los problemas más graves que se enfrentan en la protección de estos animales radica en que su genoma es conservado, evoluciona con tasas pequeñas y, como muchas especies se recuperan a partir de haber quedado sólo unos cuantos individuos, se ha encontrado que éstas presentan una variabilidad genética muy baja. Ello puede limitar

fuertemente el crecimiento poblacional en virtud de los efectos de la endogamia en la reproducción y de que las variaciones estocásticas demográficas y ambientales generan una alta probabilidad de extinción. Por ello, el estudio genético de los mamíferos marinos es prioritario para conocer mejor sus poblaciones, evaluar sus posibilidades de recuperación y su respuesta, en términos evolutivos, a la captura y otras actividades humanas (Harwood y Hall 1990, Hoelzel y Dover 1988, Lande 1991).

Antes de diluir por completo la imagen de la ballena en el detalle de la genética de una especie, como cualquiera que busca el conocimiento objetivo, el autor se atiene a descubrir lo que ignora conforme investiga y debe declarar, como Melville naturalista al tratar sobre la clasificación de los cetáceos:

"...I promise nothing complete; because any human thing supposed to be complete, must for that very reason infallibly be faulty."

Porque en el conocimiento, como en el cuadro de Doré, la luz y la oscuridad no pueden ser una sin la otra.

ANTECEDENTES

La genética de los cetáceos.

La información sobre los genomas de los cetáceos se obtuvo inicialmente con la descripción de los cromosomas. El primer cariotipo descrito en el orden fue el de la marsopa de Dall, *Phocoenoides dallii*, por Makino en 1948 y luego de ello estos estudios fueron muy escasos. A partir de la aplicación del cultivo de tejidos al análisis citogenético de los cetáceos por Walen y Madin en 1965, ha sido posible describir los cariotipos de muchas especies del orden. Se ha encontrado que el cariotipo de los cetáceos es muy uniforme y, con pocas excepciones, estos animales tienen un número de cromosomas $2n=44$ con el mismo patrón general (Árnason 1974). Las familias Physeteridae, Ziphiidae y Balaenidae tienen cariotipos con $2n=42$ cromosomas pero varios detalles, como la región organizadora del nucleólo, indican que derivan del cariotipo patrón del orden (Árnason 1981, Árnason y Benirschke 1973, Árnason et al. 1977, Benirschke y Kumamoto 1978, Jarrel 1979).

La conservación del cariotipo de los cetáceos se debe, según Árnason (1972), a lo siguiente. La tasa de reproducción de los cetáceos es baja lo cual obedece a que su madurez sexual es tardía en comparación a otros mamíferos y a que las hembras no tienen más de una cría por año. Estos animales son muy vágiles en un medio que no tiene barreras geográficas bien definidas y los cetáceos, en general, no forman grupos endogámicos reducidos sino que viven en grandes manadas. Así, en los cetáceos, el tamaño efectivo de las poblaciones se aproxima al tamaño poblacional total y existe un alto flujo génico lo cual desfavorece la propagación de variantes cromosómicas (Baker et al. 1987, Bush et al. 1977, Wilson et al. 1974, 1975). Sin embargo, dentro del patrón cariotípico de cada especie existen muchas variaciones individuales en la longitud de las bandas C que se deben a la acumulación diferencial de heterocromatina (Árnason 1974, Árnason

et al. 1980) y no es posible realizar un análisis comparativo hasta disponer información sobre esta variabilidad (Árnason 1974). Por este motivo, existe también heteromorfismo entre cromosomas homólogos en un mismo individuo lo que podría hacer a cada individuo cariológicamente único. Por ello, el estudio de la variabilidad cariotípica ha sido útil como recurso de identificación y para discernir relaciones genéticas entre individuos como se ha evaluado en el género *Stenella*, el cual ha sido el más afectado por la pesquería del atún en el Pacífico (Stock 1981) y en las ballenas jorobadas, *Megaptera novaeangliae*, donde se han encontrado regiones variables en el cariotipo que muestran diferencias en el patrón observado en las bandas R entre la población del Atlántico norte y la del Pacífico norte (Lambertsen y Duffield 1987).

La conservación del cariotipo de los cetáceos y la compatibilidad citogenética ante algunas variaciones, permite que entre distintas especies de cetáceos existan híbridos los cuales se han observado en vida libre y en cautiverio. Algunas de estas cruzas son entre el tursión, *Tursiops truncatus*, y el delfín de Risso, *Grampus griseus*, entre *T. truncatus* y la orca falsa, *Pseudorca crassidens*, y entre *T. truncatus* y la orca, *Orcinus orca* (Gaskin 1982, Leatherwood y Reeves 1983, Nishiwaki y Tobayama 1982). La reproducción entre diferentes especies puede incluso originar híbridos fértiles como los de la ballena azul, *Balaenoptera musculus*, y la ballena de aleta, *Balaenoptera physalus* (Árnason et al. 1991b). Además de los problemas que esto implica para el concepto de especie y sobre los mecanismos de aislamiento, el hallazgo de híbridos fértiles hace considerar que gran parte de los problemas taxonómicos y de reconocimiento de unidades demográficas de los cetáceos deriva de la hibridación como sugirió Gaskin (1982).

En los mamíferos, la tasa de evolución cromosómica es mayor que la de otros vertebrados y, como los rearrreglos cromosómicos limitan la recombinación y producen desequilibrio genético en los gametos, pueden ocurrir procesos de aislamiento que, en los mamíferos, son la base de la especiación. En algunas taxa como los équidos, los roedores y los lagomorfos, la formación de grupos hace que el tamaño efectivo de las poblaciones sea pequeño y eso permite probabilidades comparativamente mayores de fijación de mutaciones cromosómicas (Bush *et al.* 1977, Wilson *et al.* 1974, 1975). En los cetáceos, los rearrreglos cromosómicos se deben fundamentalmente a la acumulación diferencial de heterocromatina (Árnason 1974) cuyo mecanismo puede ser la recombinación desigual entre cromosomas homólogos o la replicación regional redundante (Ohno 1970) y su dinámica puede modelarse como una cinética química de orden n (Medrano *et al.* 1991). Se ha postulado que este fenómeno impide el entrecruzamiento en las regiones próximas a los límites entre eucromatina y heterocromatina de manera que, al restringir la recombinación y de existir alguna segregación entre los individuos, puede inducirse aislamiento genético (Árnason 1974, Árnason *et al.* 1978, 1980, Jarrell 1984).

Aunque el estudio de la variabilidad cariotípica es útil para comprender distintos procesos genéticos y reproductivos, y porque a la vez permite determinar el sexo de los animales, el análisis citogenético presenta varias dificultades técnicas como la conservación de tejidos vivos y libres de contaminación, el cuidado de los cultivos celulares y diversos problemas de medición y análisis de las bandas cromosómicas. Las variaciones cromosómicas no pueden cuantificarse fácilmente y no puede suponerse la existencia de regularidad temporal como en los cambios moleculares en los que las comparaciones pueden asociarse a tiempos definidos (Baker *et al.* 1987, Wilson *et al.* 1977).

Con el desarrollo de las técnicas de análisis de ácidos nucleicos utilizando enzimas de restricción y con el surgimiento de los métodos de secuenciación a finales de los setentas, surgió la posibilidad de analizar la variabilidad génica en las

poblaciones naturales con la resolución de la secuencia nucleotídica y, a partir de ella, ha sido posible inferir diversos aspectos de la estructura y dinámica poblacional, hábitos o regularidades reproductivas, la historia reciente de las especies y sus relaciones filogenéticas. Sin embargo, los costos de estas investigaciones son elevados y requieren de laboratorios con una infraestructura considerablemente desarrollada. Un avance técnico importante que ha permitido aplicar la genética molecular en el estudio de las poblaciones ha sido el de amplificación por la reacción de polimerización en cadena (PCR), pues ha simplificado el procesamiento del material biológico y disminuido los costos de estas investigaciones de manera que, a partir de su surgimiento a mediados de los ochentas, se ha generado una gran cantidad de información sobre la variabilidad genética de los organismos en la naturaleza (Palumbi et al. 1991a,b).

Aunque los costos de los estudios genéticos en poblaciones naturales aún son elevados, estos pueden realizarse mediante la organización de distintas formas de trabajo colectivo y, como estos estudios en general presentan problemas diversos de la biología, simultáneamente se favorece la interacción de especialistas distintos y la integración de su trabajo. Algo positivo de la genética molecular en el estudio de las poblaciones radica en que no solamente proporciona información de tipo histórico, sino que además brinda la oportunidad para desarrollar una aproximación analítica de la dinámica de la evolución como tal y las regularidades que presenta (Kauffman 1992).

Las investigaciones de genética molecular en los cetáceos también muestran que su genoma está conservado y sugieren una reinterpretación del registro fósil y de la filogenia del orden (Árnason y Widegren 1984a,b, Milinkovitch et al. 1993, Novacek 1993, Schlöterer et al. 1991). También, existen estudios en la identificación de individuos e inferencias poblacionales (Amos y Hoelzel 1990, Hoelzel y Dover 1988). El rorcual común o de aleta, *B. physalus*, en el Atlántico norte es uno de los cetáceos cuyo genoma se ha estudiado con más detalle. Se ha mostrado que si bien

existe fidelidad de estas ballenas a sus destinos migratorios, lo cual favorece la formación de subpoblaciones, se observan diferencias genéticas de un mismo lugar en años distintos que sugieren una subestructura de estas subpoblaciones en manadas (Árnason et al. 1991).

Asimismo, el análisis de las tasas de sustitución nucleotídica en los cetáceos ha generado nuevas perspectivas en la comprensión de los relojes moleculares. En las grandes ballenas se observa que la tasa de sustitución, en el genoma mitocondrial, es menor que lo esperado para su tiempo generacional y se ha propuesto que ello se debe a que estos animales, por su tamaño, tienen una tasa metabólica relativa menor que la de otros animales por lo que, no habiendo mecanismos de reparación de DNA en la mitocondria, la tasa metabólica afecta la tasa de mutación. De esta forma se postula que no sólo el tiempo generacional, sino también la tasa metabólica y, en general cualquier parámetro biológico que dependa del tamaño, afectan el reloj molecular (Martin y Palumbi 1993). Esto concuerda con que, en los euterios, la tasa de evolución cromosómica correlaciona con el tamaño, esto es, las especies más grandes presentan un cariotipo más conservado (Bengtsson 1980).

En gran parte de los estudios de genética molecular en los mamíferos marinos se analiza el DNA mitocondrial porque su estructura se conserva en los mamíferos, esto es, evoluciona fundamentalmente por sustituciones nucleotídicas, sus componentes evolucionan a distintas tasas que permiten estudiar variaciones desde el nivel de poblaciones hasta el de clases, no se conocen elementos transponibles que originen procesos de deriva molecular y, al heredarse por vía materna, el DNA mitocondrial permite inferir algunos aspectos de los hábitos reproductivos y no presenta problemas de interpretación por recombinación (Awise et al. 1988, Hoelzel y Dover 1988, Kocher et al. 1989, Palumbi et al. 1991a,b, Wilson et al. 1985). El genoma mitocondrial de los cetáceos es similar al del resto de los mamíferos aunque solamente se ha secuenciado por completo el del rorcual común, *B. physalus*

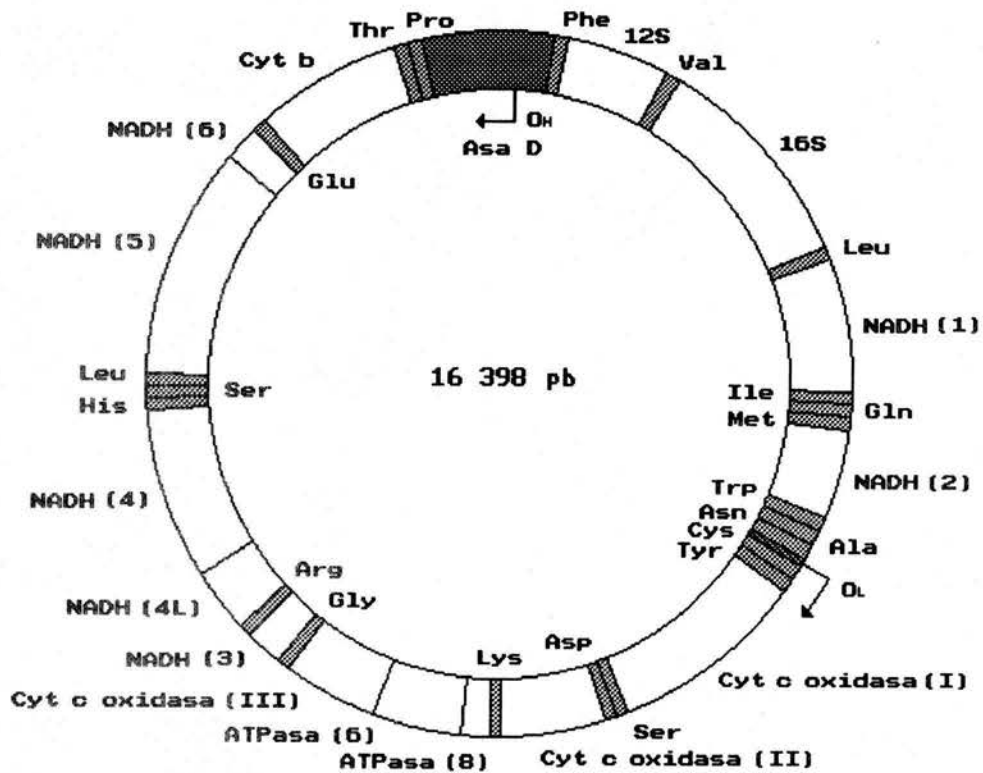


Figura 1. Esquema del genoma mitocondrial de *B. physalus* (Árnason et al. 1991a).

(Figura 1). Los análisis de variabilidad genética se circunscriben en gran medida al asa D, o región controladora, el cual es un gen de aproximadamente 900 pares de bases (pb) que regula la replicación y la transcripción del genoma mitocondrial y en el que existe un sitio de origen para la replicación (Levin 1990). La ballena jorobada es tal vez el cetáceo en el que más extensamente se ha analizado la variabilidad genética en el asa D y del que se dispongan más secuencias aunque también se ha secuenciado este gen en otras especies de ballenas y delfines (Árnason 1991, Árnason et al. 1991a, Baker et al. 1993, Hoelzel et al. 1991).

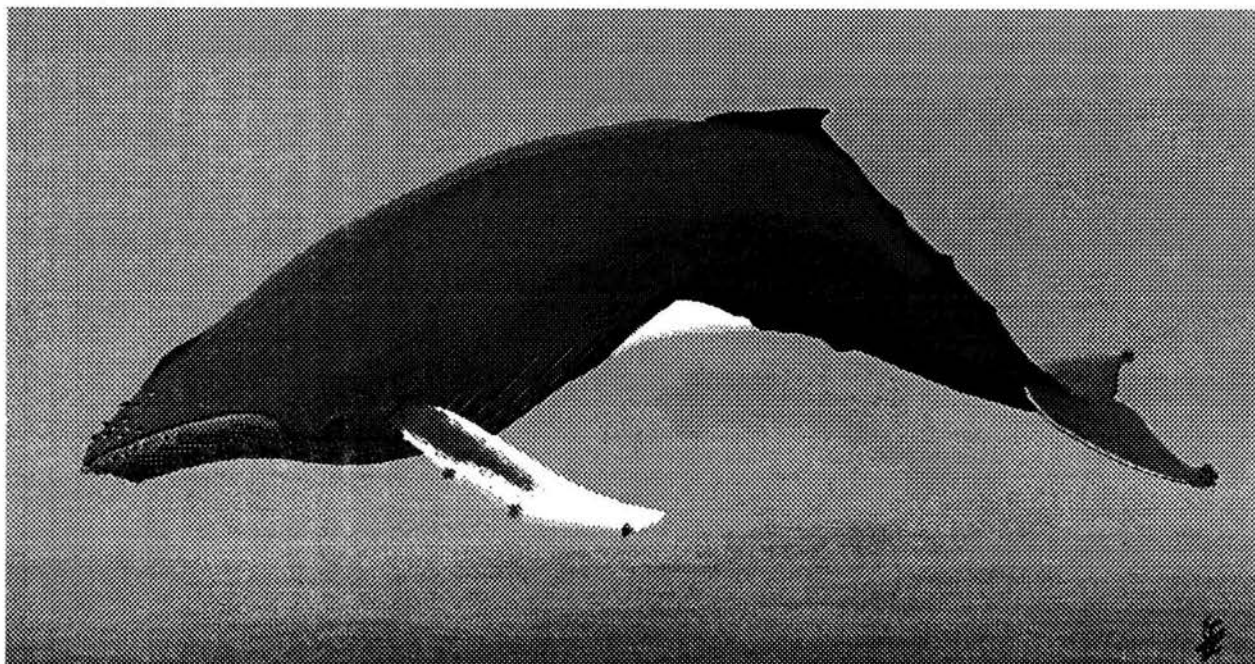


Figura 2. La ballena jorobada. Especie en la que las hembras son un poco más grandes que los machos llegando a medir hasta 16 m de longitud y pesar 40 toneladas.

Sobre el rorcual jorobado.

La ballena jorobada, *Megaptera novaeangliae* (Borowski 1781), recibe también los nombres de yubarta (del francés *gibarte* o *jubarte*) y rorcual jorobado debido a que su aleta dorsal se encuentra sobre una giba (Figura 2). El término rorcual, que se aplica a todas las especies de la familia Balaenopteridae, deriva

del vocablo nórdico *rorval* que significa ballena de surcos y hace referencia a los pliegues ventrales característicos de la familia (Watson 1981). *M. novaeangliae* es una especie que se distribuye en océanos de todo el mundo y de la que se reconocen tres poblaciones principales: en el Antártico, el Atlántico norte y el Pacífico norte. Estas ballenas migran de latitudes altas, donde se alimentan, a regiones subtropicales para reproducirse durante la temporada fría del año (Scammon 1874), aunque existe evidencia de que pueden alimentarse ocasionalmente en zonas de reproducción (Gendron y Urbán 1993). En el Pacífico norte se distinguen tres subpoblaciones (Figura 3). Las ballenas del grupo asiático se alimentan en el mar de Okhost y alrededor de la Península de Kamchatka y se reproducen en el Pacífico occidental alrededor de las Islas Marianas, Corea del Sur, las Islas Ryukyu, Taiwán y las Islas Bonin. Las ballenas del Pacífico central tienen sus zonas de alimentación frente a las costas de Alaska y se reproducen alrededor de las Islas Hawai. Las ballenas jorobadas de la subpoblación americana se alimentan frente a la costa de California y sus zonas de reproducción se encuentran en el borde sur de la Península de Baja California, la costa occidental de México, desde Sinaloa hasta el Istmo de Tehuantepec, e incluso Costa Rica, y las Islas Revillagigedo. Ocasionalmente se observan ballenas jorobadas en el alto Golfo de California en distintos meses del año (Aguayo et al. 1985, Darling y McSweeney 1985, Nishiwaki 1966, Rice 1974, Steiger et al. 1991, Urbán y Aguayo 1987).

Como otras especies de mamíferos marinos, las ballenas jorobadas se cazaron hasta casi provocar su extinción. En el Atlántico noroccidental viven de 4 400 a 6 300 animales de una población original de 5 500 individuos mientras que en el Hemisferio sur hay más de 3 000 rorcuales jorobados de una población, que previo a la captura comercial, era de aproximadamente 100 000 animales (National Marine Fisheries Service 1991).

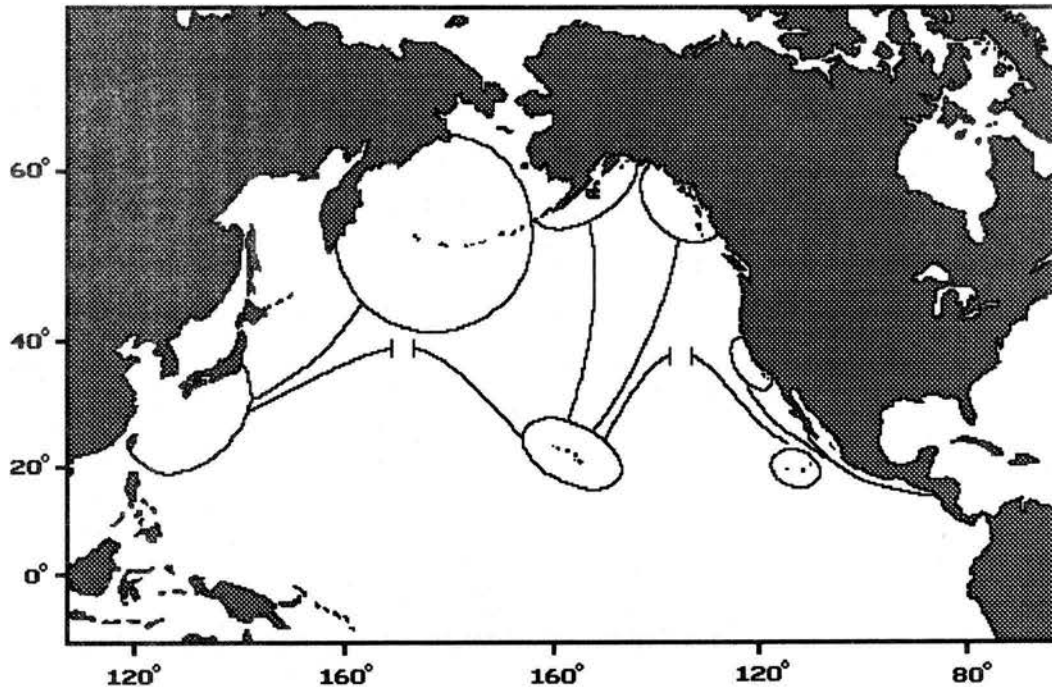


Figura 3. Movimientos migratorios y áreas de distribución estacional de las ballenas jorobadas en el Pacífico norte. Las líneas discontinuas indican reavistamientos en años diferentes en distintas zonas de reproducción. Modificado de Baker (1992).

En 1965 la Comisión Ballenera Internacional prohibió la captura comercial de la ballena jorobada en el Pacífico norte y se estima que en ese año quedaban menos de 1 000 animales, tal vez 500, de una población original de 12 000 a 20 000 individuos (National Marine Fisheries Service 1991, Rice 1974, 1978, Wolman 1978). Se estima que en Hawai puede haber actualmente de 1 100 a 1 700 ballenas jorobadas (Baker y Herman 1987, Darling y McSweeney 1985, Darling y Morowitz 1986, Perry et al. 1990). En México, diversos trabajos (Alvarez 1987, Alvarez et al. 1990, Campos 1989, Urbán y Aguayo 1987, Urbán et al. 1989), indican que esta fracción

de la población de rorcuales jorobados se está incrementando y puede haber de 1 000 a 1 600 animales. Estimaciones aún no publicadas de los Grupos de mamíferos marinos de la Facultad de Ciencias UNAM y la Universidad Autónoma de Baja California Sur, indican que pueden haber poco más de 2 000 ballenas jorobadas en todo el Pacífico mexicano.

Actualmente, sólo existen algunas formas aborígenes de captura del rorcual jorobado pero se le considera aún como una especie amenazada debido a que sus hábitos costeros la hacen particularmente susceptible a los efectos de la contaminación en el mar y del tráfico de embarcaciones (Johnson y Wolman 1984, National Marine Fisheries Service 1991). Ya que el hombre ha afectado u ocupa parte del hábitat original de las ballenas jorobadas, no se considera posible que sus poblaciones lleguen a recuperarse completamente. Asimismo, las medidas de conservación de una ballena pueden afectar a otras especies de misticetos y, por ello, se busca que en general las poblaciones de ballenas alcancen 60-80 % de su abundancia antes de la explotación comercial pues en esos niveles se tiene la mayor tasa de recuperación en la curva logística de crecimiento poblacional (National Marine Fisheries Service 1991).

Gran parte de la información que actualmente se dispone acerca de las ballenas jorobadas sobre su abundancia, hábitos migratorios y ciclos reproductivos se ha obtenido a partir de la identificación fotográfica de los individuos por sus aletas dorsal y caudal (Katona y Whitehead 1981). El análisis de los catálogos fotográficos muestra que las ballenas jorobadas son fieles a sus zonas de alimentación y reproducción aunque, en estas últimas, hay una mezcla de alrededor de 2 % entre las subpoblaciones de Hawai y México (Baker *et al.* 1986, Perry *et al.* 1988, 1990). También, se ha reportado recientemente un reavistamiento entre las zonas de reproducción en Hawai y Japón (Darling y Cerchio 1993).

La filopatría o constancia en los destinos migratorios resulta del aprendizaje de los animales en sus primeros años de vida acompañando a sus madres o a manadas más o menos cohesionadas en las zonas de alimentación (Baker et al. 1987, Perry et al. 1990). La regularidad en los hábitos migratorios de los animales determina la estructura geográfica, y consecuentemente genética, de la población (Baker 1992, Baker et al. 1990, 1993).

Ya que los hábitos migratorios resultan fundamentalmente del aprendizaje durante la lactancia, la ballena jorobada se ha estudiado genéticamente mediante el análisis del DNA mitocondrial (Baker 1992, Baker et al. 1990, 1993). El análisis de la variabilidad en el genoma mitocondrial de las ballenas jorobadas en el Pacífico nororiental ha mostrado que en los animales que se alimentan frente a Alaska se encuentra solamente el tipo mitocondrial denominado A mientras que en las ballenas que se alimentan frente a California se observan los tipos denominados E y F. En el muestreo realizado en Hawai se ha encontrado fundamentalmente el tipo A y un tipo F proveniente de California. En Baja California, sin embargo, se encuentran los tipos A, E y F en proporciones similares. Aunque existe cierta mezcla de las subpoblaciones central y americana en las zonas de reproducción, las diferencias genéticas entre la subpoblación Alaska/Hawai y California/México son significativas. Asimismo, en el Pacífico mexicano (Baja California) se ha observado la diversidad genética más alta del Pacífico nororiental (Baker 1992, Baker et al. 1993).

No existen indicios de que las ballenas jorobadas visitaran Hawai antes del siglo XIX ni en los registros de los barcos balleneros ni en ninguna evidencia histórica de los nativos hawaianos de los que se sabe que conocían a los cachalotes. Los habitantes de Tonga y otros polinesios, que forman parte de la misma cultura a la que pertenecen los hawaianos, además de conocer las ballenas jorobadas provenientes del océano antártico, fueron en el pasado cazadores de grandes cetáceos. Por ello, es probable

que la subpoblación de ballenas jorobadas del Pacífico central se haya formado durante los últimos 200 años separándose de la subpoblación americana debido a cambios en los hábitos migratorios intensificados por la captura de estos animales y por modificaciones a largo plazo en la temperatura superficial del océano (Herman 1979). El carácter monotípico de la variabilidad genética y la ausencia de tipos característicos en Hawai es coherente con ello.

La identificación fotográfica indica que las agregaciones de ballenas jorobadas en la costa mexicana del Pacífico y en Baja California son una misma y que en el verano estos animales se alimentan frente a la costa de California central. Las ballenas de las Islas Revillagigedo son aproximadamente 1 000 animales y pueden ser una agrupación distinta a las de la costa mexicana en virtud de los escasos reavistamientos entre ambas zonas y de que estos animales no han sido identificados en sus zonas de alimentación con excepción de seis avistamientos dispersos realizados entre las cercanías de Vancouver y la zona de las Islas Aleutianas (Darling y Jurasz 1983, Jacobsen en comunicación personal, Ladrón de Guevara et al. 1993, Perry et al. 1988, 1990, Urbán y Aguayo 1987, Urbán et al. 1989).

Planteamiento de la investigación.

El presente estudio se desarrolla en el siguiente contexto. Es necesario determinar si los diferentes destinos migratorios corresponden a grupos reproductivos distintos tanto a nivel de las tres grandes zonas de reproducción en el Pacífico norte como a nivel local en el Pacífico mexicano. Si es así, es necesario determinar la relación entre esos grupos. Con ello, se pueden inferir hábitos de los animales que no es posible observar en la naturaleza y pueden derivarse algunos aspectos de la historia reciente de la especie.

Con un mejor conocimiento de los hábitos reproductivos y de la variabilidad genética, se podría definir si el crecimiento de la población ocurre en condiciones de endogamia aunque hace falta analizar elementos génicos diploides. Con ello, se avanza en una evaluación del estado de la población y de sus posibilidades de recuperación a largo plazo. Finalmente, los datos de variabilidad genética dentro de una especie y entre diferentes especies aportan información sobre la evolución de los animales tanto en su aspecto histórico como en el de la dinámica que la subyace.

Por lo anterior, el presente trabajo consiste de un estudio de la variabilidad en la región del asa D mitocondrial de las ballenas jorobadas que se reproducen en la Bahía de Banderas, Nayarit, Jalisco y en el Archipiélago Revillagigedo, Colima, en particular, alrededor de la Isla Socorro. Esta información se obtiene a partir del análisis de muestras de piel y los datos se conjuntan con los existentes para Baja California, Hawai, California central y Sureste de Alaska (Baker 1992, Baker et al. 1993). Asimismo, se identifica el sexo de los animales de los que se recolectaron muestras lo cual se interpreta en conjunto con algunas observaciones hechas en el mar. Esto permite avanzar en el conocimiento de la estructura poblacional del rorcual jorobado, de sus hábitos individuales y colectivos y de su historia reciente en el Pacífico nororiental.

METODOS

Recolecta de biopsias.

En embarcaciones con motor fuera de borda y en conjunto con los esfuerzos de observación, fotoidentificación y registro de sonidos, se obtuvieron un total de 21 muestras de piel de ballenas jorobadas en la Bahía de Banderas, Nay., Jal. de 1990 a 1992 y 28 muestras en las inmediaciones de la Isla Socorro, Col. en 1991 y 1992. Adicionalmente, junto con C.S. Baker de la Universidad de Hawai, actualmente en la Universidad de Auckland, Jorge Urbán de la Universidad Autónoma de Baja California Sur y Lorenzo Rojas de la Universidad Autónoma de Baja California, se recolectaron 21 muestras alrededor de Los Cabos, BCS. durante 1991.

El sistema de recolecta se diseñó y construyó en la Facultad de Ciencias (Figura 4) y consiste de una flecha disparada con ballestas de 23-69 kg de empuje. La flecha lleva una punta que penetra 1 cm en la piel y retiene un fragmento en su interior después de rebotar en el cuerpo del animal. Un flotador permite recuperar la flecha en la superficie del agua y ésta se encuentra más fácilmente pintándola con un color brillante. El disparo se realiza a una distancia de 6 a 15 m que, en nuestra experiencia, es segura para los recolectores y permite el éxito del disparo. El comportamiento de las ballenas afecta la eficiencia de recolecta ya que la piel debe encontrarse tensa para evitar que el impulso de la flecha se disipe en el impacto. Por ello, se debe disparar por encima de la línea media del cuerpo y en la región abajo y posterior a la aleta dorsal la cual se estira considerablemente en el movimiento que los animales hacen previo a una inmersión. Cinco muestras consistieron de fragmentos de piel que las ballenas desprenden en el agua en conductas como saltos y coletazos.

Habitualmente, los animales responden al impacto de la flecha con una sacudida dorsoventral que, por su velocidad, parece un reflejo (Lambertsen 1987). Otros sistemas de recolecta (Lambertsen

1987, Mathews et al. 1988, Medway 1983, Weinrich et al. 1991) son más grandes que el diseñado para este trabajo y poseen dispositivos que implican rasgar la piel de manera que casi siempre afectan terminales nerviosas. El sistema desarrollado en la Facultad de Ciencias tiene una punta más pequeña y con un mecanismo de retención más sencillo que obtiene muestras más íntegras y fáciles de manipular. En forma preliminar, nuestro sistema ocasiona respuestas observables de las ballenas en el 60 % de los impactos mientras que con el diseño reportado por Weinrich et al. (1991) se registran respuestas en el 76 % de los casos. El efecto de la flecha en las ballenas depende de la conducta que realicen en el momento de la recolecta y de la forma en que se aproxime la embarcación de manera que con persecuciones cuidadosas las ballenas responden en forma menos violenta y menos duradera siendo posible obtener un índice de respuestas a impacto menor a 60 % (Clapham y Matilla 1993).

Las muestras se manipularon adhiriéndose lo más posible a condiciones de esterilidad y de acuerdo a procedimientos habituales de manejo de tejidos (Jakoby y Pastan 1979, Mathews et al. 1988). Una vez que las flechas se rescataron del agua, si las muestras se destinaban al cultivo de células o algún análisis histoquímico, éstas se colocaron en solución salina isotónica amortiguada con fosfatos 20 mmol/L a pH=7.4 estéril (PBS) y con antibióticos de amplio espectro (penicilina 400 U/ml, sulfato de estreptomicina 400 µg/ml, y fungizona 1 µg/ml). En tierra, las muestras se volvieron a lavar con PBS en una caja de Petri estéril dentro de una caja de acrílico aséptica. Las muestras se pasaron a un medio de cultivo para células de mamífero (RPMI, DMEM o McCoy) con antibióticos de amplio espectro (penicilina 200 U/ml, sulfato de estreptomicina 200 µg/ml, y fungizona 0.5 µg/ml), glutamina 2 mmol/L, amortiguado con fosfatos 20 mmol/L a pH=7.4, y se transportaron en frío. Alternativamente, las muestras se guardaron en suero fetal bovino (SFB) con 10 % de dimetil, sulfóxido (DMSO) y se transportaron en nitrógeno líquido. Una fracción de cada

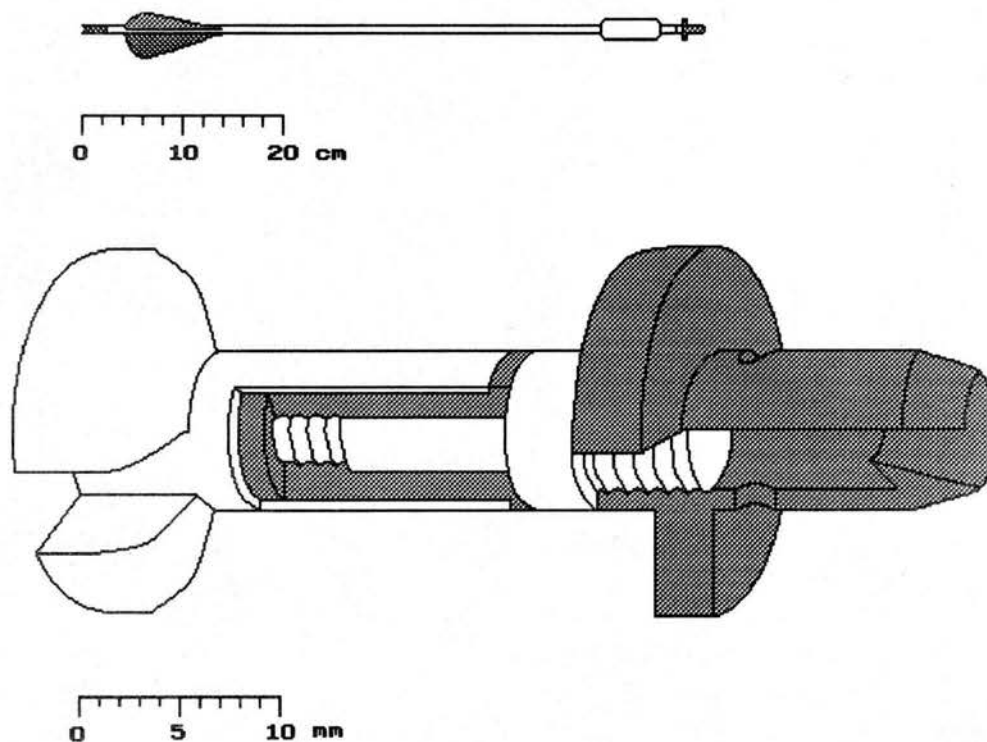


Figura 4. Sistema diseñado en la Facultad de Ciencias UNAM para obtener muestras de piel de cetáceos en vida libre.

biopsia se guardó en etanol 70 % o solución salina saturada con DMSO 20 % y se transportó en frío. Si las muestras se destinaban por completo al análisis de variabilidad molecular, éstas se guardaban directamente en etanol 70 % o solución salina saturada con DMSO 20 %.

Extracción de DNA.

El análisis de variabilidad molecular se hizo de acuerdo a procedimientos habituales (Innis *et al.* 1990, Palumbi *et al.* 1991b, Sambrook *et al.* 1989) en el Kewalo Marine Laboratory de la Universidad de Hawai.

Las muestras preservadas en etanol 70 % o solución salina saturada, se homogenizaron usando bisturíes y cajas de Petri estériles disponiendo aproximadamente 0.1-0.5 g de tejido que se agregaron a 1 000 μ L de solución amortiguadora RSB con proteinasa K (1 μ g) y SDS 20 %. Se incubó por una hora a 55°C antes de agregar 1 μ g más de proteinasa K para incubar a esa temperatura por 1-3 horas más hasta que se observáse una suspensión negra. Se hicieron extracciones con fenol neutralizado en solución salina saturada, la misma solución de fenol mezclada con cloroformo y alcohol isoamílico (24:24:1), y cloroformo-isoamil (1:1). El extracto se mezcló con acetato de amonio (7.5 mol/L) y etanol 95 % para precipitar el DNA el cual se lavó con etanol al 70 % para precipitarse y secarse. El DNA se resuspendió en 100-300 μ L de solución amortiguadora TE incubando a 55°C por 3 horas. De cada muestra se obtuvieron uno o dos tubos de este extracto.

El DNA extraído se determinó por medio de electroforesis en geles de agarosa 1 % en solución amortiguadora TBE 0.5X. 2 μ L del extracto se mezclaron con 2 μ L de colorante denso y 1 μ L de agua destilada para agregar a los geles. Las electroforesis se corrieron con DNA marcador de peso molecular de 1 000 ó 123 pares de bases (pb) a 100 V por 45 min. Los geles se tiñeron sumergiéndolos en bromuro de etidio 10 mg/L por 10-20 min y enjuagándolos en agua destilada por 5 min para luego fotografiarlos iluminados por luz ultravioleta.

Amplificación de DNA mitocondrial.

Se utilizó 1 μ L del extracto de DNA (aproximadamente 100 ng de DNA) para amplificar el asa D del genoma mitocondrial por la reacción de polimerización en cadena (PCR) el cual se agregó a 98 μ L de solución amortiguada conteniendo 2'-desoxinucleósidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 2 mmol/L cada uno, el primer biotinilado Dlp10, situado en el extremo del asa D contiguo al gen PRO tRNA, y un primer situado en el gen PHE tRNA (Pharmacia) 20 pmol/L cada uno, tris (pH=8.3) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 3

mmol/L, gelatina 0.01 %, NP-40 0.01 %, tritón X 100 0.01 % y 1-2 U/100 μ L de la polimerasa Taq (Perkin-Elmer Cetus). A las mezclas se agregaron 60 μ L de aceite mineral para evitar la evaporación y se sometieron a 40 ciclos de amplificación en un aparato de PCR (Perkin-Elmer Cetus) con el siguiente protocolo. Desnaturalización: 94°C x 30 seg, Acoplamiento del primer: 52°C x 1 min, Extensión: 72°C x 2 min. El producto del PCR se determinó en forma similar a la descrita para la extracción de DNA total utilizando 5 μ L del producto más 2 μ L del colorante denso y el marcador de 123 pb.

Secuenciación de DNA mitocondrial.

Se obtuvo DNA de una sola cadena para secuenciar añadiendo 40 μ L del producto de PCR a una fase sólida de 200 μ g de gránulos magnéticos, de acuerdo a Hultman et al. (1989), los cuales tenían estreptavidina que liga el extremo con el primer biotinilado Dlp10. Se hicieron series de dos lavados y una incubación por 60 min en solución amortiguadora BW para unir el producto a los granos y obtener la cadena no biotinilada luego de una incubación por 10 min con 8 μ L de NaOH 0.1 mol/L que se neutralizó con 4 μ L de HCl 0.2 mol/L y se amortiguó con 1 μ L de tris 2 mol/L (pH=7.5). Los granos magnéticos se lavaron con amortiguador TE y se resuspendieron en 5 μ L de amortiguador Rx para la reacción de secuenciación, 7 μ L de agua y 1 μ L del primer interno Dlp5 (1 nmol/L) dando un volumen total de 13 μ L. 4 μ L de la solución con la cadena no biotinilada se utilizaron para determinar DNA de una sola cadena en la forma descrita para la extracción de DNA y la amplificación. El resto de la fracción no biotinilada se mezcló con 3 μ L de solución Rx y 1 μ L del primer Dlp10 (1 nmol/L).

Se determinó la secuencia nucleotídica, en ambas cadenas complementarias, en una porción entre los primers Dlp10 y Dlp5, que es la región más variable del asa D, por medio del método de reacción de terminación (Sanger 1981, Sanger et al. 1977) utilizando el protocolo de la compañía United States Biochemical

con secuenasa versión 2.0. El DNA de una sola hebra se acopló al primer incubando a 65°C por 2 min y dejando enfriar lentamente para luego polimerizar 10 µL de esta preparación con la secuenasa (dilución 1/62 de la solución patrón) en una mezcla de dNTP 0.19 µmol/L, 5 µmol de [α -³⁵S]dATP (5 µCi), y ditioneitol 6.4 mmol/L. La mezcla de marcado (15.5 µL), se agregó a 2.5 µL de las soluciones de dideoxinucleótidos terminadores específicos de reacción (ddA, ddA, ddT, ddC) que contienen 80 µmol/L de dNTP y 8 µmol/L del dideoxinucleótido. Se incubó a 37°C por 5-10 min deteniendo la reacción con 4 µL de colorante denso.

Los fragmentos de DNA polimerizado se separaron en geles de acrilamida/bis-acrilamida (19:1) 30 % (Bio-Rad life science group 1989) con urea 8 mol/L en amortiguador TBE aplicando una corriente eléctrica con potencia constante de 100 W a una temperatura de 50°C por 3-5 horas. La electroforesis se realizó en forma vertical con TBE en el pozo del electrodo negativo y TBE con acetato de sodio 0.3 mol/L en el pozo del electrodo positivo. Los geles se fijaron con solución de metanol 5 %, ácido acético 5 % y se transfirieron a papel dejando secar a 65°C aplicando vacío por una hora. Los geles se expusieron a placas de autorradiografía por 1-5 días antes de revelarse.

Determinación del sexo.

El sexo de los animales de los que se obtuvieron biopsias, se determinó con el método de Palsbøll *et al.* (1992). Se amplificó el fragmento entre los primers ZFY1204 y ZFY0097 (Operon Technologies) que es homólogo en los cromosomas X e Y y tiene una extensión aproximada de 1 100 pb usando el protocolo de PCR descrito previamente mezclando 1 µL del extracto de DNA total con 49 µL de la solución de reacción y habiendo una concentración de los primers de 10 µmol/L y de MgCl₂ de 1.5 mmol/L (Figura 5). 15 µL del producto amplificado se mezclaron con 15 µL de solución amortiguada 2X para digestión con 12 U de la enzima de restricción Taq I (IBI). La mezcla se incubó por dos horas a 62°C para luego

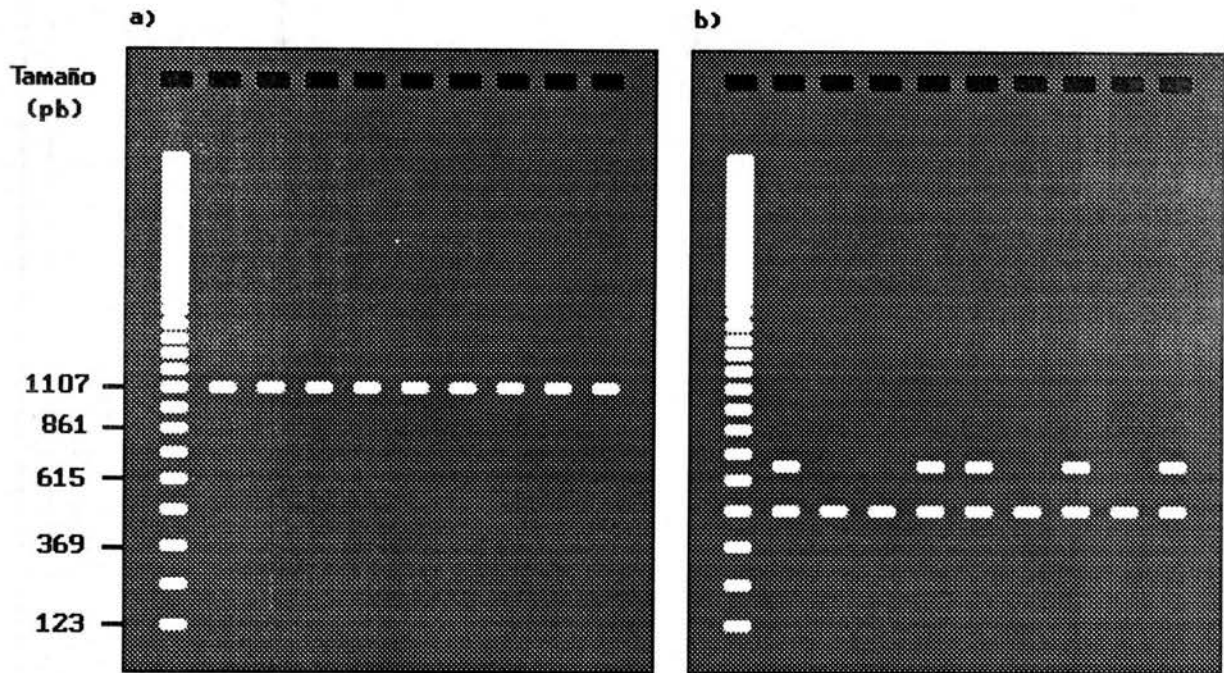


Figura 5. a) Esquema de un gel de agarosa en el que se muestra el segmento amplificado de los cromosomas X e Y, para determinación del sexo, a partir de extractos de DNA de nueve biopsias de piel de ballenas jorobadas. b) Esquema de un gel de agarosa luego de la digestión con la enzima Taq I en donde los carriles con una banda de 550 pb corresponden a hembras y los carriles con bandas de 550 y 700 pb son de machos.

identificar los productos de la digestión en la forma descrita para los extractos de DNA y los productos de PCR. En el cromosoma X existe un sitio de restricción a la mitad del fragmento lo que produce una sola banda de aproximadamente 550 pb. El cromosoma Y presenta el sitio de restricción alrededor de la posición 700 de manera que en los machos, se observan las bandas de 550 y 700 pb mientras que en las hembras aparece sólo una banda de 550 pb (Figura 5).

Análisis de datos.

Con excepción de los programas SIGMAPLOT (Jandel), STATGRAPHICS (Statistical Graphics), PCGENE (IntelliGenetics) y PAUP, (The Illinois Natural History Survey. Cortesía de S.R. Palumbi, C.S. Baker y L. Eguiarte), que se usaron respectivamente para graficar, hacer análisis de Fourier, y para alinear y agrupar secuencias, los datos se procesaron con los siguientes programas desarrollados por el autor en la Facultad de Ciencias UNAM para computadoras PC: GST (análisis de variabilidad genética incluyendo pruebas estadísticas), COALESCE (cálculo de distribución de tiempos de coalescencia), DERIVA (simulación de deriva génica), ENERDNA (cálculo de estabilidad de secuencias de DNA), VDEX (cálculo del perfil de variabilidad en secuencias alineadas), ALISAM (suavizamiento de series numéricas), DEFURULI (cálculo de índices Dws y Dyr), DIJ (cálculo de matrices Dij), ARREHDNA (análisis de distribución de Arrhenius en energías de secuencias de DNA), BARAJA (rearreglo aleatorio de una secuencia), SECAZAR (generación de secuencias aleatorias con composición al azar), PERIO4CP (cálculo de periodograma Cp) y PERLOCN (cálculo de periodicidad local).

RESULTADOS Y DISCUSION

Variabilidad en el asa D mitocondrial.

Se secuenció una región de 320 pb en el asa D para la que se encontraron ocho haplotipos los cuales forman dos cúmulos en acuerdo con los ensayos de restricción previos (Baker 1992, Baker et al. 1993). Los tipos A, AE, E1, E2, E3 y E4 presentan diferencias de uno a tres nucleótidos (0.31-0.94 %). Los tipos F1 y F2 se distinguen entre sí por una sustitución y difieren del cúmulo de tipos A y E en ocho a doce residuos (2.50-3.75 %). Los tipos de la ballena jorobada difieren de la secuencia de un rorcual de aleta, *B. physalus*, en 5.07-7.58 % (Figura 6). Los tipos F son similares a los tipos C del Hemisferio sur habiéndose distinguido por la presencia de un sitio de restricción para la enzima Ava II pero, en lo que hasta hoy se ha secuenciado del genoma mitocondrial de las ballenas jorobadas, algunos tipos C son iguales a los tipos F lo que pone en evidencia migraciones en el pasado y un intercambio probable entre ambos hemisferios en la actualidad (Baker 1992, Baker et al. 1990, 1993). Las secuencias de la Figura 6 se compararon por el método de parsimonia mediante el programa PAUP (cortesía de L. Eguiarte) sin que se obtuviera un dendrograma consenso adecuado. El arreglo topológico que se presenta en la Figura 7 deriva del mismo análisis hecho sobre datos de restricción de ballenas jorobadas de todo el mundo (Baker 1992, Baker et al. 1993).

El tipo A es el único que se encuentra en Alaska, es el tipo principal en Hawai y se observa en una proporción moderada en el Pacífico mexicano. El tipo AE se encuentra con poca frecuencia en la costa del Pacífico en México. Los tipos E y F son los únicos observados en las costas de California y los tipos más comunes en el Pacífico mexicano. El tipo E1 es el más abundante mientras que, con poca frecuencia, se encuentran el tipo E2 en la Bahía de Banderas y los tipos E3 y E4 en Baja California. En esta zona y en

		104	114	124	134	144	154	164	174
A	TGTATGTACT	ACCCACATAAC	CAACTGATAG	CACCTTCCAT	GGGTATGTAT	AATTGTGCAT	TCAATTATTT	TCACCACGAG	
AEA.....
E1
E2
E3T.....
E4
F1A.T.....	.A.....C.....
F2A.T.....	.A.....C.....C
Bp
		184	194	204	214	224	234	244	254
A	CAGTAAAGC	TCGTATTAAT	TTTATTAATT	TTACATATTA	CATAATATGT	ATTAATAATA	CAATAGTACA	TGTCCTTATA	
AE
E1
E2
E3T.....
E4
F1C.....
F2C.....
BpG.....G..CG..T.....G
		264	274	284	294	304	314	324	334
A	AATTCCCAGG	TCCATTTAAA	TCAAATGATC	TCTATGGCCG	CTCCATTAGA	TCACGAGCTT	AATCAGCATG	CCGCGTGAAA	
AE
E1C.....
E2G.C.....
E3C.....
E4C.....
F1T.....GCT.....
F2T.....GCT.....
Bp	C..C.....A	..T.....T	C.....G.....
		344	354	364	374	384	394	404	414
A	CCAGCAACCC	GCTTGGCAGG	GATCCCTCTT	CTCGCACCGG	GCCCATCAAT	CGTGGGGGTA	GCTATTTAAT	GATCTTTATA	
AE
E1
E2
E3
E4
F1
F2
BpC.

Figura 6. Secuencia de los haplotipos del asa D mitocondrial encontrados en las ballenas jorobadas del Pacífico mexicano. Los puntos indican que los residuos son idénticos a la secuencia de referencia (tipo A) y las letras señalan los nucleótidos diferentes. La numeración corresponde a la secuencia completa del asa D de la ballena jorobada tomada de Árnason (1991) de donde se incluye la secuencia del rorcual común, *B. physalus* (Bp).

la Bahía de Banderas, que forman parte de la misma agregación de acuerdo a estudios de fotoidentificación (Urbán y Aguayo 1987, Urbán et al. 1989), el tipo A es más frecuente hacia el norte mientras que los tipos F son más abundantes hacia al sur. Asimismo, en el Pacífico mexicano, los tipos F se encuentran con menor abundancia con relación a los tipos E comparados con las zonas de alimentación frente a California (Figura 7, Cuadro 1).

Lo anterior sugiere que existe una distribución clinal de los haplotipos en la costa occidental americana, en la que los tipos A son más frecuentes hacia el norte (Figura 7). De acuerdo con ello, se espera que los tipos F sean más abundantes hacia el sur de México y América central.

La composición de haplotipos en las Islas Revillagigedo, que se describe por vez primera, es similar a la de la costa mexicana pero con una frecuencia mayor de los tipos E (Figura 7, Cuadro 1).

Para aprovechar la información de las secuencias nucleotídicas en la comparación de las zonas de distribución de las ballenas jorobadas, la distancia genética dentro y entre las distintas regiones se estimó con la divergencia nucleotídica promedio (Π) de acuerdo a Nei y Li (1979) como sigue:

$$\Pi = \sum_{i,j} x_i x_j \pi_{ij}$$

donde x_i y x_j son las frecuencias alélicas de los tipos i e j , y π_{ij} es la fracción de residuos diferentes entre ellos. El Cuadro 2 muestra las divergencias genéticas entre las zonas de reproducción de *M. novaeangliae* en el Pacífico nororiental. La corrección para determinar la distancia genética neta (D_{ij}) entre las distintas zonas se obtuvo como sigue (Nei 1987):

$$D_{ij} = \Pi_{ij} - [(\Pi_i + \Pi_j) / 2]$$

Cuadro 1. Frecuencias (negritas) y errores ^{Standard?} de los haplotipos mitocondriales de la ballena jorobada en zonas de reproducción del Pacífico nororiental.

	Hawai * (HI)	Baja California * (BC)	Bahía Banderas (BB)	Isla Socorro (IS)	n
Alaska A	0.9375 0.0605	0.3809 0.1060	0.2857 0.0986	0.1739 0.0790	33
AE	0.0000 0.0000	0.0953 0.0641	0.0476 0.0464	0.0000 0.0000	3
E1	0.0000 0.0000	0.2857 0.0986	0.3333 0.1029	0.6522 0.0993	28 ✓
E2	0.0000 0.0000	0.0000 0.0000	0.0953 0.0641	0.0000 0.0000	2
E3	0.0000 0.0000	0.0476 0.0464	0.0000 0.0000	0.0000 0.0000	1
E4	0.0000 0.0000	0.0476 0.0464	0.0000 0.0000	0.0000 0.0000	1
F1	0.0000 0.0000	0.0000 0.0000	0.1428 0.0763	0.0000 0.0000	3
F2	0.0625 0.0605	0.1428 0.0763	0.0953 0.0641	0.1739 0.0790	10
n	16	21	21	23	81

* Datos de Baker (1992).

donde Π_{ij} es la divergencia entre las regiones i e j , mientras que Π_i e Π_j son las divergencias dentro de las regiones i e j . Con base en ello, el dendrograma de las regiones de reproducción de la Figura 7 se obtuvo por ligamiento promedio no ponderado (UPGMA).

Se observa que en el Pacífico mexicano, la variabilidad genética es mayor, 1.112 % en promedio, comparada a la de Hawai, 0.366 %. La divergencia nucleotídica promedio para todas las zonas de reproducción del Pacífico norte es 1.019 %. La distancia genética neta entre las zonas de reproducción en México, 0.015 % en promedio, es menor que la distancia de cualquiera de ellas a Hawai, 0.067 % en promedio. Baja California es la región más

Cuadro 2. Divergencias nucleotídicas promedio (%) dentro y entre las zonas de reproducción de ballenas jorobadas en el Pacífico nororiental.

	HI	BC	BB	IS
HI	0.366	0.037	0.078	0.086
BC	0.724	1.006	0.013	0.014
BB	0.906	1.162	1.291	0.018
IS	0.789	1.037	1.184	1.040

Los números en negritas indican la divergencia genética interna de las regiones, los valores bajo al diagonal muestran la divergencia entre las distintas zonas y los valores sobre la diagonal muestran la distancia genética corregida por la divergencia interna de las regiones. Mismas abreviaturas que en el Cuadro 1.

similar a Hawai de acuerdo a la hipótesis clinal descrita. La divergencia genética es similar entre las distintas zonas de reproducción en México aunque se distingue una diferencia un poco mayor que las otras entre Bahía de Banderas y la Isla Socorro.

Para evaluar estadísticamente la distancia genética entre las diferentes regiones, se estimó χ^2 comparando contra una distribución homogénea de los haplotipos como hipótesis nula y se analizó la distribución del índice Gst (Nei 1973, 1987). En el análisis de χ^2 se encontró que Hawai es significativamente diferente a todas las zonas de reproducción en el Pacífico mexicano con al menos $p < 0.05$. No se observa significancia en las diferencias entre las regiones mexicanas con excepción de la comparación Bahía de Banderas vs Isla Socorro en la que $p < 0.10$. En un análisis global de todas las zonas de reproducción del Pacífico nororiental, se encuentra $\chi^2 = 51.506$ que es significativa con $p < 0.01$.

Gst es la fracción de la diversidad genética en una población que se debe a las diferencias entre las subpoblaciones. Gst mide así qué tanto una población está subdividida y se define, de acuerdo a Nei (1973, 1987) como:

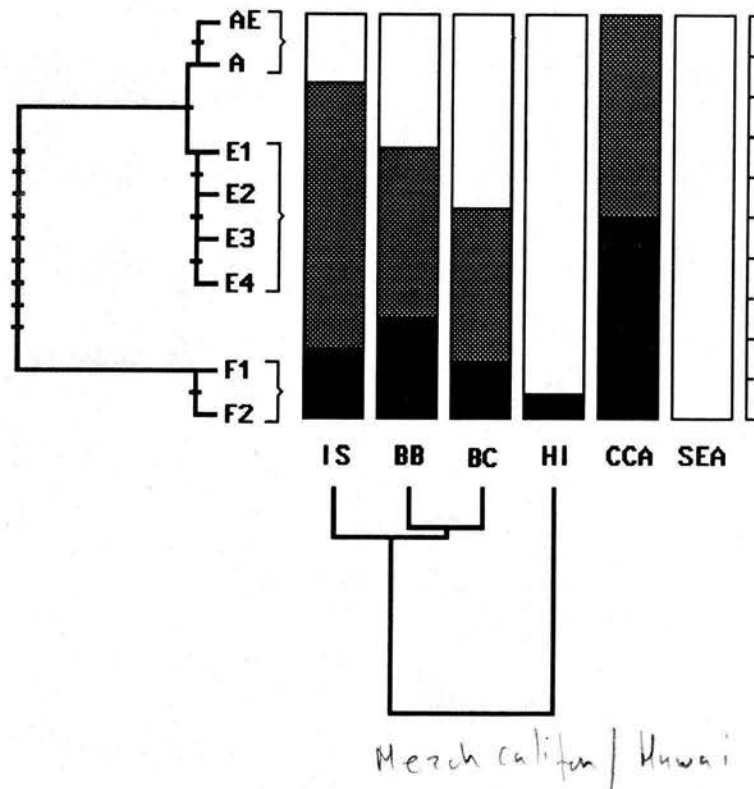


Figura 7. Dendrogramas y esquema de composición de haplotipos en las distintas zonas de alimentación y reproducción del Pacífico nororiental conjuntando los datos de Baker (1992). Las barras en el dendrograma de los tipos indican los eventos de variación en la secuencia del asa D mitocondrial. IS: Isla Socorro, BB: Bahía de Banderas, BC: Baja California, HI: Hawaii, CCA: California central, SEA: Sureste de Alaska.

$$G_{st} = (H_t - H_s) / H_t$$

donde H_t es la diversidad genética en la población total y H_s es la diversidad genética media de las subpoblaciones. La diversidad genética (H) en una muestra de alelos se define como la probabilidad de que dos de ellos sean diferentes y se estima, de acuerdo a Nei (1973, 1987) como:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

Cuadro 3. Valores de χ^2 y Gst para la comparación entre las regiones de reproducción del Pacífico nororiental.

	HI	BC	BB	IS
HI	-	0.250*	0.293***	0.472****
BC	12.686**	-	0.016	0.064
BB	16.822****	7.896	-	0.048
IS	22.641****	9.262	9.905*	-

Se indican sobre la diagonal los valores de Gst y bajo de ella los valores de χ^2 .
 Nivel de significancia: *: 0.10, **: 0.05, ***: 0.025, ****: 0.01.

donde x_i es la frecuencia de cada alelo i , e k es el número de alelos distintos. Para probar que las diferencias genéticas entre las regiones no se deben a una distribución aleatoria de los individuos muestreados, se construye una distribución de Gst por un proceso de redistribución aleatoria de datos como sigue (Palumbi et al. 1991a, Weir 1990).

Cada individuo de la muestra se reasigna al azar a una subpoblación manteniendo sus tamaños iguales a los del muestreo para luego calcular Gst. Este proceso se repite un número de veces suficiente para construir una distribución de Gst. Se compara entonces el valor real de Gst y se observa la probabilidad de que Gst sea mayor que el esperado por una distribución aleatoria de los tipos.

Este proceso se llevó al cabo mediante 5 000 simulaciones y construyendo una distribución acumulada de Gst con resolución de 0.005. La interpolación del valor real de Gst directamente indica su probabilidad con relación a una distribución aleatoria de los tipos. Se encontró que Hawai es significativamente distinto de todas las regiones mexicanas y no se observó ninguna significancia en las comparaciones entre zonas del Pacífico mexicano.

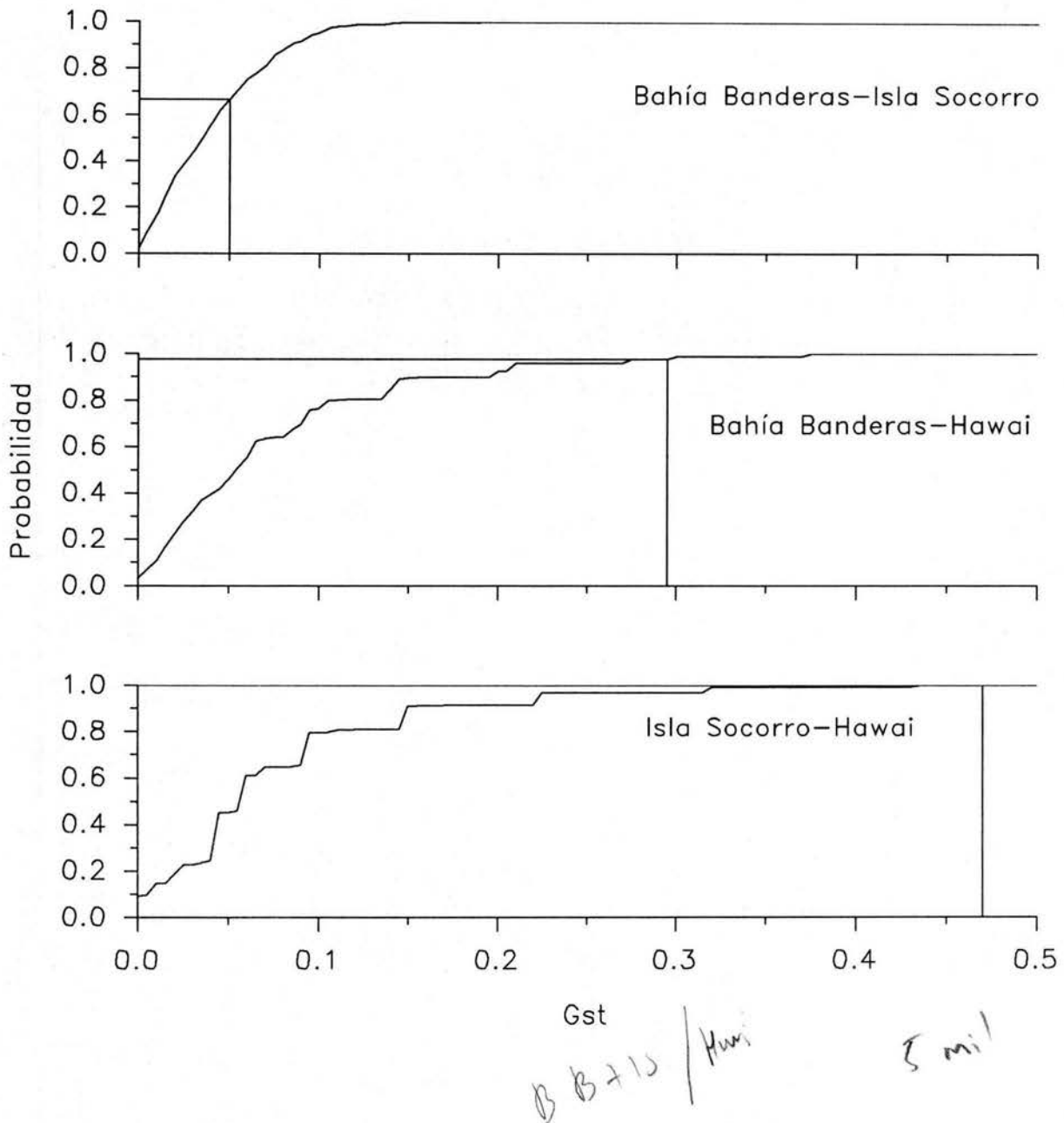


Figura 8. Distribuciones acumuladas de Gst para diferentes comparaciones regionales obtenidas mediante un proceso de redistribución aleatoria de datos. Las líneas que intersectan las curvas señalan los valores reales de Gst y sus probabilidades correspondientes.

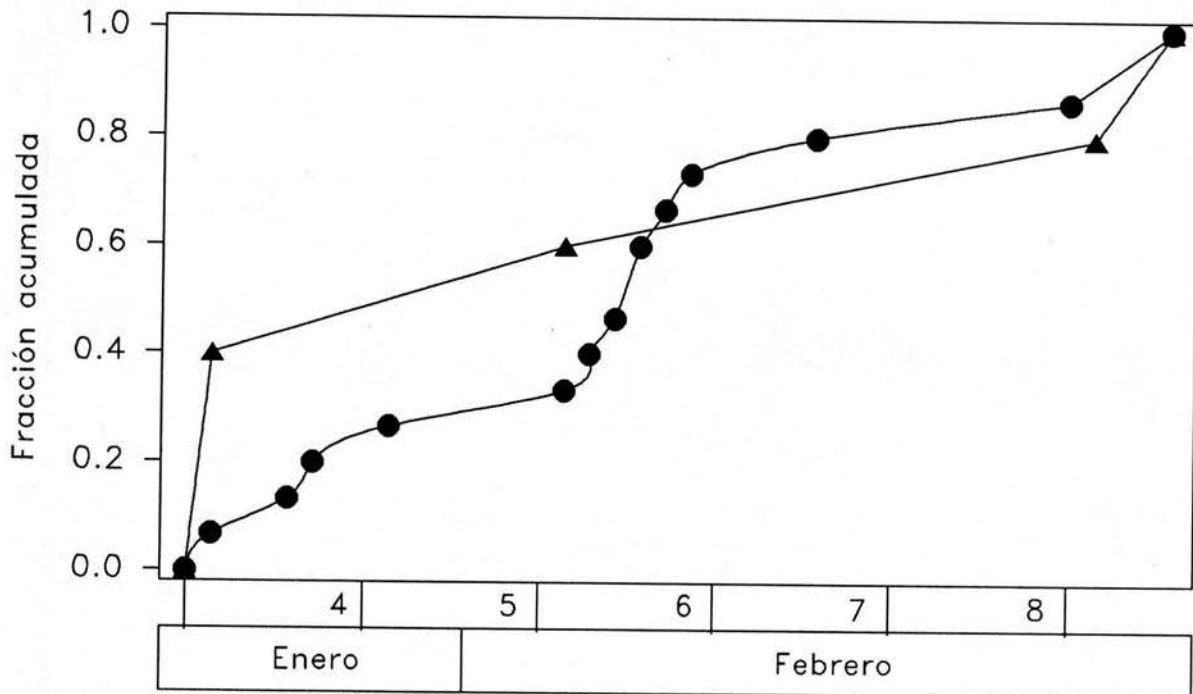


Figura 9. Distribución temporal acumulada de los tipos F (Δ) y del cúmulo de los tipos A y E (\circ) en la Bahía de Banderas. Datos conjugados de 1990, 1991 y 1992. Las unidades de tiempo indican las semanas transcurridas a partir del primero de enero.

No obstante que los valores de G_{st} entre las regiones costeras mexicanas y la Isla Socorro son pequeños, en la comparación con Baja California G_{st} es cercano al valor de significancia con una probabilidad $q > 0.73$ ($p < 0.27$, Figura 8). El valor global de G_{st} para todas las zonas de reproducción del Pacífico nororiental es 0.232 y tiene una probabilidad asociada $q > 0.99$ ($p < 0.01$).

Como se mencionó, parece haber una estructura clinal en la distribución de los haplotipos en las regiones costeras de América. En conjunto con la escasez relativa de los tipos F en México, se ha propuesto que los tipos F son más abundantes en zonas de reproducción hacia el sur de México y América central como Costa Rica cuyas respectivas zonas de alimentación también se encuentran frente a la costa de California (Steiger *et al.* 1991).

Se espera que estas ballenas pasen frente a la costa mexicana en el Pacífico o que se reproduzcan ahí en algún momento como lo sugieren diversos avistamientos en las costas de Oaxaca, Guerrero, y Michoacán (Gallo *et al.* 1986 y diversas observaciones no publicadas del Grupo de mamíferos y tortugas marinas de la Facultad de Ciencias UNAM). Por ello, podría esperarse un patrón temporal más o menos específico en la zonas de la costa mexicana, como la Bahía de Banderas, en el que los tipos F aparecen primero que los demás en tránsito hacia regiones más al sur. Por lo anterior, se construyó una distribución temporal preliminar en la cual se observa que los tipos F aparecen antes que los tipos A y E como se espera de la hipótesis clinal (Figura 9).

Historia de la especie en el Pacífico mexicano.

Los datos de variabilidad genética en las poblaciones naturales, particularmente del genoma mitocondrial, han permitido el desarrollo de una serie de procedimientos de análisis que en conjunto se denominan métodos de **coalescencia** los cuales permiten evaluar algunos aspectos demográficos como tiempo de ancestría común, tiempos de fijación de mutantes neutrales y tamaño efectivo de la población a largo plazo, entre otras cosas (Awise *et al.* 1988, Lande 1991, Waples 1991).

Para comprender la relación del tamaño efectivo de una población con la variabilidad genética, considérese una población ideal con generaciones no sobrepuestas y un número constante de hembras (N_f) que heredan el conjunto de gametos neutrales que conformarán la siguiente generación, la probabilidad de que dos

hembras de esa nueva generación desciendan de la misma madre es $1/N_f$. Esta es la probabilidad de que dos DNA mitocondriales tomados al azar deriven de un ancestro común en una generación previa ($G=1$). Por lo tanto, la probabilidad de que dos DNA mitocondriales deriven de madres diferentes es $(1-1/N_f)$. Así, la probabilidad de que dos genomas mitocondriales deriven de hembras diferentes en la generación previa pero que desciendan de la misma abuela es $(1/N_f)(1-1/N_f)$. Al extender este razonamiento, la probabilidad de que dos DNA mitocondriales deriven de un ancestro que existió hace G generaciones (f_G) es:

$$f_G = (1/N_f)(1-1/N_f)^{G-1} \quad (1)$$

Si se comparan los individuos de una muestra poblacional y se construye una distribución del tiempo de ancestría común entre ellos, la ecuación 1 predice que $(N_f)(f_G)$ es la fracción correspondiente al tiempo de separación G . Con el conocimiento de la tasa de sustitución y del tiempo generacional, la ecuación 1 ajustada a la distribución de los tiempos de separación medidos con DNA mitocondrial en una muestra poblacional permite estimar el tamaño efectivo de la población a largo plazo. Con la información de variabilidad en el genoma mitocondrial, su tasa de sustitución y los tamaños poblacionales de algunas especies de peces y aves, *Avise et al.* (1988) encontraron que el tamaño efectivo de la población a largo plazo es menor que el tamaño poblacional en dos o tres órdenes de magnitud. Esto implica que la variabilidad genética del genoma mitocondrial actualmente observada en las especies analizadas deriva de pocos individuos.

Para estimar los tiempos de separación entre las ballenas jorobadas en sus zonas de reproducción y generar una distribución de tiempos de ancestría común, se consideró una tasa de sustitución del asa D de $0.01/10^6$ años (*Baker et al.* 1993, *Hoelzel et al.* 1991, *Martin y Palumbi* 1993) y un tiempo generacional de 10 años (*Martin y Palumbi* 1993) que se basa en la edad en que actualmente las hembras alcanzan la madurez sexual, la cual es de

seis a ocho años (Chittleborough 1958, 1965, Clapham y Mayo 1987a,b), y la longevidad de la especie que es de 45 años (Sacher 1980). Al comparar a los tipos mitocondriales de las ballenas jorobadas en sus zonas de reproducción en el Pacífico nororiental y obtener una distribución de tiempos de ancestría común, se obtienen dos picos que corresponden a la comparación de los tipos A y E con los tipos F, y a la comparación de los distintos tipos A y E entre sí. El carácter bimodal de esta distribución no concuerda con lo predicho en la ecuación 1 porque se trata con alelos provenientes de dos poblaciones aisladas, la del Pacífico norte y la del Hemisferio sur. Por ello, se analizó la distribución de tiempos de coalescencia entre los tipos A y E, que son los nativos en el Pacífico, así como entre los tipos E y entre los tipos F, cuya radiación ha ocurrido en el Pacífico norte (Figura 10). El tamaño efectivo de población que puede ajustarse por mínimos cuadrados en esta distribución es variable con $N_f=5\ 000-11\ 000$ individuos. Estos valores concuerdan con la estimación de N_f como el número de generaciones transcurridas desde un ancestro común (Waples 1991) que es de $G=11\ 656$ para la separación de los tipos A y E, de $G=3\ 843$ para la radiación de los tipos E y de $G=5\ 064$ para la radiación de los tipos F. Si se considera que el tamaño poblacional de las ballenas jorobadas en el Pacífico norte ha sido de $N=12\ 000-20\ 000$ (National Marine Fisheries Service 1991, Rice 1978, Wolman 1978) y que las hembras representan una proporción cercana al 50 % (Clapham y Mayo 1987a, Chittleborough 1958, 1965), la variabilidad en el asa D indica que el tamaño efectivo de la población a largo plazo es idéntico al tamaño poblacional a diferencia de las especies analizadas por Avise *et al.* (1988). Esto puede derivar de que la costa Pacífica ha sido la principal zona de reproducción de esta especie, siendo los archipiélagos de Hawai y Revillagigedo agregaciones recientes y a que, no obstante la filopatria, el movimiento ocasional a diferentes zonas de reproducción, hace que a largo plazo, la población de ballenas jorobadas se aproxime a la panmixia.

FE DE ERRATAS

En la página 44 se menciona que, en el estudio de Baker et al. (1990), los tipos F del Pacífico norte y C del Hemisferio sur difieren por un sitio de restricción para la enzima Ava II en un fragmento de DNA mitocondrial de 4 300 pares de bases y que, considerando una tasa de sustitución de $0.01/10^6$ años, la separación de los tipos F y C se estima coincidir con la radiación del cúmulo A,E en hace 116 000 años lo cual es erróneo. El cálculo correcto hecho en detalle es el siguiente. La tasa de sustitución nucleotídica entre dos secuencias de DNA divergentes (S) se define como la cantidad de sustituciones ocurridas por nucleótido (K) dividida por el doble del tiempo de separación entre las dos secuencias (t) en virtud de que la divergencia observada resulta de las sustituciones ocurridas en ambas moléculas, ésto es:

$$S = K/2t \quad (1)$$

A partir de las sustituciones por nucleótido observadas (D), K se calcula como sigue (véase Li y Graur 1991):

$$K = -\frac{3}{4}\ln(1 - \frac{4}{3}D) \quad (2)$$

Al despejar t de la ecuación 1 con $S=0.01/10^6$ años y después de calcular K con la ecuación 2 con $D=1/4$ 300, se obtiene $t=11$ 628 años que corresponde al fin de la última glaciación. Esta es la época en la cual se postula que se empezaron a desplazar las zonas de reproducción de las ballenas jorobadas desde América central hacia el norte hasta ocupar el Pacífico mexicano como la principal región reproductiva actual en el Pacífico nororiental.

La distribución de tiempos de separación entre los tipos A y E presenta una media de 11 656 generaciones lo que indica una ancestría común cercana a 116 000 años. Baker et al. (1990) encontraron que la distinción entre los tipos F del Pacífico norte y los tipos C del Hemisferio sur consiste en un sitio de restricción de la enzima Ava II en un fragmento de DNA mitocondrial de aproximadamente 4 300 pb. Si se considera que esto se debe a una sustitución y se usa la tasa $0.01/10^6$ años, la separación de los tipos F de los tipos del Hemisferio sur coincide con la radiación de los tipos A y E. Este tiempo corresponde al fin de la glaciación del Illinoiano y al inicio del periodo interglacial Sangamon (Fairbridge 1960, Weihaupt 1984). Probablemente, el aumento de temperatura restringió las zonas de reproducción hacia el norte, disminuyendo así el intercambio entre las ballenas de los Hemisferios norte y sur. El análisis de distribución de tiempos de ancestría común dentro de los cúmulos E y F también sugiere un tamaño efectivo de población a largo plazo de 5 000 a 11 000 hembras e indica que estos cúmulos radiaron hace 40 000-50 000 años que corresponde al periodo interglacial en el Wisconsin (Figura 10).

La divergencia genética entre las ballenas del Archipiélago Revillagigedo y de la costa pacífica mexicana se encuentra en el umbral de la significancia estadística. En una comparación preliminar con las zonas de alimentación del Pacífico nororiental se observa que, a semejanza de la comparación con las zonas de reproducción de la costa pacífica mexicana, las ballenas de las Islas Revillagigedo son significativamente diferentes de Alaska ($p < 0.01$ en las pruebas de χ^2 y Gst) y relacionadas con California con diferencias cerca de la significancia estadística ($p < 0.1$ en la prueba de χ^2 y $p < 0.25$ en el análisis de Gst). Los estudios de fotoidentificación indican que las ballenas de Revillagigedo son una agrupación diferente de las ballenas en la costa mexicana del Pacífico pues los reavistamientos de estos animales fuera de las Islas Revillagigedo son escasos no habiéndose encontrado sus zonas de alimentación (Alvarez et al. 1990, Ladrón de Guevara et al.

1993, Urbán y Aguayo 1987, Urbán et al. 1989). Por ello, se puede interpretar que el grupo de ballenas de Revillagigedo se separó recientemente de la subpoblación americana. Como las composiciones de alelos de las ballenas de Revillagigedo y de la costa mexicana son similares sin que haya habido ningún evento de fijación alélica en la región analizada de 320 pb y, ya que la tasa de sustitución en el asa D es $0.01/10^6$ años (Baker et al. 1993, Hoelzel et al. 1991, Martin y Palumbi 1993), se estima que la separación debió ocurrir en algún momento durante los últimos 300 000 años. A partir de la divergencia nucleotídica neta entre las ballenas de Revillagigedo y de la costa pacífica mexicana, que varía entre 0.013 % y 0.018 %, la separación se estima en hace 6 500-9 000 años. Este razonamiento es sin embargo limitado porque la diferencia genética no se debe a eventos de sustitución génica sino a una distribución de haplotipos distinta. En la costa pacífica mexicana se observan los tipos poco frecuentes AE, E2, E3, E4 y F1 que no se encuentran en las Islas Revillagigedo por lo que puede postularse que el origen de estos alelos está asociado a la divergencia entre estas dos agregaciones. Así, el tiempo de separación de las ballenas de Revillagigedo se determinó estimando el origen de estos haplotipos mediante la simulación de un proceso de deriva génica en una población hipotética de rorcuales jorobados que consistió de lo siguiente:

Se tiene una población haploide de tamaño constante N_f en la que surge un mutante. Esta población se reproduce de forma aleatoria y se retiran al azar los individuos en exceso de N_f .

La población se continua reproduciendo manteniendo N_f constante y determinando la frecuencia del alelo mutante (q) en cada ciclo hasta que el mutante desaparezca o alcance la frecuencia actual observada del tipo F1 que es el más abundante entre los alelos poco frecuentes ($q=0.14$). Si la abundancia del mutante alcanza este valor, se registra el tiempo como número de generaciones transcurridas durante la simulación.

(see in in)
 tasa de
 mutación

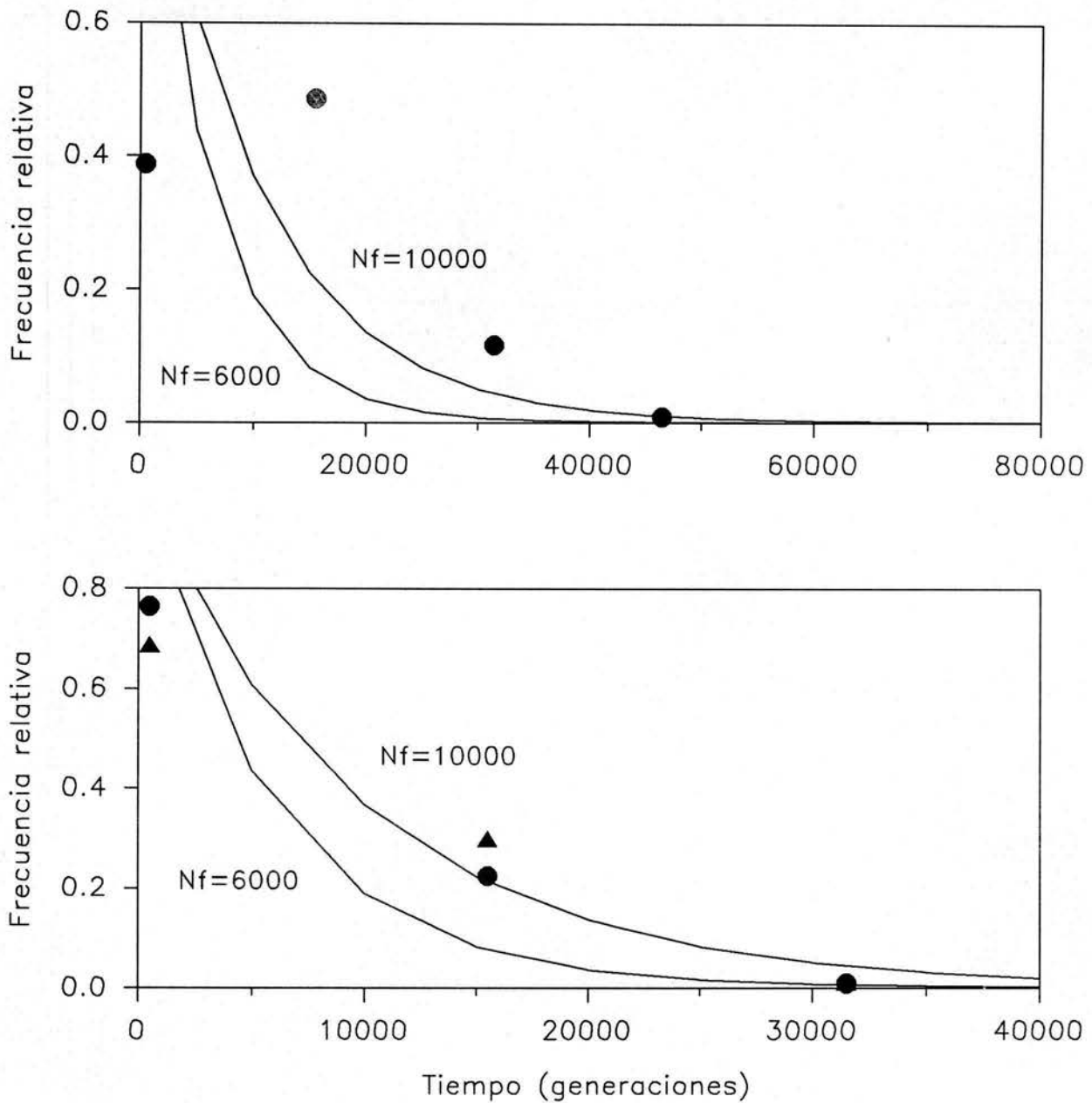


Figura 10. Panel superior: Distribución de tiempos de ancestría común en los tipos mitocondriales A y E de las ballenas jorobadas en las zonas de reproducción del Pacífico nororiental. Panel inferior: distribución de tiempos de ancestría común dentro del cúmulo E (●) y en el cúmulo F (▲). Las curvas indican los valores predichos por la ecuación 1 para $N_f=6\ 000$ y $N_f=10\ 000$ hembras.

La simulación se repite un número de veces suficiente para establecer una distribución del valor buscado.

La simulación supone que el mutante es neutral y que por tanto su trascendencia a generaciones sucesivas es al azar. Asimismo, se supone que la variabilidad genética actualmente observada es la misma que la anterior a la captura comercial. La tasa de reproducción por individuo por año es aproximadamente $T_r=0.1$ en las zonas de reproducción del Atlántico norte, de Hawai y de México (Baker *et al.* 1987, Clapham y Mayo 1987b, Salas 1993). Como se dijo, el tiempo generacional se considera $t_g=10$ años (Martin y Palumbi 1993). El tamaño efectivo de la población a largo plazo es cercano al tamaño de la población que, previo a la captura comercial, es $N=12\ 000-20\ 000$ individuos (Rice 1978, Wolman 1978) y como se trata con un elemento genómico haploide heredado por vía materna, el mutante sólo se propaga por las hembras cuya número en la población es $N_f=(0.5)N$ (Clapham y Mayo 1987b, Chittleborough 1958, 1965). De esa forma, en cada ciclo de reproducción simulado, el número de nuevos individuos que pueden heredar sus haplotipos (R) es:

$$R = (T_r) (t_g) (N_f)$$

donde $N_f=6\ 000-10\ 000$. Si se considera que las hembras tienen, en general, un crío cada dos años (Chittleborough 1958, 1965, Clapham y Mayo 1987b, Glockner-Ferrari y Ferrari 1990, Perry *et al.* 1990, Salas 1993), el valor $T_r=0.1$ y la fracción de hembras cercana al 50 % indican que el 40 % de las hembras son activas en la reproducción. Se realizaron 25 000 simulaciones para $N_f=10\ 000$ y 15 000 simulaciones para $N_f=6\ 000$ entre las cuales 12 y 16 respectivamente, alcanzaron $q=0.14$ y cuya distribución de tiempos se muestra en la Figura 11. Los promedios y errores de la cantidad de generaciones necesarias para que un mutante en las condiciones descritas alcance $q=0.14$ son $1\ 263\pm 110$ si $N_f=10\ 000$ y 744 ± 107 si $N_f=6\ 000$.

Estos resultados sugieren que la separación de las ballenas de Revillagigedo de la subpoblación americana ocurrió durante aproximadamente 1 000 generaciones que, con un tiempo generacional de 10 años, indica un tiempo de divergencia cercano a 10 000 años el cual coincide con lo estimado a partir de la divergencia nucleotídica neta. Este tiempo corresponde al fin de la glaciación del Wisconsin superior en la que desde hace 10 000 años hasta hace 6 000 hubo un aumento del nivel del mar provocado por el incremento de la temperatura en el todo el mundo (Fairbridge 1960, Weihaupt 1984). Este cambio climático modifica la circulación de corrientes haciendo que la corriente de California se desvíe al occidente e influya menos en la region costera (Pacheco *et al.* 1991) lo que pudo también haber desviado las migraciones de las ballenas jorobadas hacia las Islas Revillagigedo hasta establecer esa zona como sitio regular de reproducción. Las zonas al sur de la costa pacífica de México y América central en las que se reproducen algunas ballenas jorobadas serían por tanto sitios más o menos relictuales que en el pasado fueron zonas importantes de reproducción. Con el fin de la última glaciación las ballenas jorobadas se han desplazado poco a poco hacia el norte hasta presentar la distribución actual observada. Asimismo, la existencia de antiguas zonas de reproducción frente a las costas de América central probablemente favoreció la migración de ballenas del Hemisferio sur que originaron a los actuales haplotipos F. Ello implica que tal vez en la actualidad las variaciones climáticas a corto plazo puedan afectar el intercambio entre la costa pacífica mexicana y las Islas Revillagigedo, esto es, que puedan relacionarse a la abundancia de ballenas y al número de reavistamientos en y entre ambas regiones.

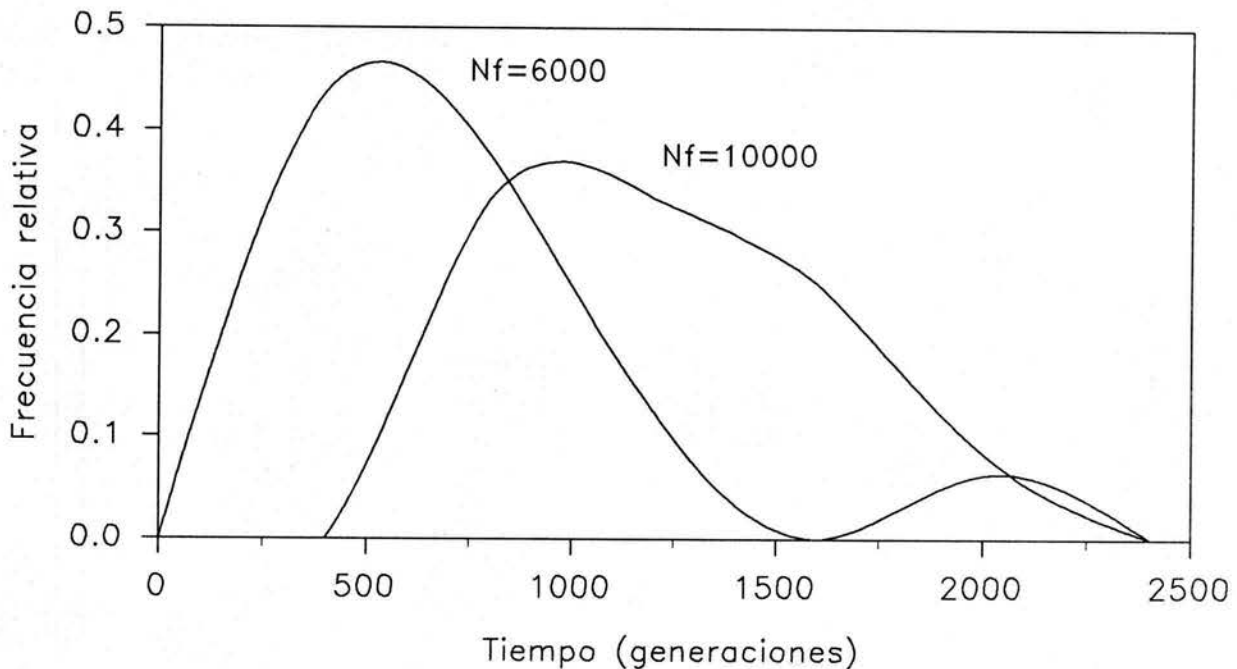


Figura 11. Distribución de tiempos en que un mutante de poblaciones simuladas de ballenas jorobadas de diferente tamaño N_f tarda en alcanzar la frecuencia $q=0.14$, actualmente observada en el tipo F1 en la Bahía de Banderas, por deriva génica.

afuera de q-

Interpretación genética de la coloración caudal.

Se mencionó que gran parte de lo que se conoce sobre las ballenas jorobadas deriva de la identificación de individuos a partir de la coloración del lado ventral de la aleta caudal. Esta coloración puede ser desde totalmente blanca hasta totalmente negra con diferentes patrones que forman una serie continua en la que el color negro puede cubrir en extensión variable desde el centro de la aleta hacia los extremos. A partir de ello, las aletas usualmente se clasifican, por la cobertura de negro, en cinco clases (Katona y Whitehead 1981, Mizroch et al. 1990, Perry et al. 1990).



La coloración oscura de la piel de los cetáceos se debe a la melanina presente en las células epidérmicas la cual proviene de melanocitos localizados en la estrato epidérmico basal (Ling 1974). Esta actividad melanocítica se ha denominado citócrina (Montagna 1962). La cobertura de negro desde el centro hacia los extremos sugiere que el patrón deriva de algún fenómeno durante el desarrollo en el que se fija la extensión del pigmento. Este evento no involucra la migración de las células pigmentarias pues las ballenas de coloraciones claras pueden estar levemente pigmentadas en el nacimiento, aunque el patrón ya es reconocible. Por ello, una medida alternativa de las coloraciones puede basarse en el tiempo de fijación durante el desarrollo el cual puede estimarse a partir de la ecuación de crecimiento logístico.

Las ballenas jorobadas de distintas zonas geográficas presentan diferentes patrones de coloración en la aleta caudal siendo las ballenas del Hemisferio sur de color más blanco que las del Hemisferio norte. Asimismo, en el Pacífico norte se observa que en México abundan más las ballenas con color claro mientras que en Japón predominan más las coloraciones oscuras siendo Hawai una zona intermedia (Rosenbaum, en preparación). Si se asume que las coloraciones blancas son características del Hemisferio sur mientras que las oscuras lo son del Hemisferio norte, estos resultados coinciden con nuestra hipótesis clinal ya que muestran que en México hay más influencia genética de las ballenas del Hemisferio sur y sugieren que en Japón esta influencia es mucho menor.

Una interpretación genética de la distribución geográfica de las coloraciones caudales requiere de comprender las bases genéticas y embriológicas de la formación de la aleta caudal lo cual, hasta la fecha, no existe. El patrón de coloración caudal tal vez derive de la acción de muchos genes pero, con la suposición de que las ballenas del Hemisferio sur tienen un genotipo que expresa coloración blanca, puede ser posible encontrar una correlación entre la coloración caudal y la identidad de los tipos mitocondriales que consistiría en que los

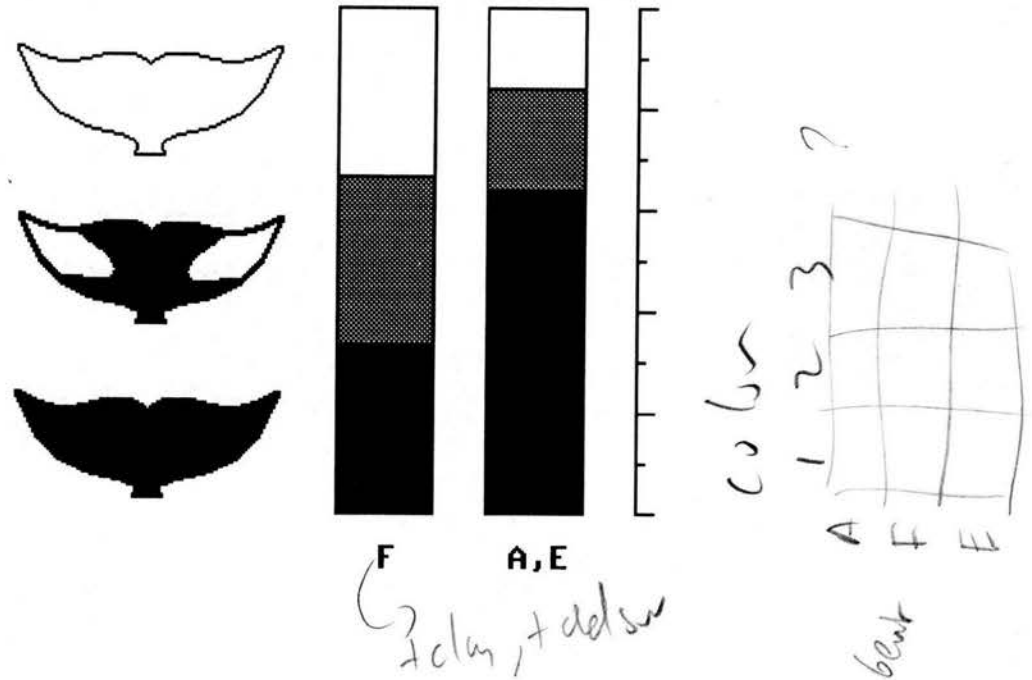


Figura 12. Distribución de coloraciones caudales de los tipos mitocondriales F, A y E en México.

tipos F, descendientes de tipos del Hemisferio sur, serían de color más claro que los tipos originales del Pacífico norte, A y E. La mezcla genética de las ballenas del Hemisferio sur con las del norte en México hace posible encontrar tipos F o A y E con coloraciones de cualquier tipo pero, si la mezcla no ha sido total, como sugiere nuestra hipótesis clinal, es posible encontrar aún alguna relación entre la coloración caudal y el DNA mitocondrial en México. A partir de las notas registradas en las recolectas de biopsias en Baja California, Bahía Banderas e Isla Socorro, fue posible identificar el tipo de coloración de 31 ballenas jorobadas de las que se determinó la secuencia del asa D mitocondrial. De acuerdo a la cobertura de negro, las coloraciones caudales de estos animales se agruparon como claras (tipos 1 y 2), de cobertura media (tipo 3) y oscuras (tipos 4 y 5).

Como se supuso, los tipos F presentan coloraciones más claras que los tipos A y E en forma significativa de acuerdo a la prueba de χ^2 con $p < 0.05$ (Figura 12). También se observa que algunos tipos F son de coloraciones caudales oscuras mientras que algunos tipos A y E son de color claro. Pese a lo sugerente de estos resultados, el número de tipos F analizados aún es pequeño ($n=6$) para establecer conclusiones definitivas.

Dinámica del asa D mitocondrial.

Un análisis habitual sobre las variaciones del asa D de los cetáceos ha sido realizado por Hoelzel et al. (1991) quienes han encontrado que este gen evoluciona fundamentalmente por transiciones nucleotídicas habiendo una contribución importante de errores de deslizamiento en la duplicación que hacen que la secuencia presente pequeñas series repetidas de nucleótidos u oligonucleótidos. Este mismo estudio ha mostrado que las regiones con estructura secundaria en el asa D no se conservan en los cetáceos y que el marco de lectura abierta en el gen no es funcional y no está relacionado con la conservación de la parte central. Finalmente, Hoelzel et al. (1991) han encontrado que la tasa de sustitución en los misticetos es menor que la de otros mamíferos, incluyendo los delfínidos, lo que refuerza la hipótesis de Martin y Palumbi (1993) sobre la dependencia en la tasa de sustitución de la tasa metabólica relativa, ya que los delfínidos y los misticetos presentan ciclos reproductivos similares, por lo que la menor tasa de sustitución en los misticetos puede adscribirse a su mayor tamaño corporal y por tanto a una menor tasa metabólica relativa.

El presente análisis trata de identificar restricciones fisicoquímicas en la evolución del asa D que derivan fundamentalmente de las inhomogeneidades en la estructura del DNA (Cocho et al. 1990, 1991). En adición a los aspectos básicos analizados por Hoelzel et al. (1991), el estudio de tales factores fisicoquímicos constituye parte del carácter analítico y dinámico

de la evolución molecular. El principio que subyace a este enfoque es que los procesos evolutivos no dependen solamente de circunstancias históricas particulares sino que están restringidos por las propiedades físicas de los sistemas biológicos y eso determina la existencia de regularidades cuyo estudio permite reconocer su dinámica (Cocho y Rius 1991, Kauffman 1992, Eigen 1986, Schuster 1986).

El asa D mitocondrial, sobre todo en sus extremos, presenta una alta tasa de sustitución en comparación a otros genes nucleares y mitocondriales lo que hace que esta región sea adecuada para analizar variabilidad poblacional o de especies cercanas. Ello resulta de que no existen fuertes restricciones selectivas sobre la secuencia del asa D y de la carencia de sistemas de reparación en la duplicación del DNA mitocondrial (Wilson et al. 1985). Ya que en los cetáceos la tasa de sustitución es menor en comparación a otros vertebrados (Árnason 1991, Schlöterer et al. 1991), lo que incluye al asa D (Baker et al. 1993, Hoelzel et al. 1991, Martin y Palumbi 1993), la variabilidad en este gen debe reflejar eventos de variación unívocos. Asimismo, en virtud de la carencia de sistemas de reparación y de que las restricciones selectivas son débiles en comparación a otros genes, se puede postular que la variabilidad en el asa D mitocondrial es cercana al patrón de las mutaciones espontáneas, como ha sido observado por Li et al. (1984) en los pseudogenes. Por ello, la variabilidad del asa D en los cetáceos dependerá considerablemente de la fenomenología mutacional. Debe recordarse que la afirmación de que las mutaciones son aleatorias se refiere a que éstas aparecen sin relación alguna con la adecuación de los organismos, lo cual no quiere decir que las mutaciones no resulten de procesos determinados que, en el caso particular del asa D mitocondrial de los cetáceos, pueden afectar la variabilidad y la evolución de la secuencia (Medrano 1989, Medrano et al. 1994).

Cuadro 4. Parámetros de estabilidad del DNA (kcal/mol).

Dinucleótido	ΔH	ΔG
AA/TT	9.1	1.9
AT/AT	8.6	1.5
TA/TA	6.0	0.9
CA/TG	5.8	1.9
GT/AC	6.5	1.3
CT/AG	7.8	1.6
GA/TC	5.6	1.6
GG/CC	11.0	3.1
GC/GC	11.1	3.1
CG/CG	11.9	3.6

El DNA no es una molécula homogénea, sino que la interacción entre bases consecutivas en la secuencia hace que las propiedades físicas del DNA como su estabilidad y la orientación de las bases varíen a lo largo de la doble hélice. La presencia de una purina y una pirimidina contiguas en la secuencia provoca un estorbo estérico entre las purinas opuestas en la doble hélice, lo cual hace que la orientación de las bases se modifique con respecto al modelo clásico de Watson y Crick (Dickerson 1983). Por otro lado, las interacciones de apilamiento entre nucleótidos contiguos en la doble hélice hace que la estabilidad del DNA sea variable en dependencia de las bases vecinas. Breslauer *et al.* (1986) han calculado los parámetros de estabilidad para los 16 diferentes dinucleótidos del DNA, de entre los cuales la simetría de algunos genera diez valores distintos, y definen la energía necesaria para desnaturalizar un mol de dinucleótido de DNA en doble hélice disuelto en NaCl 1 mol/L a 25°C y pH=7 (Cuadro 4).

Desde hace mucho se sabe que el patrón de mutaciones espontáneas no es aleatorio (Benzer 1961) y se han descubierto distintos factores que favorecen las mutaciones en lugares

determinados como la metilación de la citosina (Coulondre *et al.* 1978). También se ha observado que las mutaciones dependen de los efectos de la temperatura en la doble hélice y de su estabilidad (Bernardi y Bernardi 1986, Reaney y Pressing 1984). Por lo anterior, se ha propuesto que las mutaciones tienden a ocurrir en sitios donde la estabilidad local del DNA es menor ya que en esas zonas ocurren más fluctuaciones que favorecen eventos de mutación (Medrano 1989, Medrano *et al.* 1994).

En virtud de que en el asa D mitocondrial de los cetáceos la variabilidad parece reflejar los eventos de sustitución espontánea y por tanto la fenomenología mutacional, se esperaría que la variabilidad ocurra en zonas del DNA donde la estabilidad local sea menor. Para probar ésto, la variabilidad (V_i) en cada posición del alineamiento del asa D de las ballenas de aleta, azul y jorobada por Árnason (1991) se determinó mediante una modificación a Alizon *et al.* (1986) como:

$$V_i = (D-1)/A$$

donde D es el número de residuos diferentes y A es la frecuencia relativa del residuo más abundante en la posición i del alineamiento. Asimismo, se construyeron perfiles de estabilidad de las secuencias de DNA asignándoles los valores de ΔH del Cuadro 4, en los que se observa que la variabilidad en términos generales se presenta en las regiones de DNA con menor estabilidad (Figura 13).

La orientación de las bases deriva fundamentalmente de la correlación de purinas y pirimidinas en la secuencia en virtud del efecto de estorbo en purinas opuestas en la doble hélice y consecutivas en la secuencia (Dickerson 1983). Asimismo, una medida de la estabilidad del DNA, con relación a la composición de bases, puede derivar de la correlación de pares GC y AT en virtud de que los dinucleótidos que involucran un par AT y un par GC presentan menor estabilidad. Así, si se representa la secuencia en forma binaria, un índice de correlación entre las bases 0 y 1 (D_{01}) se define, de acuerdo a Cocho *et al.* (1991) como:

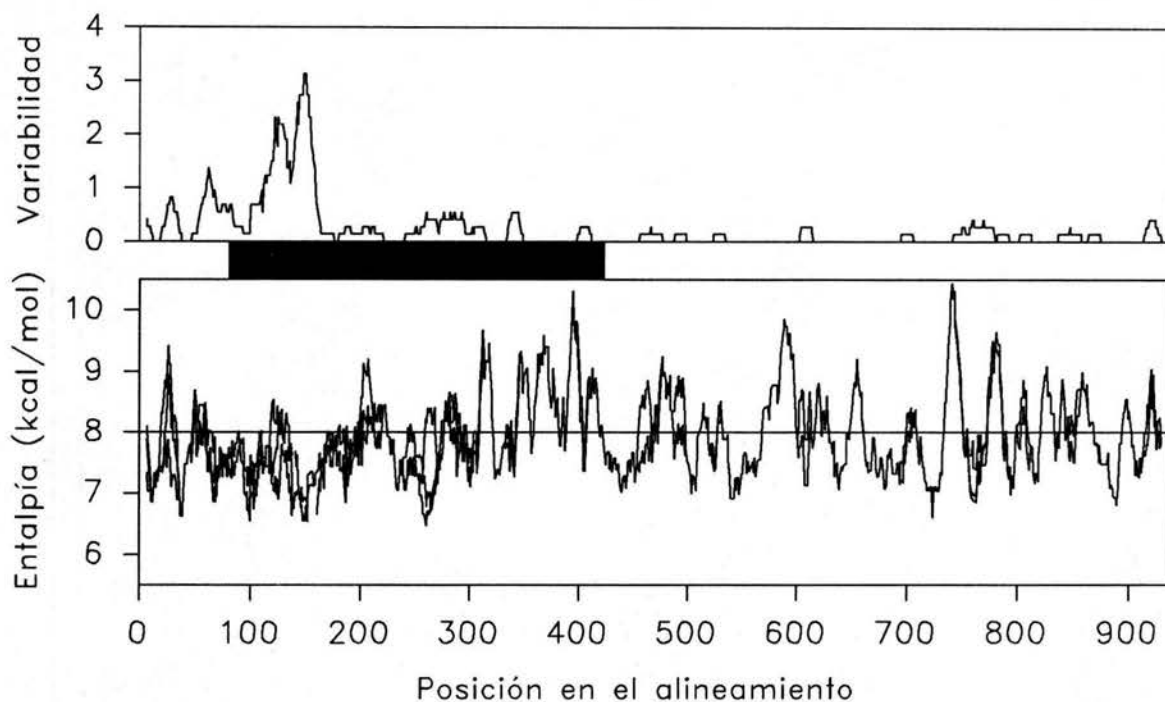


Figura 13. Panel superior: Variabilidad a lo largo de las secuencias alineadas del asa D mitocondrial de una ballena azul, una de aleta y una jorobada. Panel inferior: Perfil correspondiente de estabilidad de DNA. La barra entre las gráficas indica la región secuenciada en esta investigación (Figura 6). Las curvas se suavizaron promediando los valores en una ventana móvil de 11 pb.

$$D_{01} = [(N_{00}N_{11}) - (N_{01}N_{10})] / [N_0N_1]$$

donde N_{00} , N_{11} , N_{01} y N_{10} son respectivamente la cantidad de dinucleótidos de tipo 00, 11, 01 y 10. N_0 y N_1 corresponden a la cantidad de nucleótidos 0 y 1.

Si se distinguen las bases 0 y 1 como pirimidinas (Y) y purinas (R), el índice D_{01} se denomina D_{YR} y mide la presencia de desacomodos en las bases de la doble hélice. $D_{YR} > 0$ indica que las purinas y pirimidinas tienden a evitarse por lo que en el DNA habrá menos efectos de estorbo estérico que los esperados por azar ($D_{YR} \sim 0$). $D_{YR} < 0$ indica que las purinas y pirimidinas tienden a

alternarse en la secuencia por lo que los efectos de desacomodo serán más frecuentes que los esperados por azar. De igual forma, si se distinguen las clases 0 y 1 como bases de dos puentes de hidrógeno (W) o de tres (S), el índice D_{01} se denomina D_{ws} e indica si la secuencia es más estable ($D_{ws} > 0$) o menos estable ($D_{ws} < 0$) que lo esperado por una secuencia al azar de las bases ($D_{ws} \sim 0$). En la secuencia del asa D de la ballena jorobada (Árnason 1991) se encuentra que $D_{ws} = 0.11$ y $D_{yr} = -0.03$, ésto es, la secuencia se ordena aleatoriamente con relación a la orientación de las bases pero es más estable que lo que se espera por azar. Una secuencia aleatoria con la misma composición de bases presenta $D_{ws} = 0.00$ y $D_{yr} = 0.01$.

Asimismo, se observó que la estabilidad promedio de diez secuencias aleatorias de la misma composición es $\Delta H = 7.4$ kcal/mol que es igual al valor estimado a partir de la composición de bases. La estabilidad media real es $\Delta H = 7.9$ kcal/mol la cual es menor comparada a otros genes en virtud de que el asa D tiene un alto contenido de adenina y timina (62 %). El hecho de que la estabilidad sea mayor que la esperada por azar puede interpretarse como resultado de la tendencia de las mutaciones a ocurrir en sitios donde la estabilidad del DNA es menor pues eso favorece la acumulación de dinucleótidos con más estabilidad y suele observarse en los procariontes (Cocho et al. 1991). Este proceso también ocurre si existe un sesgo mutacional hacia el incremento de adenina y timina (Medrano et al. 1994).

D_{ws} y D_{yr} son casos particulares de correlaciones entre dos bases en la secuencia con referencia a la abundancia esperada por la composición de bases (D_{ij}) que de acuerdo a Cocho se define de la siguiente forma (Medrano et al. 1994):

$$D_{ij} = (N_{ij}/N) - (N_i N_j / N^2)$$

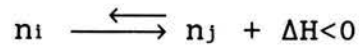
donde N_{ij} es el número de dinucleótidos ij en la secuencia de tamaño N , y N_i y N_j son respectivamente el número de bases i e j .

Cuadro 5. Correlaciones de bases en la secuencia del asa D de la ballena jorobada (negritas) y de una secuencia aleatoria con la misma composición de bases.

	A	G	T	C
A	-0.006 -0.007	-0.005 0.005	0.019 -0.005	-0.008 0.005
G	-0.013 -0.005	0.017 0.004	-0.006 0.006	0.003 -0.004
T	0.015 0.004	-0.001 -0.007	-0.002 0.009	-0.011 -0.005
C	0.003 0.009	-0.010 -0.001	-0.010 -0.009	0.016 0.002

Las correlaciones entre bases para el asa D y una secuencia aleatoria de la misma composición se muestran en el Cuadro 5. La matriz indica que el alto contenido de series de AA y TT deriva de la composición de bases más que de alguna restricción sobre la secuencia puesto que la cantidad $P_{AA}=(D_{AA}+D_{TT})-(D_{AT}+D_{TA})$ definida por Medrano et al. (1994) como la tendencia a la formación de enlaces estables de adenina y timina es $P_{AA}<0$. Asimismo, se observa que la estabilidad del DNA en el asa D depende más bien de que en la secuencia se evita el dinucleótido GA/TC y se prefieren AT/AT, TA/TA, GG/CC y CG/CG lo que concuerda con la tendencia a la formación de enlaces más estables con pares GC (Medrano 1989).

De acuerdo con Medrano (1989), al considerar el cambio de estabilidad por una sustitución entre dos dinucleótidos n_i y n_j , el evento puede esquematizarse de la siguiente forma:



Si el proceso no está restringido selectivamente, puede postularse que eventualmente se alcanzará el equilibrio en las abundancias de ambos nucleótidos a_i y a_j predicho por la ecuación de Arrhenius como:

$$a_j/a_i = \exp(\Delta H/RT)$$

donde R y T son respectivamente la constante de los gases y la temperatura absoluta. De acuerdo con Hopfield (1974) y con Reaney y Pressing (1984), a_j/a_i refleja la tasa de mutación entre n_i y n_j . A partir de lo anterior, si una cierta secuencia deriva de la tendencia a la formación de dinucleótidos estables, al comparar en forma semilogarítmica la relación de abundancias entre todos los dinucleótidos con las correspondientes diferencias de entalpías se obtendrá una relación lineal con pendiente negativa, ésto es:

$$\log(a_j/a_i) = \Delta H/RT \quad \text{con} \quad \Delta H < 0$$

En la Figura 14 se observa que la distribución de energía en el asa D se ajusta a la ecuación de Arrhenius lo mismo que la secuencia aleatoria con la misma composición de bases. Una secuencia aleatoria con una composición de bases generada al azar y el gen de la histona H3 del pollo, como ejemplo de un gen selectivamente restringido, no se ajustan al modelo. Esto sugiere que la evolución del asa D de los cetáceos está sujeta a la tendencia de las sustituciones a ocurrir en los sitios del DNA con menos estabilidad y que la secuencia acumula pares AT.

Un problema que enfrenta esta hipótesis radica en que la mayor parte de las sustituciones ocurren como errores de replicación en donde la estabilidad de la doble hélice de DNA no tiene una relación directa con el fenómeno mutacional aunque puede afirmarse de modo general que, independientemente del mecanismo de las mutaciones, éstas derivarán de fluctuaciones en la estructura

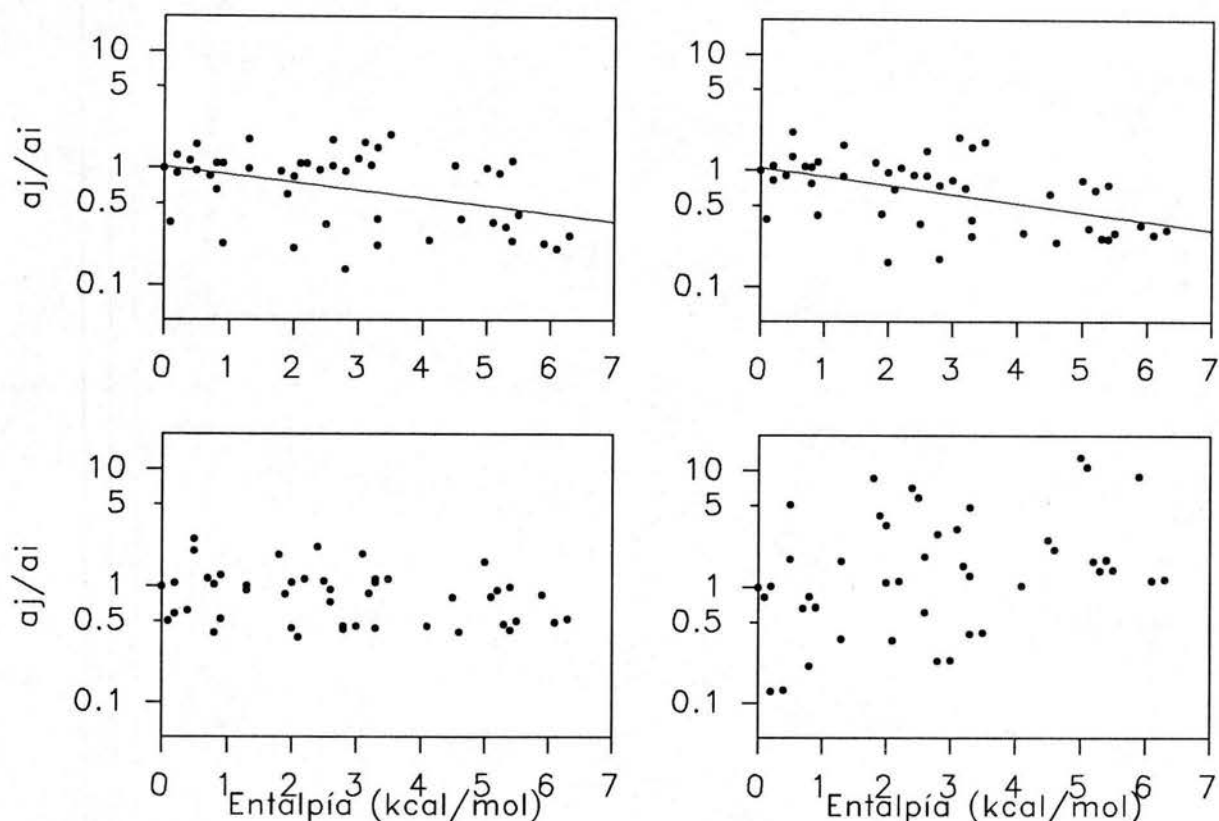


Figura 14. Proporciones entre distintos dinucleótidos (a_j/a_i) en función de sus diferencias de entalpía. Panel superior izquierdo: asa D de la ballena jorobada. Panel superior derecho: secuencia aleatoria con la misma composición que el asa D de la ballena jorobada. Panel inferior izquierdo: secuencia aleatoria con composición de bases al azar. Panel inferior derecho: Histona H3 del pollo tomada del banco de genes (Bilofsky *et al.* 1986). Se indican las líneas de regresión.

del DNA. Un posible mecanismo del efecto de la estabilidad resulta de analizar los errores de deslizamiento. La mayor parte de los pares AT forman largas series de adeninas y timinas que frecuentemente consisten de la repetición de una sola de estas bases. Este hecho llevó a Hoelzel *et al.* (1991) a postular que los errores por deslizamiento contribuyen considerablemente a la evolución del asa D de los cetáceos. Este tipo de mutaciones

resulta de inserciones o deleciones en regiones de secuencias repetidas que no se aparean correctamente durante la replicación (Li y Graur 1991). Estos errores de apareamiento tal vez puedan ser más frecuentes si el DNA en la horquilla de replicación puede abrirse facilmente. Así, puede esperarse que los errores de deslizamiento y en general de los errores de replicación dependan de la estabilidad del DNA en la vecindad en la dirección de replicación. Esta consideración importa porque, en el asa D mitocondrial, la replicación ocurre en un solo sentido. La secuencia del asa D de la ballena jorobada analizada (Árnason 1991) corresponde a la cadena pesada lo que implica que la replicación se lleva al cabo hacia la dirección 5'. Para ver si los errores de deslizamiento podrían asociarse a la estabilidad del DNA en la vecindad 5', se determinó la estabilidad promedio en las cinco bases previas a series mayores de dos pares AT en la secuencia del asa D de la ballena jorobada (Árnason 1991). Esos valores se relacionaron con la longitud de las series de pares AT como una medida gruesa de la ocurrencia de errores de deslizamiento (Figura 15). Esta medida es válida para series pequeñas pues en series muy largas, un evento mutacional puede ser responsable de una inserción de varios pares de bases. Se observa en términos generales que, en series menores de 10 pb, la longitud de la serie de pares AT está relacionada con una estabilidad baja, menor al promedio de toda la secuencia, en la vecindad 5'.

Aunque la secuencia del asa D no está sujeta a restricciones selectivas tan fuertes comparada a otros genes, ella regula la replicación y y la expresión del genoma mitocondrial (Pepe et al. 1989). Ya que el asa D no codifica ningún producto, sus propiedades funcionales deben derivar de la secuencia de DNA lo cual puede generar correlaciones de largo alcance. En el genoma de la mitocondria no parece que existan fenómenos de deriva molecular, como transposición y duplicación, (Avisé et al. 1988, Wilson et al. 1985) que generen regularidades de largo alcance en la secuencia.

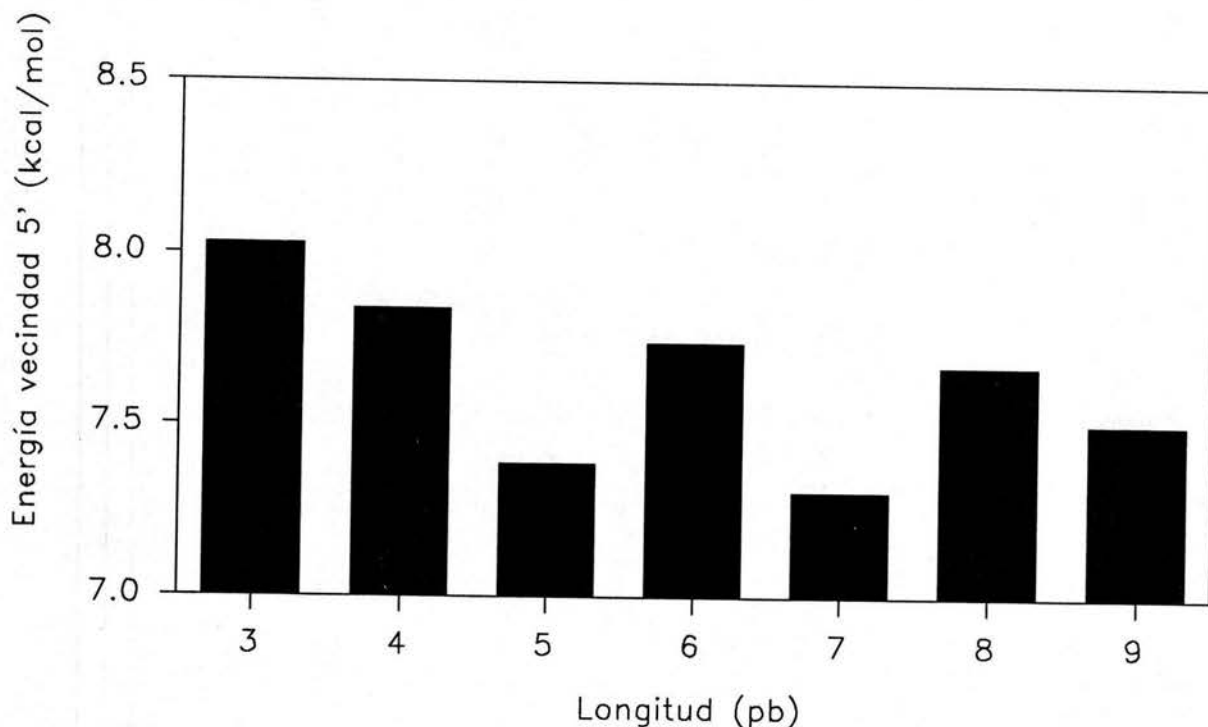


Figura 15. Estabilidad promedio en la zona de las cinco bases previas a series de pares AT con distinta longitud. El promedio de estabilidad de toda la secuencia es $\Delta H=7.9$ kcal/mol.

Para determinar la existencia de regularidades se hizo un análisis de periodicidades en la serie de símbolos (A,G,T,C) de la secuencia, en la estabilidad y en la orientación de las bases a lo largo de la secuencia del asa D de una ballena jorobada (Árnason 1991).

Una visualización de las regularidades en las series de energía, D_{ws} y D_{yr} se realizó mediante las gráficas denominadas espacio-fase en las que se relaciona el valor de la serie en el punto i vs el valor en el punto $i+1$. Se observa que el gráfico de la serie de D_{yr} es similar al de una secuencia aleatoria con la misma composición aunque esta última está más restringida alrededor de $D_{yr}=0$.

$D_{yr} > 0$
 $D_{ws} > 0$ est

Como ya se mencionó, Dws presenta valores más altos que los esperados por azar y en la curva de espacio-fase se observa que la serie de la secuencia del asa D se encuentra más concentrada en el primer cuadrante y con un carácter más caótico que la serie de la secuencia aleatoria con la misma composición de bases (Figura 16).

La existencia de regularidades de largo alcance se determinó mediante los espectros de Fourier de las series de entalpía, Dws y Dyr y mediante la función de información mutua calculada sobre la secuencia del asa D de la ballena jorobada lo cual se comparó con una secuencia aleatoria de la misma composición (Li 1992, Li y Kaneko 1992). Se observa que, en virtud del carácter caótico de la secuencia, el espectro de frecuencias $P(f)$ se aproxima a la relación potencial $P(f) \sim 1/f^\alpha$ como ha sido reportado para otras secuencias nucleotídicas (Li 1992, Li y Kaneko 1992).

A diferencia de otras secuencias no codificadoras, el asa D no muestra correlaciones de largo alcance ya que su espectro de frecuencias es similar al de una secuencia aleatoria con la misma composición (Figura 17). Esto demuestra que el asa D evoluciona fundamentalmente por fenómenos de corto alcance como son las sustituciones y los errores de deslizamiento.

Un análisis alternativo de periodicidades de corto alcance se llevó al cabo a partir del índice A_p de Enright (1965) como sigue. Una serie de N valores para la que quiere analizarse el periodo p se parte en series menores de tamaño p que se ordenan como una matriz M_p de p columnas y el entero superior de (N/p) renglones.

La periodicidad A_p se define entonces como la desviación estándar de los promedios de cada columna X_i , ésto es:

$$A_p = \left[\sum_{i=1}^p (X_i - \bar{X})^2 / (N-1) \right]^{1/2}$$

donde \bar{X} es la media de los promedios X_i . En una serie periódica se espera no sólo que haya una alta desviación entre los valores de las columnas de la matriz M_p sino que haya homogeneidad en los valores dentro de cada columna.

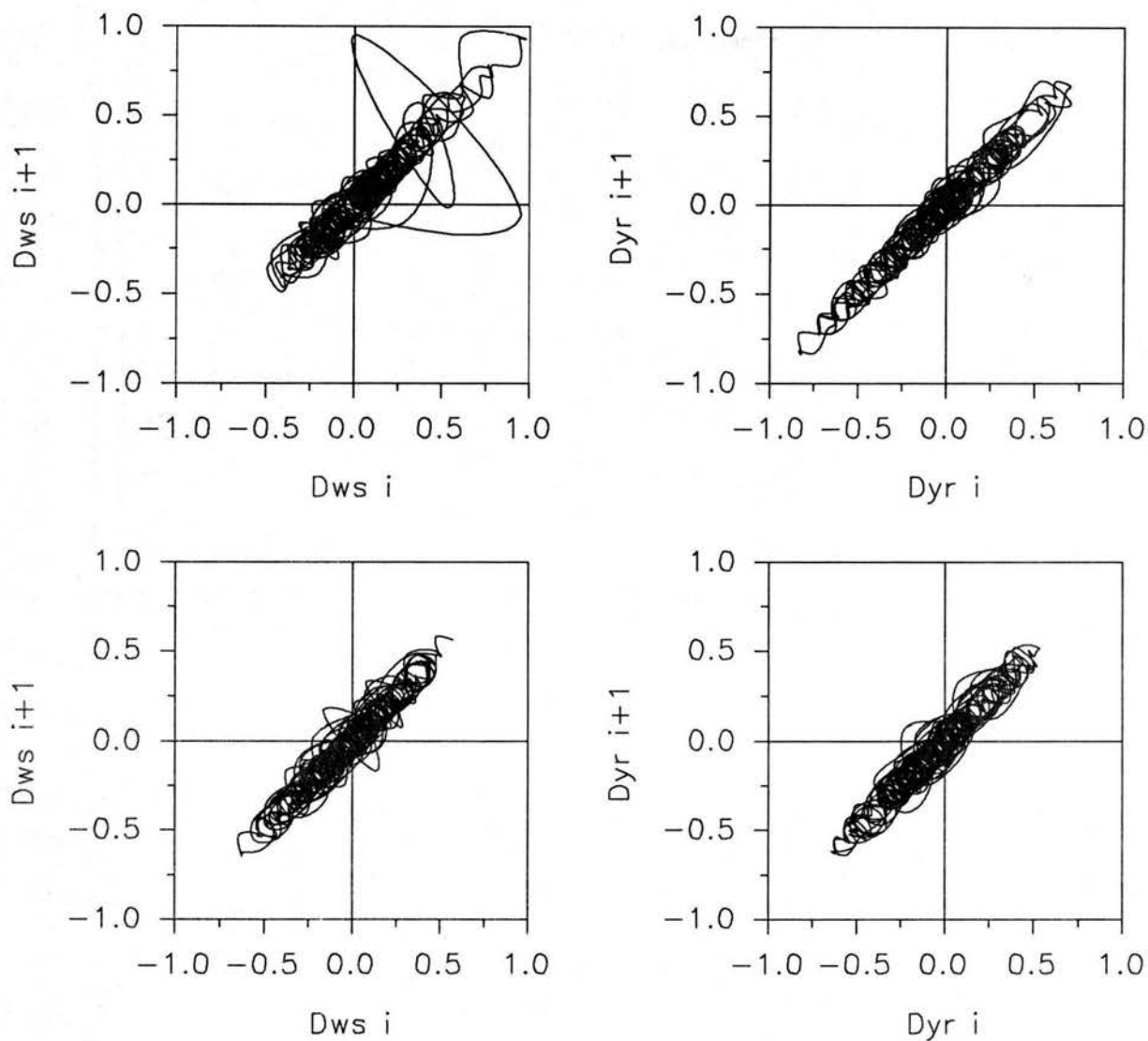


Figura 16. Curvas espacio-fase para las series de Dws (paneles izquierdos) y Dyr (paneles derechos) de la secuencia del asa de la ballena jorobada (paneles superiores) y de una secuencia aleatoria con la misma composición nucleotídica (paneles inferiores).

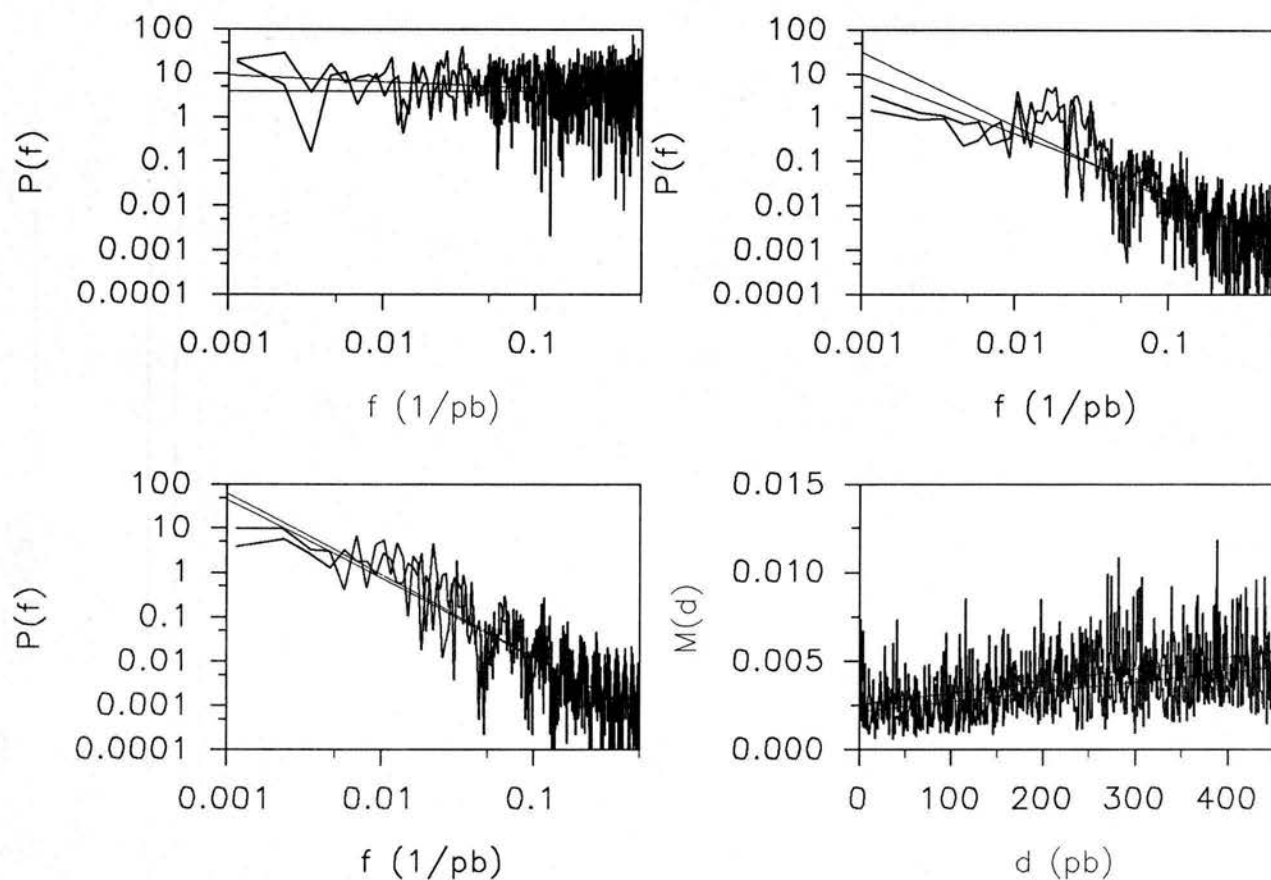


Figura 17. Panel superior izquierdo: Espectro de frecuencias, $P(f)$, de la serie de entalpías de la secuencia del asa D de la ballena jorobada y de una secuencia aleatoria de la misma composición. Panel superior derecho: Mismos espectros para las series de Dws. Panel inferior izquierdo: Espectros correspondientes para Dyr. Panel inferior derecho: Función de información mutua para distintos alcances, $M(d)$. Frecuencias expresadas en $1/\text{pb}$ y alcances en pb. Se indican las líneas de regresión. Definiciones de acuerdo a Li (1992) y a Li y Kaneko (1992).

Esta uniformidad se define como el promedio de las desviaciones dentro de cada columna (B_p) como sigue:

$$B_p = (1/p) \sum_{i=1}^p \sigma_i$$

donde σ_i son las desviaciones dentro de cada columna i . La heterogeneidad entre columnas y la uniformidad dentro de ellas se combinan entonces para definir el índice de periodicidad C_p como:

$$C_p = A_p/B_p$$

En este índice, pueden considerarse como señales de periodicidad a los valores $C_p > 1$ aunque puede haber sesgos debidos a que el número de columnas y renglones en la matriz M_p estén desbalanceados dependiendo del periodo que desee analizarse.

En el periodograma C_p para la serie de energías de DNA del asa D de la ballena jorobada se observa que existe un periodo básico de 5 pb el cual equivale a un arco de π en el giro de la doble hélice. Una secuencia aleatoria con la misma composición nucleotídica genera un periodograma en el que no se observa ningún pico de periodicidad y en el que se mantiene $C_p < 1$ (Figura 18). El periodo de 5 pb en la estabilidad del DNA puede ser, por tanto, la base física mediante la cual el asa D realice sus funciones en la regulación de la replicación.

Se analizó la periodicidad C_p-5 en las series de energías y de Dws a lo largo de la secuencia para definir probables sitios funcionales de acuerdo a la hipótesis de que regiones con mayor periodicidad pueden corresponder a sitios funcionalmente importantes (Cocho et al. 1990). Para adscribir regiones funcionales probables, se alineó la secuencia del asa D de la ballena jorobada con la de la rata obtenida del banco de genes (Bilofsky et al. 1986) en la que se han identificado señales de regulación (Pepe et al. 1989).

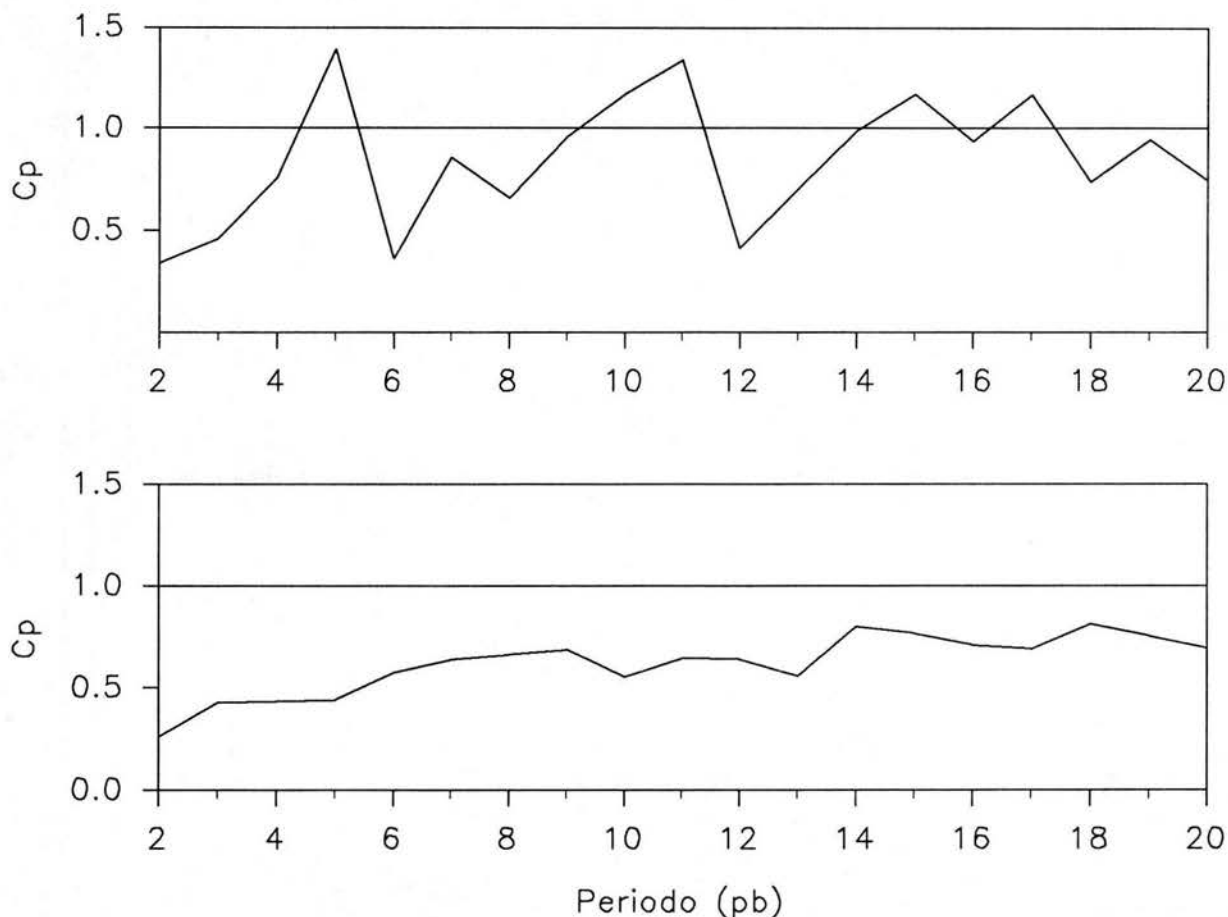


Figura 18. Panel superior: Periodograma para la serie de energías de DNA en la secuencia del asa D de la ballena jorobada. Panel inferior: Periodograma correspondiente a una secuencia aleatoria con la misma composición de bases que el asa D de la ballena jorobada.

Al igual que en la serie de energías, en general los sitios más variables corresponden a regiones con $Dws < 0$. Como se esperaba, la periodicidad $Cp-5$ se encuentra en segmentos cortos con variabilidad pequeña y se nota que ésta ocurre en sitios con baja estabilidad, esto es, en regiones donde se mezclan pares GC con pares AT (Figura 19).

Las regiones que se han identificado estar involucradas en la regulación como los bloques de secuencias conservadas (CSB) y las secuencias asociadas a la terminación (TAS) presentan picos locales de periodicidad de 5 pb (Cp-5), con excepción del primer CSB. Existen otros sitios con señal de Cp-5 al centro de la secuencia que es donde se encuentra más conservada. Sitios como el origen de replicación de la cadena pesada (OH), y los promotores de la replicación (LSP y HSP) no presentan periodicidad Cp-5. La curvatura del DNA descrita por Pepe *et al.* (1989) entre OH y HSP presenta un hueco considerable de Cp-5 interrumpido por el pico en el segundo CSB. En el perfil de Dyr (no mostrado) la curvatura corresponde a un marcado ciclo casi perfectamente sinusoidal donde la mitad del extremo 5' tiene $Dyr < 0$ y la mitad del lado 3' tiene $Dyr > 0$ (Figura 19).

En los eucariontes, las funciones de regulación de la replicación y la expresión génica están vinculadas y parecen depender de los mismos mecanismos de reconocimiento de sitios específicos en el DNA por proteínas (Heintz *et al.* 1992). Este mismo principio parece controlar la expresión y la replicación del genoma mitocondrial en el asa D (Pepe *et al.* 1989). Los distintos procesos reguladores en el asa D parecen depender de la interacción entre señales de distinto nivel estructural en el DNA como la secuencia nucleotídica, la formación de lazos y la presencia de una curvatura en la región del origen de replicación OH y su promotor HSP que puede influir en el reconocimiento de las distintas señales de regulación presentes en esa zona (Pepe *et al.* 1989), como propusieron originalmente Koespel y Kahn (1986).

El análisis desarrollado aquí sugiere que las distintas zonas de regulación pueden identificarse a partir de las propiedades físicas y geométricas del DNA, como la estabilidad de la doble hélice y la orientación de las bases, que pueden inferirse a partir de la secuencia nucleotídica. Tal vez, las propiedades físicas del DNA sean el común denominador de los distintos niveles de estructura de las señales de regulación en el asa D.

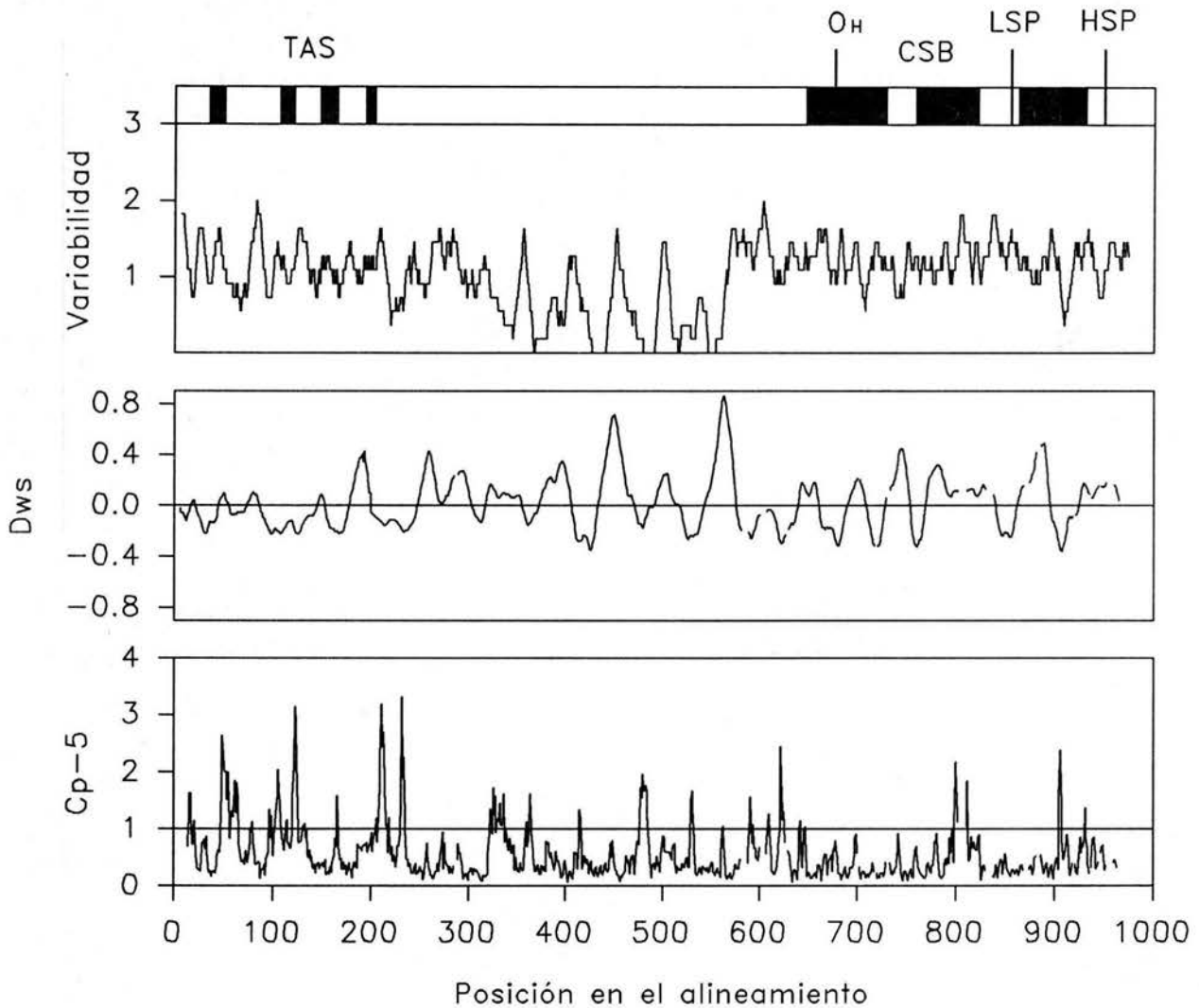


Figura 19. Panel superior: Perfil de variabilidad del alineamiento entre las asas D de la ballena jorobada y de la rata. Paneles medio e inferior: Perfiles de Dws y periodicidad Cp-5 en la serie de Dws del asa D de la ballena jorobada. Se indican las regiones funcionales identificadas en el asa D de la rata.

Inferencias sobre la identificación del sexo.

La determinación del sexo en las poblaciones animales naturales es importante para comprender la organización social, los hábitos reproductivos y la estructura y dinámica de dichas poblaciones. En el caso de los cetáceos el sexo puede determinarse mediante observación directa, frecuentemente subacuática (Glockner 1983), y por diferentes análisis en muestras de tejido. En las ballenas jorobadas se han hecho intentos de identificación del sexo por la observación del corpúsculo de Barr (Winn *et al.* 1973) pero la obtención de cariotipos muestra que las observaciones citológicas no son confiables (Lambertsen y Duffield 1987, Lambertsen *et al.* 1988). Sin embargo, es muy difícil obtener cromosomas en virtud de que se requiere del cultivo de células, el cual necesita de mucho trabajo y tiene muchas posibilidades de fracaso. Uno de los problemas más importantes que resolver al respecto es la contaminación de las muestras de tejido por microorganismos, lo cual es difícil de evitar en las condiciones habituales de trabajo en el mar (Mathews *et al.* 1988). Por su parte, los métodos moleculares son también muy confiables, fáciles de realizar y necesitan de procedimientos simples para preservar las muestras. La identificación del sexo en los cetáceos por métodos moleculares se ha realizado fundamentalmente por medio de la hibridización de sondas radioactivas obtenidas del cromosoma Y (Baker *et al.* 1991). Los avances en los procedimientos de la reacción de polimerización en cadena (PCR) y el hallazgo de fragmentos conservados en los cromosomas sexuales, ha permitido el desarrollo de un método para la determinación del sexo de cetáceos consistente en un sencillo ensayo de restricción sobre un fragmento de DNA amplificado que es homólogo en los cromosomas X e Y (Palsbøll *et al.* 1992) el cual se utilizó en el presente estudio.

La identificación del sexo de 43 ballenas jorobadas en distintas agrupaciones sociales se resume en el Cuadro 6 el cual es coherente en forma general con diversos tipos de evidencias (Baker 1985, Baker y Herman 1984, Baker *et al.* 1991, Clapham *et al.* 1992, Darling *et al.* 1983, Glockner 1983, Tyack y Whitehead 1982, Winn *et al.* 1973).

La mayor parte de las muestras proviene de grupos activos en superficie los cuales consisten de tres o más animales y que han sido descritos como grupos competitivos de machos. Concretamente, se considera que estas agrupaciones consisten de machos que compiten por aparearse con una hembra que habitualmente se encuentra al frente de la agrupación (Baker y Herman 1984, Glockner 1983, Mobley y Herman 1985, Tyack y Whitehead 1982). Se han hecho determinaciones del sexo en grupos completos de este tipo que demuestran esta afirmación aunque se deben mantener algunas reservas cuando se interpreta su observación ya que el comportamiento y la composición de los grupos cambia con el tiempo, existen otras conductas de actividad en superficie y una fracción considerable de los grupos de competencia consiste solamente de machos (Clapham *et al.* 1992). En forma concordante, todas las muestras, con excepción de una, de grupos activos en superficie son de machos. La única hembra encontrada en estas agrupaciones fue una animal pequeño que navegaba junto al animal que parecía dirigir al grupo. Por su conducta y tamaño, se considera que este animal tenía un año de edad y que aún se encontraba con su madre.

Asimismo, se encontró que tres animales cantores, a los que se fotoidentificó y grabó, fueron machos lo que se registra como evidencia adicional a observaciones previas en el mar (Darling *et al.* 1983, Glockner 1983) y a análisis citológicos en biopsias de piel (Winn *et al.* 1973). Se ha descrito que el canto de las ballenas jorobadas es un despliegue de cortejo de los machos (Tyack 1981), pero no se han observado interacciones ciertas con hembras.

Cuadro 6. Cantidad de machos y hembras en diferentes agrupaciones sociales de ballenas jorobadas en la Bahía de Banderas (BB) y el Archipiélago Revillagigedo (RA).

	BB	RA	Machos	Hembras	Totales
Grupos de competencia.	5	14	18	1	19
Tríos.	1	1	1	1	2
Parejas.	3	2	3	2	5
Solos.	1	-	1	-	1
Adultos con cría.	7	3	-	10	10
Escoltas.	1	-	1	-	1
Crías.	1	1	2	-	2
Cantores.	-	3	3	-	3
Totales.	19	24	29	14	43

Durante nuestro trabajo en las Islas Revillagigedo, en dos ocasiones se observaron cantores que interrumpieron el canto por la aproximación de otras ballenas que se les unieron para formar parejas sin que hubiese alguna conducta de agresión. En un caso, la ballena que se acercó al cantor fue un animal adulto con una cría el cual resultó ser hembra luego del análisis de la biopsia colectada. En el otro caso, dos ballenas se aproximaron al cantor y una de ellas saltaba. Uno de los animales se unió al cantor y también resultó ser una hembra. Ya se ha descrito la aproximación y unión de ballenas a cantores haciéndolos interrumpir el canto (Tyack 1981) pero se ha observado una conducta de agresión o de evitación después del encuentro. También, el hecho de que los cantores se evitan unos a otros y la complejidad misma de la canción lleva a Tyack (1981) a proponer que el canto tiene una función reproductora al comunicar a la hembras la posición de una pareja potencial y posiblemente al repeler a otros machos.

Nuestras observaciones y determinaciones apoyan ese postulado y además, hasta donde sabemos, este trabajo informa por vez primera la interacción no agonística de hembras y cantores identificados positivamente como machos.

Los machos representan el 75 % de las muestras en Revillagigedo, lo que refleja el hecho de que la mayoría de las muestras se recolectaron en grupos de machos en competencia. En otros trabajos se han observado desbalances en la proporción de sexos que se han atribuido a sesgos por el tamaño de la muestra consistentes en que ciertas agrupaciones están poco representadas como son las hembras con cría (Baker *et al.* 1991). En la Bahía de Banderas, en donde las distintas agrupaciones están mejor representadas, especialmente las hembras con cría, se observa que los machos son sólo un poco más abundantes que las hembras habiendo una proporción de sexos cercana a 1:1 en acuerdo con otros estudios (Chittleborough 1958, 1965, Clapham y Mayo 1987b).

Ya que la conducta reproductiva de las ballenas jorobadas depende de su sexo y actividad y, como el proceso de muestreo a su vez depende de esa conducta, debe cuestionarse si una cierta muestra de biopsias refleja la composición de sexos de la unidad demográfica en estudio. Una restricción importante para este tipo de investigación resulta de que las diferentes agrupaciones sociales cambian durante la temporada de reproducción. Por ello, la identificación del sexo, en la que se busca analizar la estructura poblacional, requiere de datos independientes en la composición por agrupaciones sociales en el transcurso del tiempo. La observación sistemática desde faros y acantilados puede ser útil para este propósito.

Otro problema resulta de que la unidad demográfica a tratar debe definirse. Como se ha visto, los estudios de fotoidentificación y de variabilidad genética (Baker 1992, Baker *et al.* 1993, Perry *et al.* 1988, 1990) sugieren que en el Pacífico nororiental existe una subpoblación Alaska/Hawái y otra California/México. Las ballenas del Archipiélago Revillagigedo

parecen ser una agrupación separada recientemente de la subpoblación costera del Pacífico oriental (Alvarez et al. 1990, Ladrón de Guevara et al. 1993, Urbán y Aguayo 1987, Urbán et al. 1989). En la región de la costa mexicana, los reavistamientos en el mismo año entre Baja California y Bahía de Banderas, y los reavistamientos dentro de esas zonas por varias semanas, sugieren que las ballenas jorobadas tienen diferentes patrones de movimientos en las zonas de reproducción (Observaciones no publicadas del Grupo de mamíferos y tortugas marinas de la Facultad de Ciencias). Como se mencionó, las ballenas que se alimentan frente a la costa de California también se han observado reproduciéndose frente a las costas de América central (Steiger et al. 1991) y, aunque no existen comparaciones con el Pacífico mexicano, estas ballenas probablemente pasan o incluso se reproducen a lo largo de toda la costa mexicana como lo sugieren avistamientos hechos en las costas de Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Gallo et al. 1986 y observaciones no publicadas del Grupo de mamíferos y tortugas marinas de la Facultad de Ciencias UNAM). Por ello, la estructura de la población de las ballenas jorobadas en sus zonas de reproducción no puede describirse como un sistema estático y cerrado. La composición de sexos parece variable en tiempo y en espacio, y relacionada con la estructura genética y geográfica de la población.

En virtud de que la estructura grupal parece estar mejor representada en la muestra de Bahía de Banderas, se construyó una distribución temporal por sexos para determinar si existen patrones diferentes para machos y hembras (Figura 20). Las ballenas jorobadas se observan en la Bahía de Banderas entre noviembre y abril habiendo una mayor abundancia a finales de enero e inicios de febrero (Urbán y Aguayo 1987 y observaciones no publicadas del Grupo de mamíferos y tortugas marinas de la Facultad de Ciencias UNAM). Los patrones temporales muestran que las hembras aparecen con una distribución normal siendo más abundantes a principios de febrero, lo que se ve como el punto de inflexión en la distribución acumulada. Los machos, presentan un

patrón más irregular apareciendo de forma más súbita a mediados de enero y a finales de febrero. Para ver si este patrón se relaciona con la conducta reproductiva, la distribución temporal de los machos se comparó con el patrón correspondiente de grupos de competencia a partir de una base de datos de observaciones hechas de 1986 a 1991 (Salas 1993). La gráfica en la Figura 20 sugiere que la aparición de los machos en la zona de Bahía de Banderas está vinculada a la actividad de competencia.

Un incremento en la ocurrencia de grupos de competencia al final de la temporada reproductiva puede esperarse ya que se sabe que las hembras abandonan las zonas de reproducción antes que los machos, poco tiempo después de aparearse (Clapham *et al.* 1992, Dawbin 1966, Nishiwaki 1966). Este incremento también se ha observado en Hawai (Baker y Herman 1984, Mobley y Herman 1985). La considerable actividad competitiva antes del arribo completo de las hembras se observa más evidente en nuestros resultados pero su interpretación es más difícil. En las zonas de reproducción de las Indias occidentales Clapham *et al.* (1992) han registrado la existencia de grupos de competencia compuestos sólo por machos en los cuales, se postula, se establecen relaciones de dominancia. Al establecerse jerarquías, los machos podrían reconocerse en futuros encuentros e incluso cooperar en grupos de competencia ante la llegada de las hembras. Podría esperarse que en general los grupos de competencia formados enteramente por machos se presenten antes de la llegada de las hembras por lo que se predice que estas agrupaciones ocurran antes que los grupos clásicamente descritos en las que hay una hembra. Los datos de Clapham *et al.* (1992) en su Cuadro 1, sugieren que esto es cierto, aunque algunos grupos formados sólo por machos se presentan en etapas tardías de la temporada de reproducción (Clapham en comunicación personal).

La hipótesis de que el arribo previo de los machos a las zonas de reproducción establece relaciones de dominancia no explica la agresión que se observa en los machos el resto del año.

Un análisis de los catálogos de identificación fotográfica en México (Salas 1993) indica que las ballenas jorobadas hacen un uso más o menos específico de sus zonas de reproducción, siendo la Bahía de Banderas una región principalmente de apareamiento mientras que el área entre Baja California y Bahía de Banderas, ésto es, las inmediaciones de las Islas Mariás, es una región para el alumbramiento y el cuidado de las crías. Esto puede ser una respuesta ante la creciente actividad humana, principalmente turística, en la costa mexicana del Pacífico que restringe a las ballenas con crías, que son más sensibles a la perturbación, a zonas alejadas de la costa menos afectadas por el tráfico de embarcaciones como son los alrededores de las Islas Mariás. De ser así, puede esperarse que los machos, en promedio, arriben primero que las hembras y exhiban la actividad competitiva antes de la llegada completa de las hembras a las zonas que se han restringido más para el apareamiento como la Bahía de Banderas. Se ha descrito que las ballenas jorobadas migran diferencialmente por clases de edad y sexo hacia las zonas de reproducción (Dawbin 1966, Nishiwaki 1966) habiendo una pequeña diferencia entre machos y hembras considerados globalmente. Aquí se postula que el arribo distinto de machos y hembras a la zona de Bahía de Banderas resulta de hábitos distintos de machos y hembras en las zonas de reproducción de la costa pacífica mexicana en adición al pequeño desfase que se observa en la migración desde las zonas de alimentación.

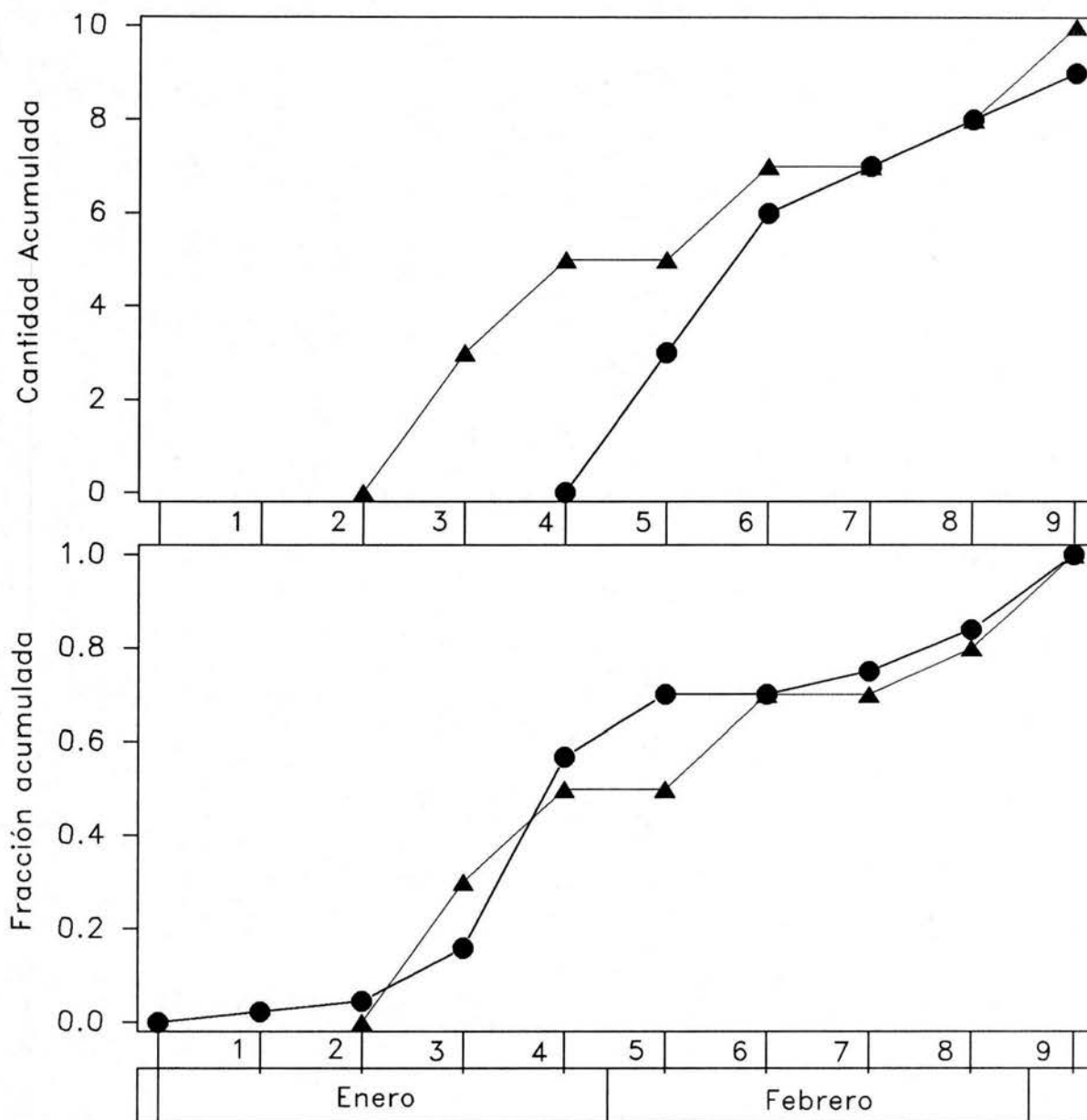


Figura 20. Panel superior: Distribución temporal acumulada de machos (Δ) y hembras (0) en la Bahía de Banderas conjugando biopsias colectadas en 1990, 1991 y 1992. Panel inferior: Distribución temporal acumulada de los 10 machos identificados (Δ) y de 44 grupos de competencia observados de 1986 a 1991 (0). Las unidades de tiempo señalan las semanas transcurridas a partir del día primero de enero.

CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación concuerdan con la hipótesis de que en el Pacífico nororiental existen las subpoblaciones de ballenas jorobadas California/México y Alaska/Hawai, las cuales se mezclan en las zonas de reproducción. Las ballenas del Archipiélago Revillagigedo se separaron recientemente de las ballenas de la costa Pacífica oriental durante los últimos 10 000 años como resultado de los cambios climáticos mundiales en este tiempo. La subpoblación americana a su vez presenta una estructura genética clinal, que deriva de la regularidad en los hábitos migratorios de los animales y de la historia reciente de la especie, en la que las zonas de reproducción se han ido desplazando desde América central hacia el norte como producto del calentamiento del océano durante los últimos 10 000 años. La diversidad genética de la población del Pacífico norte ha sido influenciada por las ballenas jorobadas del Hemisferio sur. Aunque los rorcuales jorobados tienen hábitos filopátricos, la mezcla ocasional de las ballenas jorobadas en sus zonas de reproducción hace que, a largo plazo, la población del Pacífico norte se aproxime a la panmixia. Asimismo, los cambios del clima a corto y largo plazo en conjunto con las actividades humanas, especialmente de la industria ballenera, en el Pacífico durante los últimos 200 años, deben haber contribuido al crecimiento de las agregaciones de ballenas jorobadas en los Archipiélagos Revillagigedo y Hawai. La hipótesis de la estructura clinal y de su origen sugieren que en la actualidad puede haber una relación entre las variaciones climáticas anuales y la abundancia e intercambio en las zonas de la costa pacífica y las Islas Revillagigedo, la cual debe evaluarse para determinar mejor la relación entre estas subpoblaciones. Resultados preliminares muestran que la estructura genética clinal determina una estructura genética temporal en la costa mexicana del Pacífico y que existe una relación entre la identidad de los tipos mitocondriales con la coloración caudal consistente en que los

tipos F presentan un patrón más claro. Pese a los alcances de los estudios genéticos, una interpretación más adecuada de ellos depende de obtener más datos de fotoidentificación, particularmente de las zonas de reproducción al sur de México y en las zonas de alimentación.

La identificación del sexo confirma interpretaciones previas de la conducta de las ballenas jorobadas descritas en las Indias occidentales y Hawai, y se registra por vez primera la interacción no agonística de hembras con cantores identificados como machos, lo cual confirma el carácter reproductivo del canto en las ballenas jorobadas. También se observa que los machos arriban primero que las hembras a sus zonas de reproducción lo cual se relaciona con la actividad de competencia en los primeros. Este fenómeno puede ser una alteración en los hábitos de las ballenas jorobadas debida a la creciente actividad humana en la costa mexicana del Pacífico.

La abundancia de ballenas jorobadas en el Pacífico mexicano y la mayor variabilidad genética en esta zona comparada a la subpoblación Alaska/Hawai, variabilidad que está vinculada a una dinámica e historia poblacional complejas, hacen que esta región sea importante para la recuperación de la especie no solamente en términos de cantidad sino también cualitativos, pues el Pacífico mexicano parece representar el principal legado y la fuente de riqueza genética de las ballenas jorobadas en el Pacífico norte. Una reinterpretación de los datos de Salas (1993), en donde se observa que la tasa de crecimiento poblacional en el Pacífico mexicano es mayor que en Hawai en virtud de una gran proporción de ovulaciones y concepciones postparto, sugiere que las ballenas del Pacífico mexicano se encuentran más alejadas de su capacidad de carga en comparación a las ballenas de Hawai. La población de ballenas jorobadas en el Pacífico norte no forma un conjunto estático y cerrado sino que, al cambiar a largo y corto plazo en respuesta a los cambios del clima y a los efectos de las actividades humanas en el mar, presenta una estructura y dinámica complejas.

El hecho de que las ballenas jorobadas en el Pacífico mexicano representen, en términos de abundancia y de variabilidad genética, una fracción importante en el Pacífico norte, y el hecho de que haya alteraciones en sus áreas de reproducción, obliga a nuestro país a estudiar a esta especie y a regular las actividades humanas que afectan su recuperación.

La variabilidad genética como evento evolutivo deriva no sólo de los hábitos de los organismos y de su dinámica poblacional sino también de una dinámica molecular con restricciones físicas y biológicas propias. En el asa D, estas restricciones resultan de las propiedades del DNA, cuyo análisis ha mostrado que algunas regularidades en la orientación de las bases nitrogenadas y principalmente en la estabilidad de la doble hélice pueden ser la base física de los fenómenos de regulación de la replicación y la expresión génica que realiza esta porción del genoma mitocondrial. Asimismo, en virtud de que los factores selectivos en el asa D son débiles comparados a otros genes, la variabilidad genética en esta zona depende de la fenomenología mutacional, la cual a su vez depende de la estabilidad del DNA. Los análisis de periodicidades muestran que el asa D evoluciona fundamentalmente por procesos de corto alcance como sustituciones nucleotídicas y errores de deslizamiento. La incidencia de mutaciones en sitios con poca estabilidad debe, por tanto, ser la consecuencia de un proceso de efectos globales en el que los errores de replicación que originan estructuras más estables prevalecen a largo plazo de manera que puede determinarse una tendencia a la formación de secuencias más estables.

Con todo lo anterior, se ha pretendido mostrar cómo el estudio de la variabilidad genética puede usarse para hacer inferencias sobre los hábitos de los organismos, su historia y su dinámica como población o especie, y de qué forma esta variabilidad puede comprenderse a partir de lo que Cocho y Rius (1991) definen como aproximación analítico-histórica. Sólo queda por hacer patente que la consecución bien o mal lograda de ello ha resultado del esfuerzo de muchas personas.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en la Facultad de Ciencias UNAM como parte de los programas de investigación "Mamíferos marinos del Pacífico mexicano", que dirigió Anelio Aguayo hasta 1992, y "Dinámicas discretas en Biología", encabezado por Germinal Cocho. Ambos en conjunto con Pedro Miramontes, Miguel Betancourt y C. Scott Baker, este último de la Universidad de Auckland, dirigieron la investigación en etapas diferentes desde su concepción en 1988 hasta hoy. Siempre, numerosas personas e instituciones brindaron su ayuda generosa. Agradezco...

...A mis compañeros en el Grupo de mamíferos y tortugas marinas, con quienes he compartido las labores en el mar. Hago un reconocimiento sincero a Mario Salinas, Paloma Ladrón de Guevara, Carlos Esquivel, Ma. Carmen García, Rafael Sánchez, Ivonne Vomend, Carlos Alvarez, Nemesio Vargas, Isabel Salas, Isabel Fuentes y a todos los estudiantes de la UNAM que nos han auxiliado.

...A Antonio Lazcano, Ana Ma. Velasco, Raquel Ortega, Renato Cappello y Mauricio Ortega del Laboratorio de Microbiología que se han solidarizado de formas distintas con la investigación.

...A mis compañeros profesores y a los estudiantes de mis cursos por su tolerancia en las ausencias que la investigación me obligó a cometer.

...A Manuel Uribe, Luis Eguiarte y Oscar Flores por su valiosa labor como sinodales y a David Auriolés por sus comentarios y solidaridad.

...Al Departamento de Histología de la Facultad de Medicina UNAM por la ayuda con el cultivo de células y con las técnicas histológicas. Mi reconocimiento particular es a Pedro Nicolás Velázquez, Armando Pérez y Eduardo Casas.

...El auxilio de los pobladores de Punta de Mita, Nayarit, particularmente a Justino, Margarita y sus hijos, a Marcial y a Don Chente. Hago un reconocimiento especial a Ismael Casillas (†) cuya amistad y habilidad inspiran mi trabajo en el mar.

...A Stephen R. Palumbi, Anjanette Perry, Eduard Metz, Paul Armstrong y Owen McMillan del Kewalo Marine Laboratory de la Universidad de Hawai por su ayuda en el procesamiento de las muestras de tejido y por su hospitalidad.

...A Ramón Ruíz y a Jeff Patton del Mote Marine Laboratory de Florida por ayudarnos a iniciar la recolecta de biopsias con su asesoría y con la ballesta que generosamente nos donaron. También doy las gracias a Jeff Jacobsen de Arcata, California y sus estudiantes por su colaboración en la Isla Socorro.

...Al resto de mis amigos, especialmente a Julio Prieto y Gabriela Rosas por su solidaridad en cosas diversas, a Theresa Bosques por corregir el texto en francés, y a Hugo Acuña y Rosario Ortiz por el trabajo de edición e impresión.

...A la H. Armada de México, especialmente al Sector Naval de Isla Socorro, y al CETMAR # 6 de la Cruz de Huanacastle por el apoyo logístico, y a las autoridades de la Facultad de Ciencias UNAM y a SEDESOL por las facilidades recibidas.

...A los proyectos CONACyT 0037 N-9106, PADEP UNAM FC-9004, DGAPA UNAM 105289 y a la beca del SNI, con los cuales la investigación y mi persona recibieron apoyo.

...A mi familia, especialmente a mis padres y hermanos; Luis, Esther, Héctor, Ana Alicia y Marco Antonio, por su ayuda y su tolerancia, y a mis abuelos; Gerónimo (†) y Domitila (†), por su ejemplo.

Me considero afortunado porque en esta búsqueda haya encontrado también a Rosalba a quien la investigación le debe su esfuerzo, descuidos a su persona y muchos sueños por lo que no puedo hacer menos que dedicarle este trabajo.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme forjar en su seno una bella forma de vida.

Luis Medrano González. Noviembre de 1993.

REFERENCIAS

- Aguayo L.A., Urbán J. y Salinas M.A. 1985. El rorcual jorobado (*Megaptera novaeangliae*) durante la estación reproductora en Bahía de Banderas, México. Memorias de la IX Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. La Paz, BCS.
- Alizon M., Wain-Hobson S., Montagnier L. y Sonigo P. 1986. Genetic variability of the AIDS virus: Nucleotide sequence analysis of two isolates from african patients. *Cell* 46: 63-74.
- Alvarez F.C.M. 1987. Fotoidentificación del rorcual jorobado (*Megaptera novaeangliae*, Borowski 1781), en las aguas adyacentes a la Isla Isabel, Nayarit, México, (Cetacea: Balaenopteridae). Tesis profesional. Facultad de Ciencias UNAM.
- Alvarez C., Aguayo A., Rueda R. y Urbán J. 1990. A note on the stock size of humpback whales along the Pacific coast of México. Reports of the International Whaling Commission (special issue 12): 191-193.
- Amos W. y Hoelzel A.R. 1990. DNA fingerprinting cetacean biopsy samples for capture-recapture population census. Reports of the International Whaling Commission (special issue 12): 79-85.
- Árnason A., Spilliaert R., Daniélsdóttir A.K., Sigurosson J.H., Pálsdóttir A., Duke E.J., Joyce P., Groves V. y Trowsdale J. 1991. Review of protein and DNA marker studies in relation to stock identity of North-Atlantic fin whales (*Balaenoptera physalus*). Report for the International Whaling Commission (SC/F91/F16).
- Árnason U. 1972. The role of chromosomal rearrangement in mammalian speciation with special reference to Cetacea and Pinnipedia. *Hereditas* 70: 113-118.
- Árnason U. 1974. Comparative chromosome studies in Cetacea. *Hereditas* 77: 1-36.
- Árnason U. 1981. Localization of NORs in cetacean karyotypes. *Hereditas* 95: 269-275.
- Árnason U. 1991. Sequence composition of the D-loop in mitochondrial DNA of the fin, blue and humpback whales. Report for the International Whaling Commission (SC/F91/F31).

- Árnason U. y Benirschke K. 1973. Karyotypes and idiograms of sperm and pygmy sperm whales. *Hereditas* 75: 67-74.
- Árnason U., Benirschke K., Mead J.G. y Nichols W.W. 1977. Banded karyotypes of three whales: *Mesoplodon europaeus*, *M. carlhubbsi* and *Balaenoptera acutorostrata*. *Hereditas*, 87: 189-200.
- Árnason U., Gullberg A. y Widegren B. 1991a. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the fin whale, *Balaenoptera physalus*. *Journal of Molecular Evolution* 33: 556-568.
- Árnason U., Lutley R. y Sandholt B. 1980. Banding studies on six killer whales: an account of C-band polymorphism and G-band patterns. *Cytogenetics and Cell Genetics* 28: 71-78.
- Árnason U., Purdom I.F. y Jones K.W. 1978. Conservation and chromosomal localization of DNA satellites in balaenopterid whales. *Chromosoma (Berl)* 66: 141-159.
- Árnason U., Spilliaert R., Pálsdóttir A. y Árnason A. 1991b. Molecular identification of hybrids between the two largest whale species, the blue whale (*Balaenoptera musculus*) and the fin whale (*B. physalus*). *Hereditas* 115: 183-189.
- Árnason U. y Widegren B. 1984a. Studies on ribosomal DNA in cetaceans (whales). *Hereditas* 101: 149-154.
- Árnason U. y Widegren B. 1984b. Different rates of divergence in highly repetitive DNA of cetaceans. *Hereditas* 101: 171-177.
- Avise J.C., Ball R.M. y Arnold J. 1988. Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: A comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Molecular Biology and Evolution* 5: 331-344.
- Bachelard G. 1942. *El agua y los sueños*. Fondo de Cultura Económica. México. 1978.
- Baker C.S. 1985. The population structure and social organization of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the central and eastern North Pacific. Ph.D. dissertation. University Microfilms International, Ann Arbor. University of Hawaii.
- Baker C.S. 1992. Genetic variability and stock identity of humpback whales. World-wide. Report for The International Whaling Commission.

- Baker C.S. y Herman L.M. 1984. Aggressive behavior between humpback whales. *Canadian Journal of Zoology* 62: 1922-1937.
- Baker C.S. y Herman L.M. 1987. Alternate population estimates of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in Hawaiian waters. *Canadian Journal of Zoology* 65: 2818-2821.
- Baker C.S., Herman L.M., Perry A., Lawton W.S., Straley J.M., Wolman A.A., Kaufman G.D., Winn H.E., Hall J.D., Reinke J.M. y Ostman J. 1986. Migratory movement 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., Lambertsen R.H., Weinrich M.T., Calambokidis J., Early G. y O'Brien S.J. 1991. Molecular genetic identification of the sex of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Reports of the International Whaling Commission (special issue 13)*: 105-111.
- Baker C.S., Palumbi S.R., Lambertsen R.H., Weinrich M.T., Calambokidis J. y O'Brien S.J. 1990. Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nature* 344: 238-240.
- Baker C.S., Perry A., Bannister J.L., Weinrich M.T., Abernethy R.B., Calambokidis J., Lien J., Lambertsen R.H., Urbán J.R., Vasquez O., Clapham P.J., Alleng A., O'Brien S.J. y Palumbi S.R. 1993. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 8239-8243.
- Baker C.S., Perry A. y Herman L.M. 1987. Reproductive histories of female humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the North Pacific. *Marine Ecology Progress Series* 41: 103-114.
- Baker R.J., Qumsiyeh M.B. y Hood C.S. 1987. Role of chromosomal banding patterns in understanding mammalian evolution. pp 67-95. En: Genoways H.H. ed. *Current Mammalogy* VI.
- Bengtsson B.O. 1980. Rates of karyotype evolution in placental mammals. *Hereditas* 92: 37-47.
- Benirschke K. y Kumamoto A. 1978. The chromosomes of Cuvier's beaked whale, *Ziphius cavisrostris*. *Mammal Chromosomes Newsletters* 19: 70-72.
- Benzer S. 1961. On the topography of the genetic fine structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 47: 403-415.

- Bernardi G., y Bernardi G. 1986. Compositional constraints and genome evolution. *Journal of Molecular Evolution* 24: 1-11.
- La Sagrada Biblia. Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana. México. 1951.
- Bilofsky H.S., Burks C., Fickett J.W., Goad W.R., Lewitter F.I., Rindone W.P., Swindell C.D. y Tung C.S. 1986. The Genbank genetic sequence databank. *Nucleic Acids Research* 14: 1-4
- Bio-Rad life science group. 1989. Acrylamide polimerization. A practical approach. *Bio-Rad bulletin* 1156.
- Breslauer K.J., Frank R., Blöcker H. y Marky L.A. 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83: 3746-3750.
- Bush G.L., Case S.M., Wilson A.C. y Patton J.L. 1977. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 3942-3946.
- Campos R.R. 1989. Fotoidentificación y comportamiento del rorcual jorobado, *Megaptera novaeangliae* (Borowski 1781), en las aguas adyacentes al Archipiélago de Revillagigedo, México. (Cetacea: Balaenopteridae). Tesis profesional. Facultad de Ciencias UNAM.
- Chittleborough R.G. 1958. The breeding cycle of the female humpback whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre). *Australian Journal of Freshwater and Marine Research* 9: 1-18.
- Chittleborough R.G. 1965. Dynamics of two populations of the humpback whale, *Megaptera novaeangliae* (Borowski). *Australian Journal of Freshwater and Marine Research* 16: 33-128.
- Clapham P.J. y Matilla D.K. 1993. Reactions of humpback whales to skin biopsy sampling on a West Indies breeding ground. *Marine Mammal Science* 9: 382-391.
- Clapham P.J. y Mayo C.A. 1987a. The attainment of sexual maturity in two female humpback whales. *Marine Mammal Science* 3: 279-283.
- Clapham P.J. y Mayo C.A. 1987b. Reproduction and recruitment of individually identified humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, observed in Massachusetts Bay, 1979-1985. *Canadian Journal of Zoology* 65: 2853-2863.

- Clapham P.J., Palsbøll P.J., Mattila D.K. y Vasquez O. 1992. Composition and dynamics of humpback whale competitive groups in the West-Indies. *Behaviour* 122: 182-194.
- Cocho G., Medrano L., Miramontes P. y Rius J.L. 1991. Selective constraints over DNA sequence. pp 63-69. En: Peliti L. ed. *Biologically inspired physics*. Plenum press. New York, NY.
- Cocho G. y Rius J.L. 1991. Towards an analytical-historical synthesis of evolution. *Rivista di Biologia-Biology Forum* 84: 560-562.
- Cocho G., Rius J.L., Medrano L. y Miramontes P. 1990. Structural constraints, DNA periodicities and gene dynamics. pp 465-475. En: Yacamán M.J., Romeu D., Castaño V. y Gómez A. eds. *Quasycrystals and incommensurate structures in condensed matter*. World Scientific Press. New York, NY.
- Cohn J.P. 1990. Genetics for wildlife conservation. *BioScience* 40: 167-171.
- Coulondre G., Miller J.H., Farabaugh P.J. y Gilbert W. 1978. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274: 775-780.
- Darling J.D. y Cerchio S. 1993. Movement of a humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) between Japan and Hawaii. *Marine Mammal Science* 9: 84-89.
- Darling J.D., Gibson K.M. y Silber G.K. 1983. Observations on the abundance and behavior of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) off west Maui. pp 201-222. En: Payne R. ed. *Communication and behavior of whales*. AAAS selected symposium 76. Westview Press. Boulder, CO.
- Darling J.D. y Jurasz C.M. 1983. Migratory destinations of North Pacific humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). pp 359-368. En: Payne R. ed. *Communication and behavior of whales*. AAAS selected symposium 76. Westview Press. Boulder, CO.
- Darling J.D. y McSweeney D.J. 1985. Observations on the migrations of North Pacific humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Canadian Journal of Zoology* 63: 308-314.
- Darling J.D. y Morowitz H. 1986. Census of 'Hawaiian' humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) by individual identification. *Canadian Journal of Zoology* 64: 105-111.

- Dawbin W.H. 1966. The seasonal migratory cycle of humpback whales. pp 145-170. En: Norris K.S. ed. Whales, dolphins and porpoises. University of California Press. Berkeley, CA.
- Dickerson R.E. 1983. Base sequence and helix structure variation in B and A DNA. Journal of Molecular Biology 166: 419-441.
- Eigen M. 1986. The physics of molecular evolution. Chemica scripta 26B: 13-26.
- Enright J.T. 1965. The search for rhythmicity in biological time-series. Journal of Theoretical Biology 8: 426-468.
- Fairbridge R.W. 1960. The changing level of the sea. Scientific American 202(5): 70-79.
- Gallo J.P., Ortega A. y López W. 1986. Humpback whales from México. Marine Mammal Science 2: 78-79.
- Gaskin D.E. 1982. The ecology of whales and dolphins. Heineman. London.
- Gaskin D.E. 1991. Studying the ecology of cetacea in the 1990s; trying to break new ground and old habits. XVI Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. Bahía de Banderas, Nay.
- Gendron D. y Urbán J.R. 1993. Evidence of feeding by humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the Baja California breeding ground, México. Marine Mammal Science 9: 76-81.
- Glockner D.A. 1983. Determining the sex of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in their natural environment. pp 447-464. En: Payne R. ed. Communication and behavior of whales. AAAS selected symposium 76. Westview Press. Boulder, CO.
- Glockner-Ferrari D.A. y Ferrari M.J. 1990. Reproduction in the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) in Hawaii waters, 1975-1988: The life history, reproductive rates and behavior of known individuals identified through surface and underwater photography. Reports of the International Whaling Commission (special issue 12): 161-169.
- Harwood J. y Hall A. 1990. Mass mortality in marine mammals: Its implications for population dynamics and genetics. TREE 5: 254-257.

- Heintz N.H., Dailey L., Held P. y Heintz N. 1992. Eukaryotic replication origins as promoters of bidirectional DNA synthesis. *Trends in Genetics* 8: 376-381.
- Herman L.M. 1979. Humpback whales in Hawaiian waters: A study in historical ecology. *Pacific Science* 33: 1-15.
- Hoelzel A.R. y Dover G.A. 1988. Molecular techniques for examining genetic variation and stock identity in cetacean species. Report for the International Whaling Commission (SC/39/07).
- Hoelzel A.R., Hancock J.M. y Dover G.A. 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology and Evolution* 8: 475-493.
- Hopfield J.J. 1974. Kinetic proofreading: A new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71: 4135-4139.
- Hultman T., Stahl S., Hornes E. y Uhlen M. 1989. Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. *Nucleic Acids Research* 17: 4937-4946.
- Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. y White T.J. eds. 1990. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press. San Diego, CA.
- Jakoby W.B. y Pastan I.H. eds. 1979. Cell culture. Methods in enzymology 58. Academic Press. London.
- Jarrell G.H. 1979. Karyotype of the bowhead whale (*Balaena mysticetus*). *Journal of Mammalogy* 60: 607-610.
- Jarrell G.H. 1984. Adaptive radiation of whales: Is constitutive heterochromatin an intrinsic isolating mechanism? *Evolutionary Theory* 7: 53-62.
- Johnson J.H. y Wolman A.A. 1984. Report on the humpback whale under the endangered species act of 1973. Northwest and Alaska Fisheries Center. NMFS, NOAA.
- Katona S.K. y Whitehead H.P. 1981. Identifying humpback whales using their natural markings. *Polar Record* 20: 439-444.
- Kauffman S.A. 1992. Applied molecular evolution. *Journal of Theoretical Biology* 157: 1-7.

- Koespel R.R. y Kahn S.A. 1986. Static and initiator protein-enhanced bending of DNA at a replication origin. *Science* 233: 1316-1318.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Pääbo S., Villablanca F.X. y Wilson A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 6196-6200.
- Ladrón de Guevara P., Urbán J., Salinas M.Z., Jacobsen J., Balcomb K.C., Jaramillo A.L., Claridge D. y Aguayo A.L. 1993. Relaciones entre las agregaciones invernales de rorcuales jorobados, *Megaptera novaeangliae*, en el Pacífico mexicano. XVIII Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. La Paz, BCS.
- Lambertsen R.H. 1987. A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. *Journal of Mammalogy* 68: 443-445.
- Lambertsen R.H., Baker C.S., Duffield D.D. y Chamberlin-Lea J. 1988. Cytological determination of sex among individually identified humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Canadian Journal of Zoology* 66: 1243-1248.
- Lambertsen R.H. y Duffield D.D. 1987. Biopsy studies of the humpback whale *Megaptera novaeangliae*. Report to the U.S. National Marine Fisheries Service and the Scientific Comitee of International Whaling Commission.
- Lande R. 1991. Applications of genetics to management and conservation of cetaceans. Reports of the International Whaling Commission (special issue 13): 301-311.
- Leatherwood S. y Reeves R.R. 1983. The Sierra Club handbook of whales and dolphins. Sierra Club books. San Francisco, CA.
- Levin B. 1990. *Genes IV*. Oxford University Press.
- Li W. 1992. Generating nontrivial long-range correlations and $1/f$ spectra by replication and mutation. *International Journal of Bifurcation and Chaos* 2: 137-154.
- Li W. y Kaneko K. 1992. Long-range correlation and partial $1/f^\alpha$ spectrum in a noncoding DNA sequence. *Europhysics Letters* 17: 655-660.
- Li W.H. y Graur D. 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA.

- Li W.H., Wu C.I. y Luo C.C. 1984. Nonrandomness of point mutations as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *Journal of Molecular Evolution* 21: 58-71.
- Ling J.K. 1974. The integument of marine mammals. pp 1-44. En: Harrison R.J. ed. *Functional anatomy of marine mammals*. Academic Press. New York, NY.
- Makino S. 1948. The chromosomes of Dall's porpoise, *Phocoenoides dallii* (TRUE), with remarks on the phylogenetic relation of the Cetacea. *Chromosoma* 3: 220-231.
- Martin A.P. y Palumbi S.R. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 4087-4091.
- Mathews E.A., Keller S. y Weiner D.B. 1988. A method to collect and process skin biopsies for cell culture from free-ranging gray whales (*Eschrichtius robustus*). *Marine Mammal Science* 4: 1-12.
- Medrano L. 1989. Consideraciones biofísicas sobre las mutaciones puntuales. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias UNAM.
- Medrano L., Cocho G., Miramontes P. y Rius J.L. 1994. The effect of DNA stability on mutation and sequence evolution. *Evolutionary Theory*. En prensa.
- Medrano L., Miramontes P. y Aguayo L. 1991. Aplicación de la teoría de test al estudio del cariotipo de los cetáceos. *Revista de investigaciones marinas. Cuba*. En prensa.
- Medway W. 1983. Evaluation of the safety and usefulness of techniques and equipment used to obtain biopsies from free-swimming cetaceans. Report for the National Technical Information Service (MMC-82/01).
- Melville H. 1851. *Moby Dick, or, The Whale*. Oxford University Press. 1991.
- Milinkovitch M.C., Ortí G. y Meyer A. 1993. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature* 361: 346-348.
- Mizroch S.A., Beard J. A. y Lynde M. 1990. Computer assisted photo-identification of humpback whales. *Reports of the International Whaling Commission (special issue 12)*: 63-70.

- Mobley J.R. y Herman L.M. 1985. Transience of social affiliations among humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on the Hawaiian wintering grounds. *Canadian Journal of Zoology* 63: 762-772.
- Montagna W. 1962. The structure and function of skin. Academic Press. New York, NY.
- National Marine Fisheries Service. 1991. Recovery plan for the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). Silver Spring, MD.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70: 3321-3323
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York, NY.
- Nei M. y Li W.-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 5269-5273.
- Nishiwaki M. 1966. Distribution and migration of the larger cetaceans in the North Pacific as shown by Japanese whale marking results. pp 171-191. En: Norris K.S. ed. Whales, dolphins and porpoises. University of California Press. Berkeley, CA.
- Nishiwaki M. y Tobayama T. 1982. Morphological study of the hybrid between *Tursiops* and *Pseudorca*. *Scientific Reports of the Whales Research Institute* 34: 109-112.
- Novacek M. 1993. Genes tell a new whale tale. *Nature* 361: 298-299.
- Ohno S. 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag. New York, NY.
- Olson C. 1947. Llámenme Ismael. Un estudio de Melville. Ediciones ERA. México. 1977.
- Pacheco P., Flamand C.L. y Ayala O.M. 1991. Pacífico tropical mexicano. Cabo Corrientes a la Frontera con Guatemala. pp 117-207. En: de la Lanza G. comp. Oceanografía de mares mexicanos. AGT Editor S.A. México.
- Palsbøll P.J., Vader A. y Bakke I. 1992. Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Zoology* 70: 2166-2171.

- Palumbi S.R., Martin A.P. y McMillan W.O. 1991a. Detecting population structure using mitochondrial DNA. Reports of the International Whaling Commission (special issue 13): 271-278.
- Palumbi S.R., Martin A.P., Romano S., McMillan W.O., Stice L. y Grabowski G. 1991b. The simple fool's guide to PCR. University of Hawaii.
- Pepe G., Gadaleta G., Palazzo G. y Saccone C. 1989. Sequence-dependent curvature: conformational signal present in the main regulatory region of the rat mitochondrial genome. Nucleic Acids Research 17: 8803-8819.
- Perry A., Baker C.S. y Herman L.M. 1990. Population characteristics of individually identified humpback whales in the central and eastern North Pacific: A summary and critique. Reports of the International Whaling Commission (special issue 12): 307-317.
- Perry A., Mobley J.R., Baker C.S. y Herman L.M. 1988. Humpback whales of the central and eastern North Pacific: A catalog of individual identification photographs. Sea Grant miscellaneous report. UNIHI-SEAGRANT-MR-88-02. Honolulu, HI.
- Reaney D.C. y Pressing J. 1984. Temperature as a determinative factor in the evolution of genetic systems. Journal of Molecular Evolution 21: 72-75.
- Rice D.W. 1974. Whales and whale research in the eastern North Pacific. pp 170-195. En: Schevill W.E. ed. The whale problem. Harvard University Press. Cambridge, MA.
- Rice D.W. 1978. The humpback whale in the North Pacific: Distribution, exploitation, and numbers. pp 29-44. En: Norris K.S. y Reeves R. eds. Report on a workshop on problems related to humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in Hawaii. US Marine Mammal Commission. Washington, DC.
- Rosenbaum H. En preparación. Geographic variation in ventral fluke pigmentation of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) populations worldwide.
- Sacher G.A. 1980. The constitutional basis for longevity in the cetacea: Do the whales and the terrestrial mammals obey the same laws? Reports of the International Whaling Commission (special issue 3): 209-213.

- Salas I.V. 1993. Intervalos de reproducción y tasas de nacimiento de las ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) identificadas en dos áreas de reproducción en el Pacífico mexicano, 1986-1991. Tesis profesional. Facultad de Ciencias UNAM.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor. New York, NY.
- Sanger F. 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214: 1205-1210.
- Sanger F., Niklen S. y Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 5463-5467.
- Scammon C.M. 1874. The marine mammals of the North-western coast of North America. Dover Publications Inc. 1968. New York, NY.
- Schlöterer C., Amos B. y Tautz D. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature* 354: 63-65.
- Schuster P. 1986. The physical basis of molecular evolution. *Chemica scripta* 26B: 27-41.
- Steiger G.H., Calambokidis J., Sears R., Balcomb K.C. y Cabbage J.C. 1991. Movement of humpback whales between California and Costa Rica. *Marine Mammal Science* 7: 306-310.
- Stock A.D. 1981. Chromosomal variation and constitutive heterochromatin in three porpoise species (genus *Stenella*). *Cytogenetics and Cell Genetics* 31: 91-100.
- Tyack P. 1981. Interactions between singing hawaiian humpback whales and conspecifics nearby. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 8: 105-116.
- Tyack P. y Whitehead H. 1982. Male competition in large groups of wintering humpback whales. *Behaviour* 83:1-23.
- Urbán J. y Aguayo A. 1987. Spatial and seasonal distribution of the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*, in the Mexican Pacific. *Marine Mammal Science* 3: 333-344.
- Urbán J.R., Aguayo A.L., Salinas M.Z., Campos R.R., Balcomb K.C., Jacobsen J.K., Ladrón de Guevara P.P. y Alvarez C.F. 1989. Abundance and interaction of the humpback whales in their Mexican breeding grounds. 8th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Pacific Grove, CA.

- Walen K.H. y Madin S.H. 1965. Comparative chromosome analysis of the bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*) and the pilot whale (*Globicephala scammonii*). *American Naturalist* 99: 349-354.
- Waples R.S. 1991. Genetic methods for estimating the effective size of cetacean populations. *Reports of the International Whaling Commission (special issue 13)*: 279-300.
- Watson L. 1981. *Whales of the world*. Hutchinson LTD. London.
- Weihaupt J.G. 1984. *Exploración de los océanos. Introducción a la oceanografía*. CECSA. México.
- Weinrich M.T., Lambertsen R.H., Baker C.S., Schilling M.R. y Belt C.R. 1991. Behavioural responses of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the Southern Gulf of Maine to biopsy sampling. *Reports of the International Whaling Commission (special issue 13)*: 91-97.
- Weir B.S. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA.
- Wilson A.C., Bush G.L., Case S.M. y King M.-C. 1975. Social structuring of mammalian populations and rate of chromosomal evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 72: 5061-5065.
- Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M., Gyllenstein U.B., Helm-Bychowski K.M., Higuchi R.G., Palumbi S.R., Prager E.M., Sage R.D. y Stoneking M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 375-400.
- Wilson A.C., Sarich V.M. y Maxson L.R. 1974. The importance of gene rearrangement in evolution: Evidence from studies on rates of chromosomal, protein and anatomical evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71: 3028-3030.
- Wilson A.C., Steven S.C. y White T.J. 1977. Biochemical evolution. *Annual Review of Biochemistry* 46: 573-639.
- Winn H.E., Bischoff W.L. y Taruski A.G. 1973. Cytological sexing of Cetacea. *Marine Biology* 23: 343-346.
- Wolman A.A. 1978. Humpback whale. pp 47-53. En: Halley D. ed. *Marine Mammals*. Pacific Search Press. Seattle, WA.