



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Escuela Nacional de Estudios Superiores,  
Unidad Morelia

CARACTERIZACIÓN DE LA  
VARIABILIDAD GENÉTICA Y RELACIONES  
DE PARENTESCO ENTRE UN GRUPO DE  
RORCUALES COMUNES (*Balaenoptera  
physalus*) EN LA BAHÍA DE LA PAZ

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A

CONSTANZA TORRES VALDEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa  
Dr. Jorge Urbán Ramírez

MORELIA, MICHOACÁN

OCTUBRE, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA  
SECRETARÍA GENERAL  
SERVICIOS ESCOLARES

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCES  
DIRECTORA DE GESTIÓN ESTRATÉGICA Y PRIMER INGRESO  
ENCARGADA DEL DESPACHO DE LA DIRECCIÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la **sesión ordinaria 05** del H. **Consejo Técnico** de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia celebrada el día **04 de mayo del 2016**, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el Examen Profesional de la alumna **Constanza Torres Valdez**, con número de cuenta **412023301**, de la **Licenciatura en Ciencias Ambientales**, con la tesis titulada: "**Caracterización de la variabilidad genética y relaciones de parentesco entre un grupo de rorcuales comunes (*Balaenoptera physalus*) en la Bahía de La Paz**", bajo la dirección del Tutor.- **Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa** y como Co-Tutor.- **Dr. Jorge Urbán Ramírez**.

Presidente: Dr. Antonio González Rodríguez  
Vocal: Dr. Omar Chassin Noria  
Secretario: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa  
Suplente: Dra. Lorena Viloría Gómora  
Suplente: Dr. Jorge Urbán Ramírez

Sin otro particular quedo de usted.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Morelia, Michoacán, a 18 de mayo de 2016.

**DR. FERNANDO ANTONIO ROSETE VERGÉS**  
**SECRETARÍA GENERAL**

***Balaenoptera physalus* en el Golfo de California, México.**



Fotografía de Sergio Martínez Aguilar

## **AGRADECIMIENTOS I**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México en conjunto con el Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, por brindarme las herramientas necesarias durante todo el proceso de aprendizaje dentro de la Licenciatura en Ciencias Ambientales.

Al Programa de Vinculación con los egresados de la UNAM por el apoyo económico otorgado a través de una Beca para Titulación de Egresados de Alto Rendimiento.

También quiero agradecer a mis asesores, Ken Oyama y Jorge Urbán, por permitir la colaboración entre el Laboratorio de Mamíferos Marinos de la UABCS y el laboratorio de Ecología Genética Molecular de la UNAM, que finalmente derivó en este trabajo de titulación.

A mis sinodales, Antonio González, Lorena Vilorio y Omar Chassin, por su tiempo, atención, comentarios y observaciones, que fueron claves para definir los últimos detalles de mi tesis.

Agradezco a mis maestros de la Licenciatura; Toño, Susana, Ernesto, Diego, Ken, Chassin, Casas, David, Frapolli, Carla, Ek, por introducirnos hacia el camino de las Ciencias Ambientales y ofrecernos tantas posibilidades de acción en dicho campo. Por darnos una visión más amplia para tomar mejores decisiones y por darnos siempre la esperanza de que podemos hacer un cambio significativo.

## AGRADECIMIENTOS II

Un especial agradecimiento a Antonio González (Tonito) y Víctor Rocha (Víc) por su apoyo y asesoría a lo largo de todo el proceso de la tesis. Gracias por su paciencia, optimismo y disposición. A la señora Lolita por su atención durante el trabajo en el laboratorio. A Nando y a Ricardo, por su amistad, apoyo y asesoramiento.

A mis compañeros y amigos de La Paz, especialmente a Sergio, Lore, Pablo, Hirám y Carlos, por introducirme al mundo de los mamíferos marinos y el amor a la ciencia, por darme la oportunidad de ayudarles y por impulsarme a cumplir mis objetivos. ¡Los quiero mucho!

A mi mamá y mi papá, por permitirme siempre hacer lo que más me gusta, por darme la libertad de elegir y además, apoyar mis decisiones, aunque a veces no estuvieran totalmente de acuerdo con eso. ¡Gracias por creer en mí! A Jero, por ser el mejor hermano y amigo, el más divertido, inteligente y lleno de datos curiosos.

A mis amigos y amigas, especialmente a las “ChF” Fer, Mariana y Pau, por tantos años de amistad y complicidad en todo momento. A Eduardo, por siempre impulsarme a crecer y por compartir una meta conmigo. También a mis compañeros de la Licenciatura en Ciencias Ambientales, especialmente a Merkel, Clau, Ju, Re, Gonzi, Dony, Mac, Piña, Emiliem, Octavio, Adrián (¡gracias por los mapas!), Luis, Clarita, Marci, por hacer de la carrera una etapa divertida y al mismo tiempo enriquecedora.

## RESUMEN

La población de rorcual común (*Balaenoptera physalus*) del Golfo de California (GC) es genéticamente aislada de las otras poblaciones y residente todo el año. Se ha descrito que tiene poca variación genética, ya que únicamente se tienen registrados tres haplotipos mitocondriales para toda la población, por lo cual se le considera en un estado de vulnerabilidad y propensa a la endogamia. Asimismo, se ha observado que los rorcuales comunes del GC se comportan de manera distinta a los del resto del mundo debido a su aislamiento. Dentro del GC, la Bahía de La Paz se considera un sitio de alta productividad primaria, por lo que es común encontrar una mayor concentración de mamíferos marinos, entre ellos, el rorcual común. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la diversidad genética y las relaciones de parentesco de un grupo de rorcuales comunes dentro de la Bahía de La Paz. Para esto se utilizaron 9 microsatélites nucleares, la secuencia de la región control del ADN mitocondrial y se determinó el sexo de 27 individuos colectados durante el verano del 2013. Los resultados indican que se trata de un grupo relativamente diverso genéticamente, al encontrarse un total de cinco haplotipos, cuando únicamente se habían reportado tres. Los cinco haplotipos contemplan los tres haplotipos reportados previamente y los dos restantes no se habían encontrado dentro del GC, pero son haplotipos frecuentes dentro de la población del Pacífico Norte. Los análisis de parentesco sugieren que se trata de varios grupos familiares, pues se encontraron 75 relaciones entre 27 individuos, donde únicamente dos individuos no tuvieron ninguna relación de parentesco. Este nivel de parentesco no había sido reportado para otras poblaciones y sugiere que los rorcuales comunes dentro del Golfo de California pueden tener un sistema de apareamiento más complejo de lo que se ha descrito para misticetos.

## **ABSTRACT**

The fin whale (*Balaenoptera physalus*) population of the Gulf of California (GC) is genetically isolated from the other populations and a year round resident. It's been described with low genetic diversity, with only three mitochondrial haplotypes for the whole population, thus it is considered vulnerable and prone to inbreeding. At the same time, due to its isolation characteristics, it's been observed that fin whales in the GC have a different behavior than the rest of the world. Within the GC, La Paz Bay is considered a high primary productivity site, so it is usual to find a major concentration of marine mammals, including fin whales. With the goal of determining the genetic variability and relatedness of a group of fin whales in La Paz Bay, we used 9 nuclear microsatellites, we sequenced the mitochondrial control region and determined the sex of 27 samples collected during the summer of 2013. The results show a genetically diverse group, we found a total of five haplotypes. Three of them are the ones that were previously reported and the other two have not been reported in the GC but they appear to be frequent haplotypes in the North Pacific population, that is to say, they were newly found but are not exclusive of the GC. The relatedness results suggest a family group, we found 75 relationships among 27 individuals, were only two individuals were not related in any way. This level of relatedness has not been reported for other populations and suggests that fin whales in the GC could have a more complex mating system than the one that has been described for mysticetes.



# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
Balaenoptera physalus: Biología de la especie .....	3
Reproducción .....	5
Sociabilidad .....	5
Alimentación .....	6
Distribución dentro del Golfo de California .....	6
Estado de conservación.....	8
Los microsatélites y las secuencias como medidas de variabilidad genética .....	9
ANTECEDENTES .....	11
JUSTIFICACIÓN .....	13
PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO .....	14
Preguntas de Investigación .....	14
Hipótesis.....	14
OBJETIVOS .....	15
Objetivo General .....	15
Objetivos específicos.....	15
METODOLOGÍA.....	16
Área de estudio .....	16
Colecta de muestras.....	17
Análisis en el laboratorio.....	19
Extracción de ADN.....	19
Determinación de sexo .....	20
Secuencias de la región control del ADN mitocondrial.....	21
Microsatélites.....	23
Análisis de datos.....	24
Secuencias de región control del ADN mitocondrial.....	24
Microsatélites.....	26
Foto-identificación .....	27
RESULTADOS .....	29
Determinación del sexo .....	29
Análisis de secuencias .....	29

Haplotipos Bahía de La Paz .....	29
Medidas de diversidad genética .....	31
Microsatélites.....	32
Foto-identificación .....	38
DISCUSIÓN.....	39
Sexo .....	39
Variación en el ADN mitocondrial .....	40
Diversidad genética .....	41
Heterocigosidad y endogamia.....	44
Estructura genética dentro del grupo .....	45
Parentesco.....	46
CONCLUSIONES .....	50
REFERENCIAS.....	52
ANEXO .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Resumen de los microsatélites utilizados en este trabajo

**Tabla 2.** Haplotipos encontrados para el grupo de la Bahía de La Paz. La frecuencia se refiere al número de individuos de la muestra que tienen dicho haplotipo. La posición es el lugar de la secuencia donde se encuentra la sustitución, tomando como referencia la secuencia de Bp49 de 411 pares de bases.

**Tabla 3.** Diversidad genética total y de cada región.

**Tabla 4.** Principales estadísticos descriptivos de variación genética para cada locus. Número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efectivos ( $N_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), índice de fijación ( $F$ ), probabilidad de identidad ( $PI$ ). La prueba de Chi cuadrada se realizó para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg, los valores en negritas en la columna de Probabilidad ( $p$ ) son los que resultaron significativos.

**Tabla 5.** Individuos que tuvieron recapturas fotográficas durante los tres meses de muestreo.

**Tabla 6.** Comparación de la diversidad genética obtenida en presente estudio con distintos estudios de la misma población, así como con distintas poblaciones y especies. Todos los trabajos utilizaron como marcador la región control del ADN mitocondrial.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** *Balaenoptera physalus* (Imagen tomada de Guerrero *et al.*, 2006)

**Figura 2.** Mapa de la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México.

**Figura 3.** Mapa de la Bahía de La Paz, donde cada punto indica los sitios de muestreo durante las seis salidas realizadas entre mayo y julio del 2013.

**Figura 4.** Red de haplotipos para la Bahía de La Paz, donde cada círculo es un haplotipo y su tamaño es proporcional a la frecuencia. Los círculos negros indican el número de pasos mutacionales entre haplotipos. Por ejemplo, el H4 tiene 3 sustituciones con respecto al H1. Cuando no hay círculos negros es que existe sólo una sustitución.

**Figura 5.** Red de los 39 haplotipos encontrados entre la población del Golfo de California (color rojo) y el Pacífico Norte (color azul). Cada círculo representa un haplotipo y el tamaño de los mismos es proporcional a su frecuencia.

**Figura 6.** Análisis de coordenadas principales, donde cada número representa un individuo y el color del punto corresponde al sexo del mismo.

**Figura 7.** Delta K obtenida con Harvester a partir de los cinco grupos probados ( $K=5$ ).

**Figura 8.** Estructura genética de los 27 individuos de la Bahía de La Paz. Cada barra representa un individuo y los colores indican la proporción asignada de cada grupo a cada individuo. La letra H indica que el individuo es hembra, el resto son machos.

**Figura 9.** Frecuencia absoluta de las relaciones de parentesco de un total de 351 relaciones posibles entre 27 individuos.

**Figura 10.** Red de relaciones de parentesco entre 27 individuos del Golfo de California. Cada círculo representa un individuo y el tamaño del mismo es proporcional al número de relaciones que éste tiene.

**Figura 11.** Fotografía de la amplificación del gen SRY para 36 muestras iniciales. Cada carril representa un individuo. La muestra número 36 (último carril) fue un individuo que se eliminó de los análisis cuando se identificó genéticamente que la biopsia pertenecía a una ballena azul (*Balaenoptera musculus*).

**Figura 12.** Fotografía de la replicación de la amplificación de los genes SRY y ZFY/ZFX para las 30 muestras. Cada carril representa un individuo.

**Figura 13.** Secuencia del haplotipo Bp49 (H1) de 411 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial. En negritas se indica el fragmento de 288 pares de bases que se ha usado como referencia en trabajos anteriores.

## INTRODUCCIÓN

Los estudios genéticos para el rorcual común (*Balaenoptera physalus*) a nivel mundial han contribuido a detectar la diferenciación de las seis poblaciones actualmente registradas (Bérubé *et al.*, 1998; Reilly *et al.*, 2008; Goto *et al.*, s.f.). Para el caso del Golfo de California en México, hay evidencia de que los rorcuales comunes que ahí habitan son residentes todo el año y están aislados genéticamente, por lo que se le ha considerado como una población separada de la del Pacífico Norte (Bérubé *et al.*, 2002; Tershy *et al.*, 1993) y por lo tanto, merece ser estudiada como una unidad independiente.

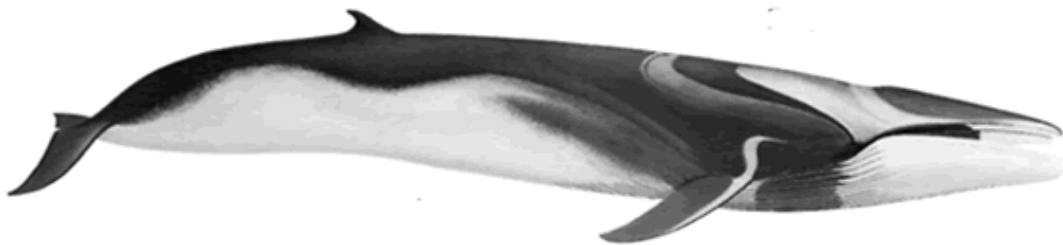
Los estudios con genética de *B. physalus* dentro del Golfo se han centrado principalmente en la distinción de dicha población como un grupo genéticamente aislado y han comprobado la baja variabilidad genética que posee con respecto a las demás poblaciones (Bérubé *et al.*, 2002; Rivera, en revisión). Dichas condiciones han colocado a la población en un estado de vulnerabilidad a los efectos de las actividades antrópicas, las nuevas enfermedades y el cambio de hábitat (Rivera, en revisión). Con esta información, se reitera la necesidad de profundizar en el conocimiento de la caracterización genética abordando otros aspectos que aún no se han estudiado con el objetivo de diseñar proyectos y tomar las medidas adecuadas y específicas de conservación para la población en cuestión.

### ***Balaenoptera physalus: Biología de la especie***

El rorcual común (*Balaenoptera physalus*), también llamado ballena de aleta, pertenece al grupo de ballenas barbadas (suborden Mysticeti), y a la familia Balaenopteridae. Esta ballena tiene una distribución cosmopolita, es decir, se puede encontrar en cualquier océano del mundo, aunque son raros los avistamientos en los trópicos, y por lo general tiene una preferencia por las zonas pelágicas (Reilly *et al.*, 2013). Dentro de la especie se distinguen tres subespecies: *B. p. physalus*, en el Hemisferio Norte, *B. p. quoyi* en el Hemisferio Sur y *B. p.*

*patachonica*, también conocido como rorcual común pigmeo (SMM, 2014). Hasta la fecha se han descrito seis poblaciones: Atlántico Norte, Pacífico Norte, Mar Mediterráneo, Mar Este de China, Hemisferio Sur y Golfo de California (Reilly *et al.*, 2013).

El rorcual común, es el segundo animal más grande que existe en el mundo, únicamente superado por la ballena azul. Mide entre 19 y 20 metros de largo, su peso aproximado es de 70 toneladas (Urbán *et al.*, 2005). Son consideradas de las ballenas más rápidas, pues su cuerpo es delgado y largo, lo cual les ayuda a alcanzar velocidades de hasta 28 km/h (Kermark, 1947). La parte superior de su cuerpo es color negro o gris oscuro y en la parte inferior es blanco. La principal característica fenotípica distintiva de esta especie es que posee una coloración asimétrica en la cabeza, es decir, presenta el color blanco únicamente del lado derecho de la mandíbula y las barbas, el izquierdo es gris oscuro al igual que el resto de su cuerpo (Jefferson, 1993; Guerrero *et al.*, 2006). Aún no se sabe si esta asimetría tiene alguna función para la especie, pero hay hipótesis que sugieren que la coloración sirve como estrategia al momento de alimentarse para alarmar a las presas y congregirlas (Teshy, 1992). Los rorcuales comunes no presentan un dimorfismo sexual, por lo que las técnicas para determinar el sexo de los individuos se basan en análisis moleculares (Urbán, 1997; Croll *et al.*, 2002; Enríquez, 1996).



**Figura 1.** *Balaenoptera physalus* (Imagen tomada de Guerrero *et al.*, 2006)

## **Reproducción**

De acuerdo con una recopilación de varios estudios realizada por Reilly *et al.* (2013), se estima que la edad de madurez sexual de las ballenas de aleta es de aproximadamente 8 años, aunque dichos trabajos en conjunto reportan un intervalo de 6 a 12 años. El tiempo generacional se estima que es de 25.9 años (Taylor *et al.*, 2007).

Estudios realizados en el Atlántico Norte, Pacífico Norte y Hemisferio Sur sugieren que la proporción sexual es de 1:1 (Reilly *et al.*, 2013), aunque dentro del Golfo de California, un estudio realizado por Enríquez (1996) indica que la proporción sexual está sesgada hacia un mayor número de machos (1.72 M:H). La temporada reproductiva es durante el invierno y principios de la primavera, entre los meses de noviembre a marzo. El periodo de gestación dura 11 meses y a partir del nacimiento de las crías, éstas permanecen al cuidado de la madre durante un lapso de 6 meses aproximadamente, luego se separan (Leatherwood *et al.*, 1982).

## **Sociabilidad**

Se ha descrito ampliamente que los misticetos o ballenas barbadas carecen de una organización social definida, siendo el vínculo más fuerte y prolongado el de la madre con la cría; después del destete no es común que se les vuelva a observar juntas (Mann *et al.*, 2000). Específicamente, para el caso de los rorcuales comunes se ha documentado que generalmente se ven solos o en pares, pero también se ha visto que hacen agrupaciones temporales para alimentarse y éstas llegan a ser de hasta 50 individuos reunidos en un área pequeña (Leatherwood *et al.*, 1982).

Para el Golfo de California se han descrito grupos de hasta 21 animales en la misma zona (principalmente en la zona norte del Golfo) que hacen subgrupos de aproximadamente 5 individuos, siendo el comportamiento más común “navegando” y luego “alimentándose” (Enríquez, 1996). Tershy *et al.* (1992) reporta que a diferencia de otros rorcuales, el rorcual común dentro del Golfo de California se alimenta y viaja en grupos grandes. Similar al rorcual jorobado

(*Megaptera novaeangliae*), se ha reportado que los rorcuales comunes tienen un comportamiento de alimentación cooperativa (Ladrón de Guevara *et al.*, 2008).

En Loreto, Baja California Sur, se estudiaron las vocalizaciones de los rorcuales comunes presentes en la zona. Se encontró que los individuos que vocalizaban eran únicamente los machos, lo cual sustenta la idea de que los patrones de sonido tienen un propósito reproductivo como una llamada a las hembras que se encuentran a largas distancias (Croll *et al.*, 2002).

### **Alimentación**

El rorcual común a nivel mundial es considerado una especie generalista por la gran cantidad de presas que consume (Nemoto, 1957; Leatherwood *et al.*, 1982), pero también se le ha catalogado como una especie oportunista (Gaskin, 1982), es decir, que aprovecha la presa que esté disponible en el momento.

Dentro del Golfo de California, se han reportado avistamientos de rorcual común alimentándose en su mayoría del eufáusido *Nyctiphanes simplex*, reconociendo esta presa como de su preferencia sobre otras (Ladrón de Guevara, 2007; Tershy, *et al.*, 1993 y Urbán, 1997). Estudios recientes con isótopos estables indican que a medida que aumenta la temperatura durante el año, baja la disponibilidad de esta presa. Por tanto, en la temporada cálida se ha visto que cambian su dieta a presas de un nivel trófico más alto, como las sardinas (Jaume, 2004). De igual manera, se ha descrito que *Balaenoptera physalus* se alimenta en zonas costeras durante la temporada invernal y que prefiere las zonas oceánicas en el verano (Nemoto, 1959). Este mismo hábito alimenticio lo encontró Jaume (2004) para las *B. physalus* dentro del Golfo de California.

### ***Distribución dentro del Golfo de California***

Los rorcuales comunes del Golfo de California se consideran una población pequeña, aislada de la población del Pacífico Norte y residente en todo el año (Bérubé *et al.*, 2002) Se estima que su tamaño poblacional es de 400-800



individuos, pero la estimación más reciente realizada por Díaz (2006) es de aproximadamente 600 individuos.

Esta población tiene una distribución por todo el Golfo de California, pero tienen áreas y temporadas de preferencia. De acuerdo con una recopilación de 5 estudios, Tershy *et al.* (1993) confirman que más del 70% de los avistamientos son en la temporada invierno-primavera, y también resalta una mayor concentración de animales en la zona norte del Golfo, no obstante, también hay reportes de avistamientos en la zona sur y durante el verano, pero éstos son menos frecuentes. La conglomeración de ballenas en la zona norte se atribuye a que al final de verano, cuando la temperatura del Golfo es más alta, baja la productividad biológica, por lo que las ballenas se ven obligadas a cambiar de zona en busca de alimento (Enríquez, 1996).

El Canal de Ballenas, ubicado entre la isla Ángel de la Guarda y la costa de Baja California, es bien conocido como una zona de alta productividad primaria debido a que mantiene una temperatura baja (hasta 4°C menos que el resto del Golfo). Es por eso que los rorcuales comunes pueden observarse con mayor frecuencia en dicha zona (Tershy *et al.*, 1993). De hecho, el Canal de Ballenas ha sido extensamente estudiado y es considerado como un hábitat único de forrajeo temporal para las ballenas de aleta en el Golfo de California (Ladrón de Guevara *et al.*, 2008).

Puesto que no existe una relación directa entre los movimientos migratorios y el comportamiento reproductivo, no se puede suponer que los movimientos dentro del Golfo sean migraciones con fines reproductivos, sino para la búsqueda de alimento (Tershy *et al.*, 1992; Urbán *et al.*, 2005). Potencialmente, los rorcuales comunes pueden recorrer los 1,000 km de largo del Golfo en un periodo de entre 3 a 10 días (Tershy *et al.*, 1993).

## ***Estado de conservación***

Actualmente, a nivel mundial, el rorcual común se encuentra en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN bajo la categoría de Peligro de Extinción (*Endangered*). Esta situación se debe principalmente a la caza comercial de ballenas, que durante el siglo XX fue tan intensa que en las últimas tres generaciones (1929-2007) se perdió más del 70% de la población global (Reilly, 2013).

La intervención del ser humano principalmente con la construcción de marinas y pesquerías representa una amenaza para la biodiversidad en el Golfo de California, ya que está alterando el hábitat de muchas especies mediante diversos factores como la descarga de contaminantes y la contaminación acústica (Guerrero *et al.*, 2006). La principal causa de mortandad de cetáceos en el Golfo de California es la captura incidental en las redes de pesca (Urbán *et al.*, 2005). Así mismo, la colisión de cetáceos con embarcaciones también representa un índice de mortandad importante, y precisamente, de acuerdo con Laist *et al.* (2001) la especie que sufre de estas colisiones con mayor frecuencia es *Balaenoptera physalus*.

En México existen distintos instrumentos legales disponibles para tomar acciones en la conservación de esta especie. Dentro de la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), se estipulan los lineamientos principales para que la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) pueda diseñar políticas públicas que se adecúen a las necesidades de conservación de cada especie en particular. También existe la Ley General de Vida Silvestre (LGVS), que bajo la responsabilidad de SEMARNAT y sus subsecretarías, busca un balance entre la protección de la biodiversidad del país y las necesidades socioeconómicas. Para el caso de mamíferos marinos, en 2002 se estableció que ninguna especie de mamífero marino puede usarse con objeto de subsistencia o comercio, únicamente para fines de investigación científica (Urbán *et al.*, 2005).

La Norma Oficial Mexicana 059 (NOM-059-SEMARNAT-2010) clasifica especies del territorio nacional en cuatro categorías de riesgo de acuerdo al nivel de amenaza en el que se encuentran. El rorcual común está clasificado como Sujeta a Protección Especial (SEMARNAT, 2010). Partiendo de esta lista se creó el Programa de Conservación de Especies en Riesgo (PROCER), el cual tiene como meta contribuir a la recuperación de especies hasta lograr bajarlas de categoría en la NOM-059 o incluso sacarlas de la lista. Actualmente el rorcual común se encuentra dentro de la lista de especies prioritarias que serán atendidas por el PROCER (CONANP, 2010).

### ***Los microsatélites y las secuencias como medidas de variabilidad genética***

La variabilidad genética dentro de una población es importante porque determina en gran medida su capacidad de supervivencia. Existe un amplio número de marcadores moleculares que sirven para evaluar la variabilidad genética de una población, para inferir patrones demográficos, e incluso procesos evolutivos (Avice, 1994). En biología de la conservación los estudios basados en marcadores moleculares se han vuelto de gran utilidad, pues proporcionan información referente a la “salud” genética de la población, que posteriormente se utiliza para tomar decisiones más sólidas en cuanto a las acciones de conservación de las especies. A continuación se describe brevemente el uso de los microsatélites y las secuencias de ADN como marcadores moleculares, por ser los utilizados en este trabajo.

Los microsatélites son marcadores moleculares usados ampliamente en el campo de la genética de poblaciones debido a su elevado polimorfismo, su alto nivel de resolución y su ubicuidad en el genoma (Ellegren, 2004; Godoy, 2009). Los microsatélites son fragmentos de ADN que se repiten en tándem, y por lo general se encuentran en las regiones no codificantes del genoma. Por ejemplo, una secuencia de CACACACACACACA representaría el microsatélite (CA)<sub>8</sub>. Más

que el arreglo en la secuencia de las bases nitrogenadas, la variabilidad de los microsatélites se cuantifica por el número de repeticiones en tándem dentro del fragmento. En general se utilizan con mayor frecuencia los motivos de mono, di, tri y tetra-nucleótidos que se repiten consecutivamente (Ellegren, 2004).

El potencial del uso de los microsatélites es muy amplio y valioso por su precisión, por ejemplo, se puede hacer una identificación de cada individuo de una población a través su genotipo, lo cual proporciona información sobre patrones migratorios, uso de áreas, tiempos de residencia o simplemente como un inventario genético. De igual manera, estudios basados en frecuencias alélicas pueden determinar la consanguinidad entre individuos y evaluar riesgos de endogamia en una población (Godoy, 2009).

La variabilidad genética de una población también puede inferirse a partir de la secuenciación de un fragmento de ADN, ya sean genes o regiones no codificantes; la única condición es que dicho fragmento debe ser polimórfico para la población (Awise, 1994). Durante las últimas tres décadas, el ADN mitocondrial ha sido comúnmente usado para estudiar la historia demográfica y evolutiva de las poblaciones por varias razones, entre ellas, la ausencia de recombinación, el modo de herencia únicamente por vía materna, su elevado polimorfismo debido a su alta tasa de mutación y su facilidad en la amplificación. Específicamente la región control del ADN mitocondrial se utiliza para estos fines, ya que representa la única región no codificante de este genoma y tiene una tasa de mutación alta (Ballard y Whitlock, 2004).

## ANTECEDENTES

La primera sugerencia de que los rorcuales comunes dentro del Golfo de California pudieran ser una población residente fue propuesta por Gilmore en 1957, al observar que existían registros de avistamientos todo el año. Leatherwood *et al.*, (1988) describieron que dentro del Golfo de California *Balaenoptera physalus* es aparentemente una población aislada. La escasez de avistamientos del lado de la costa occidental de la península sugiere que hay poco o nulo intercambio entre la población del Golfo y la del Pacífico.

Tershy y colaboradores (1993) examinaron la evidencia existente que sustentaba la hipótesis de que los rorcuales comunes del Golfo eran una población residente todo el año. Analizaron variables como la velocidad en el nado de las ballenas, dieta, disponibilidad de presas, así como los patrones de movimiento y distribución temporal, tanto de la costa oriental como occidental de la península de Baja California. Sin embargo, la información disponible hasta ese momento era insuficiente para afirmar que los rorcuales comunes del Golfo de California constituían una población residente.

Bérubé y colaboradores (1998) utilizaron técnicas moleculares para describir las poblaciones de rorcuales comunes en distintos lugares del mundo. Dentro del Golfo de California, localizaron dos haplotipos poco comunes entre el resto, fuera de eso, el 90% de los individuos presentaron el mismo haplotipo. Además, afirman que la diversidad nucleotídica para las muestras colectadas en el Golfo de California es la más baja de todas las poblaciones analizadas (Atlántico Norte  $\pi=0.0113$ , Mar Mediterráneo  $\pi=0.0057$  y Golfo de California  $\pi=0.0007$ ).

Más adelante, Bérubé y colaboradores (2002) colectaron 64 muestras de rorcuales comunes (56 dentro del Golfo y 8 en la costa del Pacífico) y evaluaron el nivel de diferenciación poblacional entre las muestras del Pacífico Norte y las del Golfo de California. Con marcadores nucleares y mitocondriales obtuvieron un nivel de diferenciación inusualmente alto para poblaciones adyacentes ( $F_{st}=0.23$  con marcadores nucleares y  $F_{st}=0.42$  con marcadores mitocondriales), de hecho este

nivel de divergencia se observa típicamente entre poblaciones oceánicas. Por lo tanto, concluyeron que las ballenas observadas en el Golfo de California constituyen una población genéticamente aislada con un tamaño efectivo de población pequeño por los bajos niveles de variación genética en loci nucleares y mitocondriales. Estos resultados también sugieren que la población de rorcuales comunes del Golfo de California representa una unidad de conservación aislada, por lo que se deberían tomar medidas de manejo adecuadas a las circunstancias, ya que las características propias de la población la vuelven vulnerable.

Posteriormente a estos estudios, se realizó una investigación a cargo de Rivera (en revisión) con el fin de evaluar la vulnerabilidad de la población del Golfo de California. Se analizaron 287 muestras colectadas en un intervalo de 11 años (1993 a 2004) y se estimó la variación genética dentro de la población, así como diferencias con otras poblaciones fuera del Golfo, el tamaño efectivo de la población y la tasa de migración. Con dicho estudio se reafirma que la población de *Balaenoptera physalus* del Golfo de California presenta una variación genética, tanto haplotípica como nucleotídica, muy baja (0.133 y 0.00052, respectivamente). El tamaño efectivo de población es de 200 individuos, que es menor que el mínimo (500-1000 Lynch y Lande, 1998) para alcanzar un balance entre la mutación, la selección y la deriva génica. Igualmente, se detectaron únicamente cuatro inmigrantes en un intervalo de 11 años. Tomando en cuenta la accesibilidad, la corta distancia entre las dos poblaciones y el potencial migratorio de esta especie, es sorprendente la baja tasa de migración (Bérubé *et al.*, 2002; Urbán *et al.*, 2005). Con esta información, se puede concluir que las ballenas de aleta en el Golfo de California están susceptibles a los efectos de la deriva génica y la endogamia, los cuales dejarían a la población en un alto grado de vulnerabilidad.

## JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con una clasificación a nivel mundial realizada por Pompa *et al.* (2011), el Golfo de California se encuentra entre las nueve regiones prioritarias para la conservación de mamíferos marinos por su riqueza de especies. Igualmente, por ser un cuerpo de agua semi-cerrado, el Golfo de California está considerado como una de las áreas más prístinas en los océanos del mundo (Fossi *et al.*, 2016). No obstante, también alberga muchas especies que se encuentran en alguna situación de vulnerabilidad, como es el caso del rorcual común.

De acuerdo con el Programa de Conservación de Especies en Riesgo, el rorcual común fue seleccionada como una especie que requiere atención y esfuerzos de conservación, ya que no solamente es una especie en riesgo, sino que es considerada una especie “sombrilla”, es decir, que su conservación permite incidir en la conservación de otras especies y su hábitat.

El presente trabajo es una herramienta importante que va a contribuir, a través de la caracterización con datos genéticos, a profundizar el conocimiento acerca de la dinámica que tiene la población a nivel de estructura social y parentesco, así como en el enriquecimiento de la caracterización genética de los rorcuales dentro de La Bahía de La Paz.

## PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Se ha descrito que los rorcuales comunes que habitan dentro del Golfo de California tienen hábitos de alimentación exclusivos (Jaume, 2004), pero poco se sabe acerca de su reproducción y sociabilidad. También se ha observado que los patrones de movimientos entre zonas dentro del Golfo y las agregaciones que forman, se diferencian de los patrones migratorios en otras poblaciones del mundo (J. Urbán, comunicación personal, diciembre de 2015). En el campo de la genética se han descrito los haplotipos para toda la población, pero quedan otros temas aún desconocidos como es el comportamiento reproductivo, que puede explorarse a través de las relaciones de parentesco y la caracterización del sexo de los individuos muestreados. Dada la accesibilidad que tiene la Bahía de La Paz para el avistamiento de cetáceos, es posible localizar a los animales con mayor rapidez y observarlos durante un mayor tiempo, por lo cual se facilita su estudio.

### ***Preguntas de Investigación***

¿Cómo es la estructura genética de un grupo de rorcuales comunes dentro del Golfo de California? Genéticamente hablando ¿Qué relación guarda dicho grupo con la población del Pacífico Norte? ¿Existen relaciones de parentesco dentro de un grupo de rorcuales comunes? ¿Existe una organización social o familias?

### ***Hipótesis***

Puesto que la población del Golfo de California es pequeña, aislada y tiene baja variabilidad genética, se espera encontrar que dentro de un grupo rorcuales comunes en la Bahía de La Paz exista una baja variabilidad genética y alto número de relaciones de parentesco dentro de un grupo de individuos en una misma zona.



## OBJETIVOS

### ***Objetivo General***

Caracterizar la variabilidad genética y las relaciones de parentesco entre un grupo de rorcuales comunes de la Bahía de La Paz.

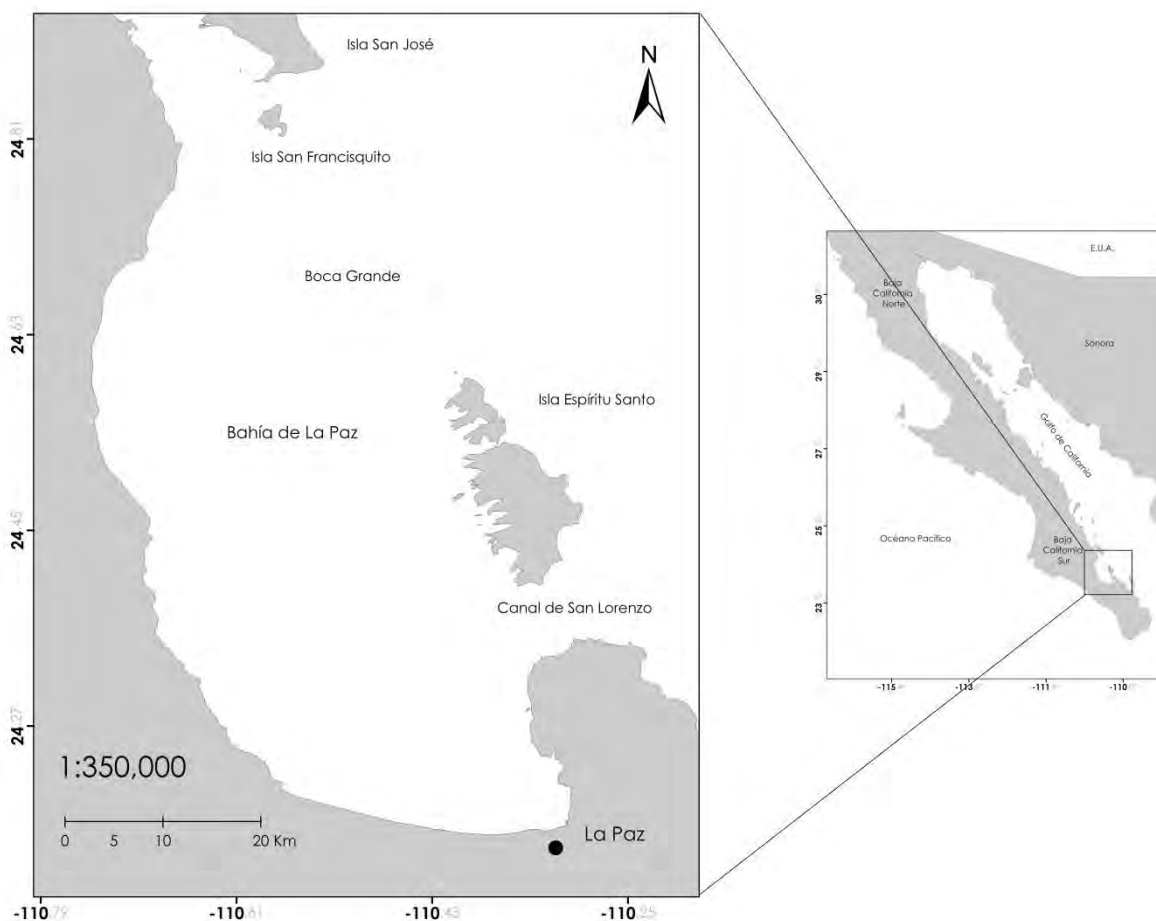
### ***Objetivos específicos***

- 1) Evaluar si existe estructura genética dentro del grupo y compararla con la población del Pacífico Norte.
- 2) Determinar el sexo de los individuos por técnicas moleculares
- 3) Analizar si existen relaciones de parentesco dentro de los individuos del grupo.

## METODOLOGÍA

### Área de estudio

La Bahía de La Paz, Baja California Sur, está localizada en la parte sur del Golfo de California entre las coordenadas  $24^{\circ} 15' - 24^{\circ} 33'$  Norte y  $110^{\circ} 15' - 110^{\circ} 47'$  Oeste. Limita al Este con el Archipiélago Espíritu Santo y al Norte con la Isla San Francisquito (ver figura 2). La Bahía tiene profundidades desde 40 hasta 400 metros, y presenta un incremento en su profundidad de sur a norte, con una pendiente de 1% (Murillo-Jiménez, 1987). Abarca un área de aproximadamente  $1780 \text{ km}^2$  y tiene un perímetro costero de 200 km (Velasco, 2009).

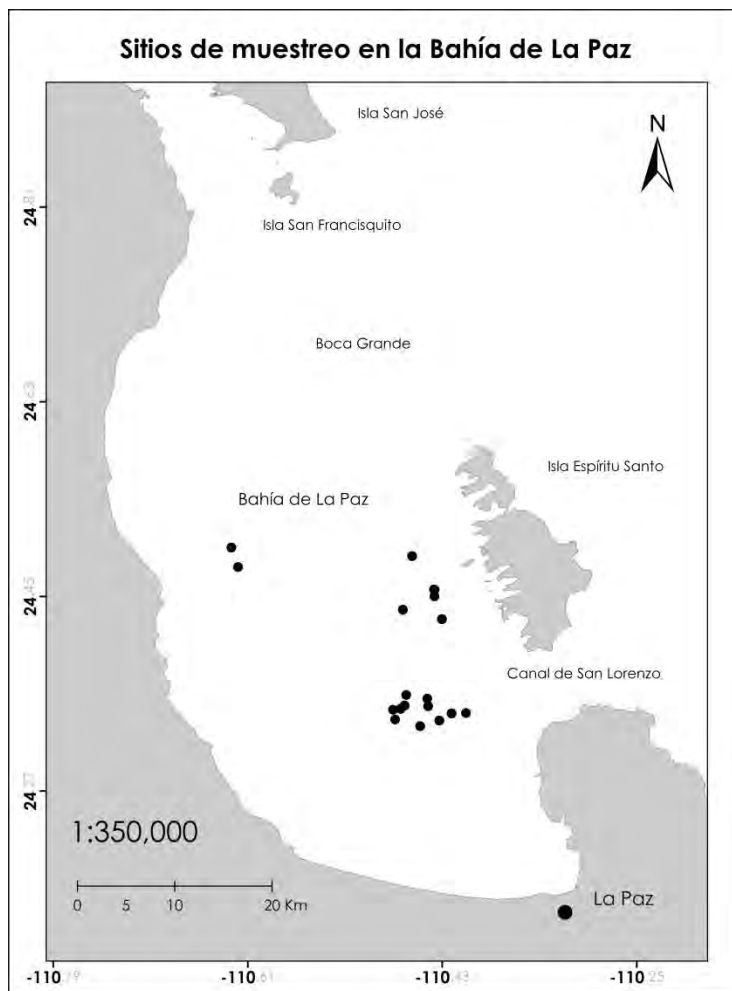


**Figura 2.** Mapa de la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México.

La Bahía de La Paz es considerado un lugar de gran interés científico y turístico debido a su agradable clima, fácil acceso y porque alberga una extensa diversidad biológica, incluyendo de mamíferos marinos. Tan sólo de cetáceos se tienen registrados avistamientos de 27 especies, una cifra que representa el 32% del total de las especies de cetáceos en el planeta (Urbán *et al.*, 1997). Esta diversidad es el reflejo de una combinación de factores ambientales y físico-químicos que suceden en la Bahía, así como de una alta productividad en el área, que ha sido documentada por diversos estudios (Signoret y Santoyo, 1980; Verdugo-Díaz *et al.*, 2014).

### ***Colecta de muestras***

Durante los meses de mayo a julio del año 2013 se realizaron seis salidas a la Bahía de La Paz como parte del Programa de Investigación en Mamíferos Marinos (PRIMMA) de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México. Estas salidas se realizaron en la embarcación “Yubarta” con un equipo abordo de 4 a 6 personas y con un esfuerzo de muestreo promediado de 8 horas al día. En total se obtuvieron 35 biopsias.



**Figura 3.** Mapa de la Bahía de La Paz, donde cada punto indica los sitios de muestreo durante las seis salidas realizadas entre mayo y julio del 2013.

La biopsia consiste en una pequeña porción de piel de aproximadamente 0.5–1 centímetros, y se obtuvo mediante la técnica descrita por Palsbøll (1991). Para tomar la biopsia, se carga una ballesta desde la embarcación, dicha ballesta utiliza una flecha con la punta modificada en forma cilíndrica y hueca, la punta cuenta con una especie de “dientes” en su interior que permiten retener el tejido. La flecha también cuenta con un flotador que rebota al momento de impactar con la ballena y permite su recolección desde la superficie del agua. Inmediatamente, la muestra se retira con pinzas de disección y se deposita en un vial con etanol al 70%, previamente rotulado con la fecha, el nombre abreviado de la especie (Bp) y el número de biopsia del día. Los viales se guardan en hielo, y en el laboratorio se almacenan en refrigeración a -20°C.

Para evitar tomar varias muestras de un mismo individuo, se tomó una fotografía de la parte del lomo donde se expusiera la aleta dorsal, que sirvió como referencia para identificarlo posteriormente. Aun así, en campo es difícil estar seguros de que se están muestreando individuos diferentes, especialmente si van en grupos grandes. También, si se sale a navegar en días consecutivos, es probable encontrar los mismos grupos de ballenas. Por lo anterior, es recomendable utilizar técnicas moleculares para asegurar que dentro de los análisis no existan individuos repetidos.

## ***Análisis en el laboratorio***

### **Extracción de ADN**

Para evitar la contaminación durante el proceso de extracción de ADN se trabajó bajo una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad, se utilizaron en todo momento guantes de látex esterilizados y bata de laboratorio. Antes de empezar se esterilizó todo el material mediante calor húmedo en el autoclave.

La extracción del ADN se llevó a cabo con un protocolo modificado de Miller *et al.* (1998). Para macerar la muestra, primero se cortó en pedazos pequeños con un bisturí dentro de un mortero, y posteriormente se le agregó nitrógeno líquido para congelar el tejido y pulverizarlo de manera más eficaz. El producto macerado se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 400  $\mu$ l de buffer de lisis (NaCl a 100 mM, Tris pH 8 a 50 mM, EDTA pH 8 a 100 mM, SDS a 1% y agua desionizada) y se le agregaron 20  $\mu$ l de proteinasa K. Los tubos se depositaron en una incubadora durante 60 minutos a 65°C, con una agitación constante de 800 rpm. Posteriormente, se dejaron enfriar en hielo por 10 minutos y se les agregó 2  $\mu$ l de NaCl saturado para precipitar proteínas y membranas. Se hizo una centrifugación de 10 minutos a 10,000 rpm y el sobrenadante se transfirió con una micropipeta a un tubo nuevo con 1 ml de etanol absoluto. El tubo se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 13,000 rpm, el sobrenadante se decantó dejando la pastilla de ADN en el fondo del tubo. A este mismo tubo se le agregaron 500  $\mu$ l de etanol al 70% y se centrifugó ahora 5 minutos a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el tubo fue sometido a una centrifugación al vacío durante 6 minutos aproximadamente

hasta secar la pastilla por completo. Finalmente, las muestras se resuspendieron en un volumen de 50 ml de agua desionizada estéril y se almacenaron a -20°C para los análisis posteriores.

La calidad del ADN se observó mediante electroforesis con un gel de agarosa al 0.8% (137 volts durante 40 minutos) en una solución buffer de TBE al 5%. Cada gel se visualizó mediante luz ultravioleta en un transiluminador UVP (ULTRA-VIOLET-PRODUCTS), y se le tomó una fotografía.

La concentración de cada muestra se midió con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 marca ThermoScientific, y con estos resultados se hicieron las diluciones pertinentes para tener alícuotas del ADN a 25 ng/μl.

### **Determinación de sexo**

Para determinar el sexo de los individuos, se utilizó la metodología estandarizada por Jayasankar *et al.* (2008), que se basa en la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con la amplificación de un gen presente únicamente en el cromosoma Y (SRY) y como control positivo, la amplificación de un gen homólogo presente en ambos cromosomas (ZFY/ZFX). Los primers que se utilizaron fueron los siguientes: SRY F (5'-CCCATGAACGCATTCATTGTGTGG-3'), y SRY R (5'-ATTTTAGCCTTCCGACGAGGTCGATA-3') (Jayasankar *et al.*, 2008); ZFYX0582F (5'-ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA-3') (Bérubé y Palsboll, 1996) y ZFYX1204R (5'-GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT-3') (Jayasankar *et al.*, 2008).

Es sabido que el gen SRY, presente únicamente en el cromosoma Y, desencadena una serie de reacciones que determinan la masculinidad en un individuo (Kashimada, 2010). Por lo tanto, teniendo los primers para dicho gen, en una reacción de PCR, se debe llevar a cabo la amplificación únicamente en individuos que tengan el cromosoma Y, es decir, en individuos del sexo masculino. Por lo anterior, la identificación de individuos femeninos se basaría en la ausencia de amplificación, sin embargo, es necesario tener un control positivo para asegurar que el ADN del individuo que se identifica como femenino es

amplificable, es decir, que la ausencia no se debe a un error en la amplificación (Jayasankar *et al.*, 2008), es debido a eso que se utiliza el gen ZFY/ZFX.

Las reacciones para el gen SRY y ZFY/ZFX se llevaron a cabo por separado debido a la diferencia en las temperaturas de alineamiento, pero el contenido fue igual para ambos. Para cada individuo se preparó una reacción con un volumen final de 5  $\mu$ l, que contenía 3  $\mu$ l de QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (1000), 1  $\mu$ l de primer a una concentración de 5 pmol/ $\mu$ l, y finalmente, 1  $\mu$ l de ADN a 25 ng/ $\mu$ l. La amplificación se llevó a cabo con el mismo programa, cambiando únicamente las temperaturas de alineamiento; 56°C para SRY y 60°C para ZFY/ZFX. Empezando con 95°C por 15 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 2 minutos, la temperatura de alineamiento por 15 segundos y 72°C por 15 segundos. Se le agregaron 10 minutos a 72°C como temperatura de elongación para que las cadenas terminen de formarse. Posteriormente se realizó una electroforesis (110 volts por 40 minutos) en un gel de agarosa al 1% para visualizar los productos, determinar la presencia y/o ausencia de los productos de PCR y con ello determinar el sexo del individuo.

Para la determinación de sexo y para todos los siguientes análisis que utilizan la técnica de PCR, se utilizó el mismo termociclador: Mastercycler egradient marca Eppendorf.

### **Secuencias de la región control del ADN mitocondrial**

Se secuenciaron los primeras 411 pares de bases de la región control del genoma mitocondrial para todos los individuos muestreados. Se utilizaron los primers BP00016R (5'-CCTCAGTTATGTTATGATCATGGGC-3') (Bérubé, sin publicar) y MT4F (5'-CCTCCCTAAGATCAAGGAAG-3') (Arnason *et al.*, 1993), ambos a una concentración de 5 pmol/ $\mu$ l. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 5  $\mu$ l, que contenía 3  $\mu$ l de QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 0.5  $\mu$ l de cada primer y 1  $\mu$ l de ADN a 25 ng/ $\mu$ l. El programa que se utilizó en el termociclador fue de 95°C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 30 segundos y 72°C por un minuto, con una temperatura de

elongación de 72° por 10 minutos. El producto se visualizó por electroforesis (137 volts por 40 min) en un gel de agarosa al 0.8%.

Aunque el producto se viera aparentemente limpio en el gel (sólo una banda), se le realizó una limpieza para asegurar su calidad. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se agregaron 500 µl de etanol absoluto, 10 µl de acetato de sodio 3M y el volumen total de producto PCR; se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y nuevamente se le agregaron 500 µl de etanol ahora al 70%; se hizo una centrifugación de 14,000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar. Finalmente, se resuspendió la pastilla en el volumen que el producto tenía originalmente (4 µl).

La secuenciación se llevó a cabo por la técnica de Sanger, la cual se basa en la interrupción controlada de la replicación del ADN in vitro (Sanger *et al.*, 1977). La reacción de secuencia se realizó con el Kit de Applied Biosystems™ Big Dye® Terminator v3.1 en un volumen total de 10 µl, que contenían 1 µl de BigDye (marcado), 3 µl de buffer 5x BigDye, 1 µl del primer MT4F, 1 µl del producto PCR limpio y 4 µl de agua desionizada. El programa que se utilizó en el termociclador fue el siguiente: 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos y 60°C por 2 minutos, finalmente 72°C por 1 minuto.

Se realizó una limpieza del producto de secuencia por columnas de sephadex. El método se basa en la filtración del producto a través de un gel, que en este caso es el sephadex (Zoon, 1987). El protocolo que se siguió fue recuperado de Márquez *et al.* (2014).

Las columnas se prepararon agregando Sephadex® G-50 Sigma-Aldrich hasta la marca indicada en la columna y 0.8 ml de agua desionizada. La columna se debe agitar bien en vortex y asegurarse de que no queden burbujas. Se dejó reposar una hora a temperatura ambiente para asegurar que el sephadex se hidrate de manera homogénea. Finalmente, se retiró el exceso de agua centrifugando 3 minutos a 4000 rpm y las columnas quedan listas para usarse. La columna se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, que sirvió como contenedor del producto



de secuencia al momento de la filtración por centrifugación. El total del producto de secuencia se depositó en el centro de la columna de sephadex con una micropipeta, se dejó reposar 5 minutos y se centrifugó 3 minutos a 4000 rpm. Los tubos eppendorf, que contienen el producto limpio, se centrifugaron al vacío para evaporar los restos de agua y formar una pastilla. Por último, la pastilla limpia se resuspendió en 10 µl de Hi-Di™ Formamida, marca Applied Biosystems™, e inmediatamente se colocó en una placa de 96 pozos para ser leída por electroforesis capilar en un analizador genético automático ABI Prism 3130xl de 16 capilares marca Applied Biosystems™. Cabe mencionar que este mismo analizador genético se utilizó para leer los análisis siguientes con microsatélites.

Se observó la calidad de los electroferogramas en el software BioEdit v7.2.5 y en caso de que la señal no fuera clara, se editaron las secuencias con Sequencher 4.1.4.

### **Microsatélites**

Se realizó un PCR de gradiente (40-60°C) para probar 10 microsatélites nucleares, de los cuales hubo uno que no amplificó con ninguna de las temperaturas, por lo que fue descartado para los análisis posteriores. Al final, se usaron 9 microsatélites (ver tabla 1).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 5 µl, que contenía 3 µl de QUIAGEN Multiplex PCR Master Mix (1000), 0.5 µl de cada primer [5 pmol/µl] y 1µl de ADN [25 ng/µl]. Para todos los microsatélites se utilizó el mismo programa en el termociclador, cambiando únicamente las temperaturas de alineamiento. Empezando con 95°C durante 15 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 2 minutos, 15 segundos a la temperatura de alineamiento (ver tabla 1) y 72°C por 15 segundos, finalizando con una temperatura de elongación de 72°C por 10 minutos. Antes de ser leídos en el analizador genético, todos los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1.2% (100 volts por 30 minutos).

Para la lectura de los microsatélites en el analizador genético se utilizaron placas de 96 pozos, a cada pozo se le agregó 1 µl del producto de PCR de cada

individuo, 10 µl de Hi-Di™ Formamida y 0.3 µl de GeneScan™-600 LIZ® v2.0, ambos marca Applied Biosystems™.

**Tabla 1.** Resumen de los microsatélites utilizados en este trabajo.

Locus	Clave	Secuencia del primer 5' 3'	Referencia	Intervalo de tamaño (pb)	Etiqueta fluorescente	Temperatura de alineamiento (°C)
<b>GATA028</b>	M2GATA028 R	AAA GAC TGA GAT CTA TAG TTA	Palsboll <i>et al.</i> , 1997	199-236	FAM	51.1
	GATA028 F	CGC TGA TAG ATT AGT CTA GG		181-253	NED	51.1
<b>GATA417</b>	M2GATA417 R	CTG AGA TAG CAG TTA CAT GGG	Bérubé <i>et al.</i> , 2000	147-149*	PET	51.1
	GATA417 F	TCT GCT CAG GAA ATT TTC AAG		162-226	NED	51.1
<b>GT575</b>	M2GT575 R	CTG CCA ATA TAA GTG AAT ACA	Palsboll <i>et al.</i> , 1997	238-269	VIC	53.8
	GT575 F	CCA TCA ACT GGA AGT CTT T		117-128*	PET	60
<b>GGAA520</b>	GGAA520 R	TAG CAG AYC TGA GTT ATT TCC	Bérubé <i>et al.</i> , 2000	149-169*	VIC	60
	GGAA520 F	TAG CAT TTT AGT CTT GGG TGG		187-228*	FAM	60
<b>GATA053</b>	M1GATA053 R	ATT GGC AGT GGC AGG AGA CCC	Palsboll <i>et al.</i> , 1997	75-102	NED	60
	GATA053 F	GAC ACA GAG ATC TAG AAG GAG				
<b>GT011</b>	GT011 R	CAT TTT GGG TTG GAT CAT TC				
	GT011 F	GTG GAG ACC AGG GAT ATT GC				
<b>GT195</b>	GT195 R	TGA GAA AGA TGA CTA TGA CTC TGA				
	GT195 F	TGA AGT AAC AGT TAA TAT ACC				
<b>GT211</b>	GT211 R2	CAT CTG TGC TTC CAC AAG CCC				
	GT211 F	GGC ACA AGT CAG TAA GGT AGG				
<b>TAA023</b>	TAA023 R	CTC GCA CAG AAA TGA AGA CCC				
	TAA023 F	AGA GCC TG AAC AGA ACA AGG				

\*El intervalo de tamaño de estos microsatélites no se reportó en los artículos de referencia, por lo tanto, se reporta el intervalo que se encontró en el presente trabajo.

## **Análisis de datos**

### **Secuencias de región control del ADN mitocondrial**

Se secuenciaron 35 muestras de *Balaenoptera physalus* dentro de la Bahía de La Paz, a las cuales se les realizó un BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) con la base de datos de nucleótidos disponible en la página del NCBI. Este análisis compara una secuencia dada contra toda la base de datos disponible en línea y encuentra las secuencias con mayor número de regiones de similitud, que serían las secuencias de la misma especie. De esta manera se puede comprobar que las secuencias que se obtuvieron son de la especie esperada.

Para los análisis posteriores la muestra se redujo de 35 biopsias a 27 individuos, esta reducción de la muestra se explica posteriormente en detalle en la sección de Resultados.

Para los análisis de diferenciación poblacional entre el grupo de individuos de la Bahía de La Paz y la población del Pacífico Norte, se utilizaron 221 secuencias obtenidas del GenBank, que Archer *et al.* (2013) recopilaron en un estudio previo para *B. physalus* en el Pacífico Norte, por lo tanto, se trabajaron un total de 248 secuencias.

Con la ayuda del programa PhyDE-1 v0.9971 (Müller y Müller, 2010), todas las secuencias fueron alineadas y recortadas hasta las 411 pares de bases.

Los niveles de diversidad genética, como el número de haplotipos, el número de sitios segregantes, la diversidad haplotípica, la diversidad nucleotídica, y el coeficiente de diferenciación poblacional, se obtuvieron con el software DNAsp v5 (Librado y Rozas, 2009) .

El número de sitios segregantes es un estimado de la diversidad genética que se basa en los nucleótidos que son polimórficos en la muestra (Piñero *et al.*, 2008). La diversidad haplotípica se expresa en función de la frecuencia de los haplotipos en la muestra que se está analizando y se presenta con valores de 0 a 1, donde 0 quiere decir que hay un solo haplotipo para todos los individuos y 1 es que cada individuo tiene un haplotipo distinto. La diversidad nucleotídica es el promedio de la proporción de diferencias en los nucleótidos entre todos los posibles pares de secuencias en la muestra (Hartl y Clark, 1997).

La diferenciación poblacional se estimó entre la población del Pacífico Norte y el grupo de la Bahía de La Paz con el coeficiente  $F_{st}$ . El estadístico  $F_{st}$  es una medida estándar de diferenciación poblacional que se basa en las varianzas de las frecuencias alélicas de las poblaciones (Eguiarte *et al.*, 2010). Se obtienen valores de 0 a 1, donde 0 significa que las frecuencias alélicas son idénticas para ambas poblaciones, y 1 indica que cada población está fija en alelos diferentes.

Se construyeron dos redes de haplotipos con el software popart-1.7 (Clement *et al.*, 2002), una que contemplaba únicamente al grupo de individuos de la Bahía de La Paz, y otra que comparaba a dicho grupo con la población del Pacífico Norte.

### **Microsatélites**

El tamaño de los alelos se observó con el software PeakScanner™ v2 (Applied Biosystems™) Para el caso de los individuos que tuvieran una señal de lectura muy baja (un valor por debajo de 20 en la mínima altura de los picos (unidades relativas de fluorescencia)), se repitió el procedimiento desde la amplificación del fragmento.

Con el software GenALex 6.501 (Peakall y Smouse, 2012) se obtuvieron los principales estadísticos descriptivos, tales como: número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efectivos ( $N_e$ ), heterocigosidad esperada y observada ( $H_e$  y  $H_o$ , respectivamente), coeficiente de endogamia ( $F$ ) y la probabilidad de identidad ( $PI$ ).

El número de alelos efectivos es el número de alelos con frecuencias iguales que se requieren para llegar a un diversidad genética dada (Orjango *et al.*, 2011) y se calcula con la sumatoria de la frecuencia de los alelos por cada locus. La heterocigosidad se refiere a la proporción de individuos con dos alelos diferentes para un mismo locus (heterocigos). La probabilidad de identidad se define como la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una población tengan el mismo genotipo. El coeficiente de endogamia ( $F$ ) de un individuo es la probabilidad de que dicho individuo reciba en un locus dado, dos alelos idénticos por descendencia (Caughley, 1994).

También con el software GenAlex 6.501 se probó si los loci se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg y se hizo un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) diferenciando hembras y machos para examinar si existen agrupaciones genéticas entre individuos y si éstas están sesgadas por el sexo.

Se usó el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2010) para averiguar si existía estructura genética entre los individuos del grupo. Se aplicaron 100,000 cadenas de Markov Monte Carlo y 50,000 pasos de Burnin, probando una  $k$  de 1 a

5, con 10 iteraciones, utilizando un modelo de “admixture” y de frecuencias alélicas correlacionadas. Con Structure Harvester (Earl y vonHoldt, 2011), se evaluaron los valores de probabilidad para las múltiples k.

Por último, se realizó un análisis con el software ML-Relate (Kalinowski *et al.*, 2006), que hace estimaciones pareadas a través de la máxima probabilidad de parentesco o relación. Además, a través de análisis probabilísticos, asigna cuatro categorías de relación entre todos los pares de individuos: “sin relación”, “hermanos”, “medios hermanos” y “padres/hijos”. Las relaciones genealógicas entre individuos se representan matemáticamente como probabilidades de que dos genotipos (o dos individuos) compartan cero, uno o dos alelos idénticos por descendencia. Cabe mencionar que las relaciones más cercanas pueden ser difíciles de diferenciar, por ejemplo, los medios hermanos podrían confundirse con la categoría de “primos” o “no relacionados”, pero no tanto con la categoría de “padres/hijos” (Kalinowski *et al.*, 2006).

Para representar las relaciones encontradas entre los individuos, se hizo una red en el programa R 2.13.1 (R Core Team, 2014) con las categorías asignadas y una gráfica de frecuencias con las estimaciones de máxima probabilidad de parentesco.

### **Foto-identificación**

Se hizo una revisión del inventario fotográfico sobre la especie en el Golfo de California. Este inventario es el resultado de un proyecto a cargo del Programa de Investigación de Mamíferos Marinos (PRIMMA) de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), que reúne información fotográfica de las distintas instituciones que trabajan con la especie en todo el Golfo de California. El catálogo tiene 923 registros capturados durante el período de 1983-2013, resultando en un total de 415 individuos foto-identificados (Urbán *et al.*, 2014). A través de este instrumento se logró conocer el tiempo de residencia de los animales en La Bahía de La Paz, los movimientos e historia de cada individuo dentro del Golfo de

California, así como un aproximado de la composición y duración de las agrupaciones.

Cabe mencionar que además de la información del catálogo, se utilizó la información más reciente que tiene el Laboratorio de Mamíferos Marinos de la UABCS, por lo tanto, se presentan registros hasta el año 2015.

## RESULTADOS

De las 35 muestras iniciales recolectadas en la Bahía de La Paz, se identificó por técnicas moleculares que había individuos repetidos (ver más adelante la sección de microsatélites), por lo que fueron eliminados para los análisis posteriores, resultando finalmente en un total de 27 individuos.

### ***Determinación del sexo***

Los resultados obtenidos en un gel de agarosa permitieron identificar como machos a los individuos que presentaran doble amplificación (dos bandas), y los que presentaron una banda, se identificaron como hembras. Finalmente, se obtuvo un total de 8 hembras y 19 machos. Hubo un individuo (carril 16 en el gel) (Figura 11, Anexo) que, a diferencia del resto, presenta una banda casi imperceptible en la amplificación del SRY, esto puede deberse a que el ADN es de baja calidad, no obstante, el PCR se realizó dos veces y se comprobó que a pesar de que la banda era muy tenue, en ambas reacciones existe amplificación. Las fotografías de los geles se encuentran en el anexo.

### ***Análisis de secuencias***

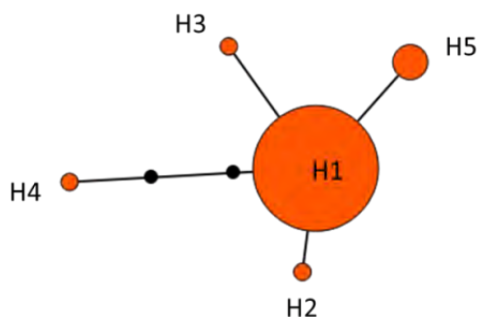
#### **Haplotipos Bahía de La Paz**

Para la Bahía de La Paz se encontraron 5 haplotipos, que en el presente trabajo se denominaron H1, H2, H3, H4 y H5. Tres de ellos se habían reportado previamente dentro del Golfo de California como Bp49 (GenBank: AF120004.1) (H1), Bp50 (H2) y Bp51 (H3) por Bérubé *et al.* (2002). El haplotipo H4 no se había reportado dentro del Golfo, pero sí está presente en el haplogrupo del Pacífico Norte y únicamente es portado por un individuo en la muestra de la Bahía de La Paz. El haplotipo H5, observado en tres individuos, tampoco había sido reportado dentro del Golfo de California pero resultó ser un haplotipo común en la población del Pacífico Norte y en la Bahía de La Paz está presente en tres individuos (ver tabla 2).

**Tabla 2.** Haplotipos encontrados para el grupo de la Bahía de La Paz. La frecuencia se refiere al número de individuos de la muestra que tienen dicho haplotipo. La posición es el lugar de la secuencia donde se encuentra la sustitución, tomando como referencia la secuencia de Bp49 de 411 pares de bases.

Referencia	Haplotipo	Sustitución	Posición	Frecuencia	Clave de la secuencia
<b>Bérubé et al., 2002</b>	H1 (Bp49)	Haplotipo ancestral		21	El resto
	H2 (Bp50)	T por C	164	1	17
	H3 (Bp51)	T por C	215	1	12
<b>El presente trabajo</b>	H4	T por C	88	1	24
		C por T	202		
		A por G	291		
	H5	T por C	302	3	2,3,19

De los 5 haplotipos encontrados, el haplotipo H1 (Bp49), por encontrarse con mayor frecuencia, se puede considerar al haplotipo ancestral y los demás son derivados (Aguirre-Dugua y González-Rodríguez, 2016). Estos cuatro haplotipos derivados se diferencian principalmente por una sustitución, excepto el H4, que presenta tres sustituciones, es decir, dos pasos mutacionales más que los demás (Figura 4), lo cual indica que el individuo que porta el H4 (individuo 24) está alejado del haplogrupo del Golfo de California. Cabe mencionar que todas las sustituciones son transiciones, y la más común es de Timina por Citosina. El haplotipo más común (Bp49) está representado por la secuencia de la Figura 13 (ver Anexo).



**Figura 4.** Red de haplotipos para la Bahía de La Paz, donde cada círculo es un haplotipo y su tamaño es proporcional a la frecuencia. Los círculos negros indican el número de pasos mutacionales entre haplotipos. Por ejemplo, el H4 tiene 3 sustituciones con respecto al H1. Cuando no hay círculos negros es que existe sólo una sustitución.



## Medidas de diversidad genética

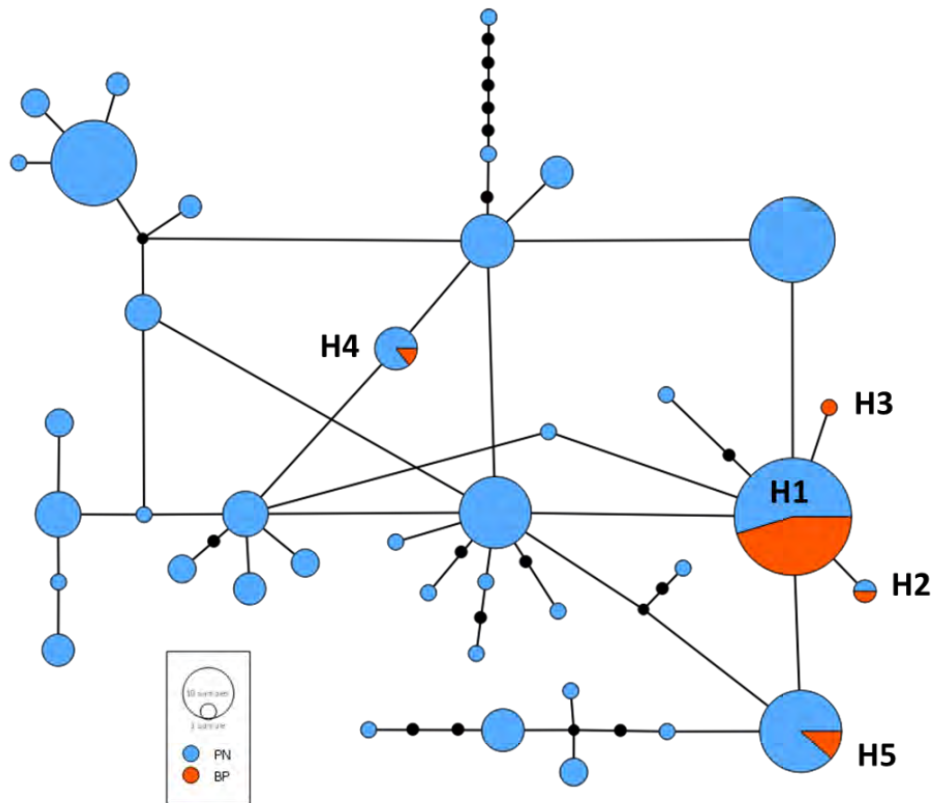
La diversidad haplotípica ( $h$ ) para los individuos de la Bahía de La Paz es de 0.393 y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es de 0.001, ambos valores son bajos, esto quiere decir que los haplotipos tienen pocas diferencias entre sí, y tomando en cuenta que únicamente 6 mutaciones son las que dan lugar a los 5 haplotipos, los valores bajos de diversidad nucleotídica son de esperarse (Tabla 3).

**Tabla 3.** Diversidad genética total y de cada región.

Grupo	Número de secuencias	Número de haplotipos	Sitios segregantes (s)	diversidad haplotípica (h)	Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )
Bahía de La Paz	27	5	6	0.393	0.001
Pacífico Norte (Archer <i>et al.</i> , 2013)	221	38	32	0.926	0.007
Total	248	39	32	0.912	0.007

Se obtuvo un coeficiente de diferenciación poblacional  $F_{st} = 0.215$  ( $p < 0.001$ ) entre la población del Pacífico Norte y los individuos de la Bahía de La Paz.

Con las 221 secuencias del Pacífico Norte y las 27 secuencias de la Bahía de La Paz, se obtuvieron 39 haplotipos a partir de 32 sitios segregantes. En la red de haplotipos construida con todas las secuencias (Figura 5) se observa que el H4 se asocia mejor con la población del Pacífico Norte. Los estudios que se han realizado hasta ahora (Bérubé *et al.* 2002; Archer *et al.* 2013 y el presente trabajo) sugieren que el haplotipo H3 es exclusivo del Golfo de California y además es un haplotipo poco común, ya que en el trabajo de Bérubé *et al.* (2002) aparece solamente en un individuo del Golfo de California, en el trabajo de Archer *et al.* (2013) no aparece dicho haplotipo y en el presente trabajo aparece también únicamente en un individuo



**Figura 5.** Red de los 39 haplotipos encontrados entre la población del Golfo de California (color rojo) y el Pacífico Norte (color azul). Cada círculo representa un haplotipo y el tamaño de los mismos es proporcional a su frecuencia.

### **Microsatélites**

Se analizaron un total de 35 muestras del Golfo de California con 9 microsatélites nucleares (ver tabla 1, Pág. 24). Se encontró que ocho muestras presentaron genotipos idénticos para los nueve loci. Al corroborar que dichas muestras también presentaban el mismo haplotipo, el mismo sexo y que eran recapturas en el catálogo de foto-identificación, se concluyó que se trataba de individuos repetidos y se eliminaron. Por lo tanto, los análisis finales se realizaron con una n=27.

Se obtuvieron los principales estadísticos descriptivos de variación genética (Tabla 4) donde los valores de heterocigosidad destacan una  $H_o$  promedio de 0.626, ligeramente más alta que la esperada (0.552) por equilibrio de Hardy-Weinberg.

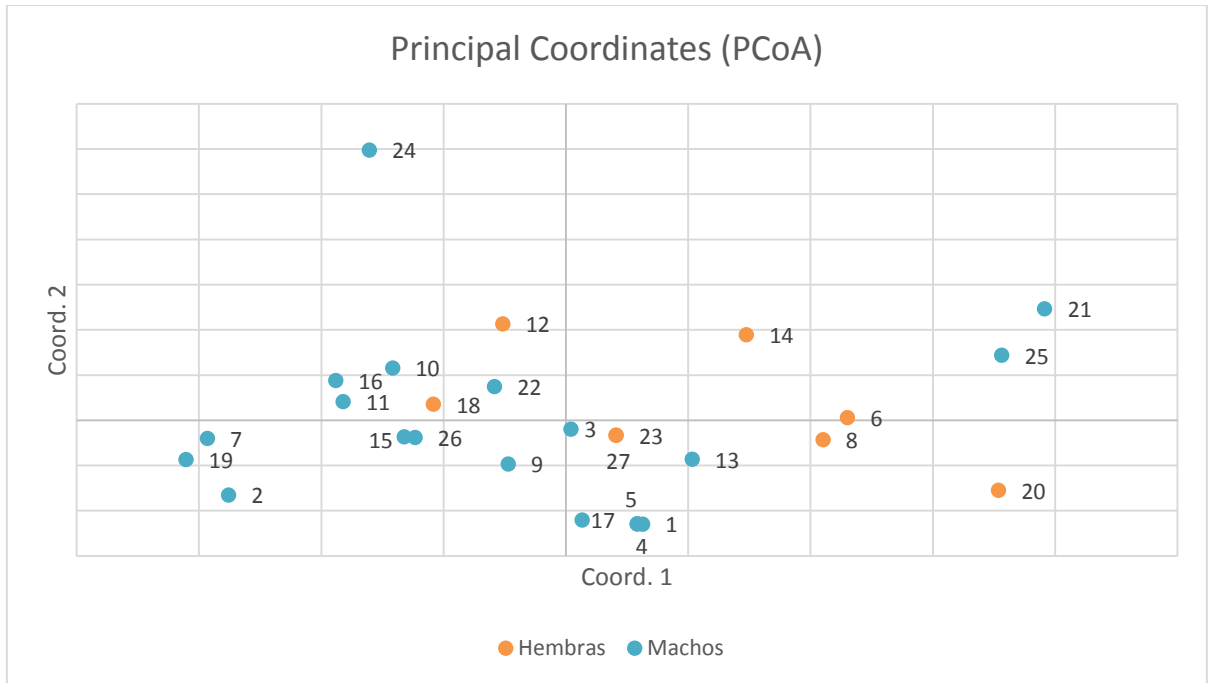
En general, el índice de fijación (F) presenta valores muy bajos o negativos, con un promedio de -0.095. Los valores negativos demuestran que existe un déficit de homocigotos, lo cual se relaciona con una ausencia de endogamia en la población. Los valores obtenidos de probabilidad de identidad por locus son muy bajos, por lo tanto, se deduce que mediante el uso de los 9 microsatélites probados en el presente trabajo se puede inferir, con un alto nivel de certeza, la identidad genética de los individuos.

**Tabla 4.** Principales estadísticos descriptivos de variación genética para cada locus. Número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), índice de fijación (F), probabilidad de identidad (PI). La prueba de Chi cuadrada se realizó para evaluar el equilibrio de Hadry-Weinberg, los valores en negritas en la columna de Probabilidad (p) son los que resultaron significativos.

Locus	Na	Ne	Ho	He	F	PI	Chi-cuadrada	p
<b>GATA028</b>	7	3.352	0.778	0.702	-0.109	1.2E-01	15.653	0.789
<b>GATA417</b>	10	4.765	0.889	0.790	-0.125	6.4E-02	50.443	0.267
<b>GT575</b>	2	1.077	0.074	0.071	-0.038	8.6E-01	0.040	0.842
<b>GGAA520</b>	8	1.429	0.259	0.300	0.137	5.0E-01	108.333	<b>0.000</b>
<b>GATA053</b>	8	2.128	0.444	0.530	0.162	2.4E-01	43.619	<b>0.030</b>
<b>GT011</b>	7	2.206	0.704	0.547	-0.287	2.7E-01	63.238	<b>0.000</b>
<b>GT195</b>	10	4.703	1.000	0.787	-0.270	7.2E-02	99.099	<b>0.000</b>
<b>GT211</b>	7	3.600	1.000	0.722	-0.385	1.1E-01	30.200	0.088
<b>TAA023</b>	4	2.056	0.481	0.514	0.063	3.2E-01	4.727	0.579
<b>Promedio</b>	7	2.813	0.626	0.552	-0.095	2.8E-01		

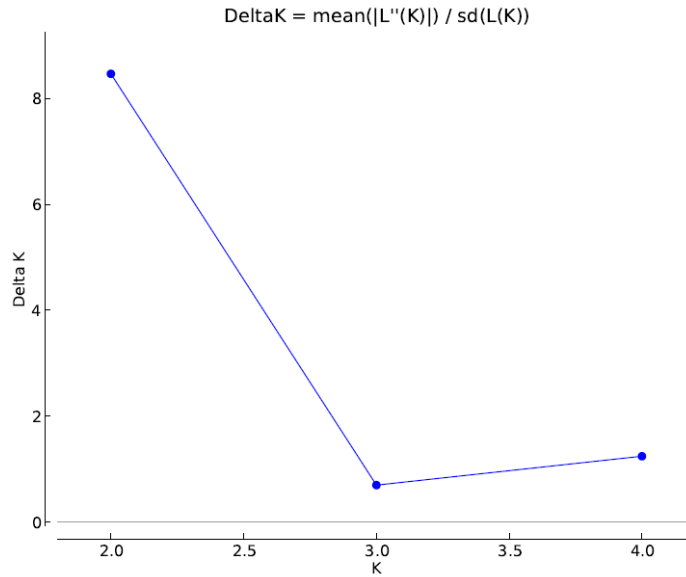
En el resultado del Análisis de Coordenadas Principales (Figura 6) no se observan agrupaciones definidas dentro de la muestra, los individuos se encuentran dispersos en los cuatro cuadrantes. Se observa que la mayoría de las hembras se agruparon dentro de los cuadrantes de la derecha, esta agrupación sesgada por sexo puede deberse únicamente al azar o también puede indicar que el factor sexo tiene incidencia en las agrupaciones genéticas. No obstante, este supuesto no se sustenta con los análisis posteriores, ya que el sexo no se presenta como un rasgo determinante en la formación de los subconjuntos de individuos. Cabe

destacar la lejanía del individuo 24 del resto de los individuos, el cual también porta el único haplotipo H4 (el que tiene más mutaciones).



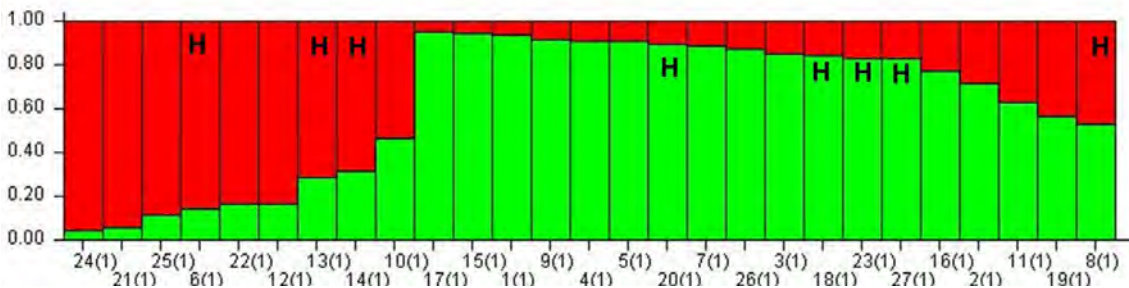
**Figura 6.** Análisis de coordenadas principales, donde cada número representa un individuo y el color del punto corresponde al sexo del mismo.

En la figura 7 se presenta el resultado de la evaluación de los cinco grupos genéticos probados con el programa STRUCTURE, el número 2 tiene la delta k más alta, lo cual significa que el grupo de rorcuales de la Bahía de La Paz tiene una mayor probabilidad de estar estructurado en dos grupos genéticos (Evano *et al.* 2005).



**Figura 7.** Delta K obtenida con Harvester a partir de los cinco grupos probados (K=5).

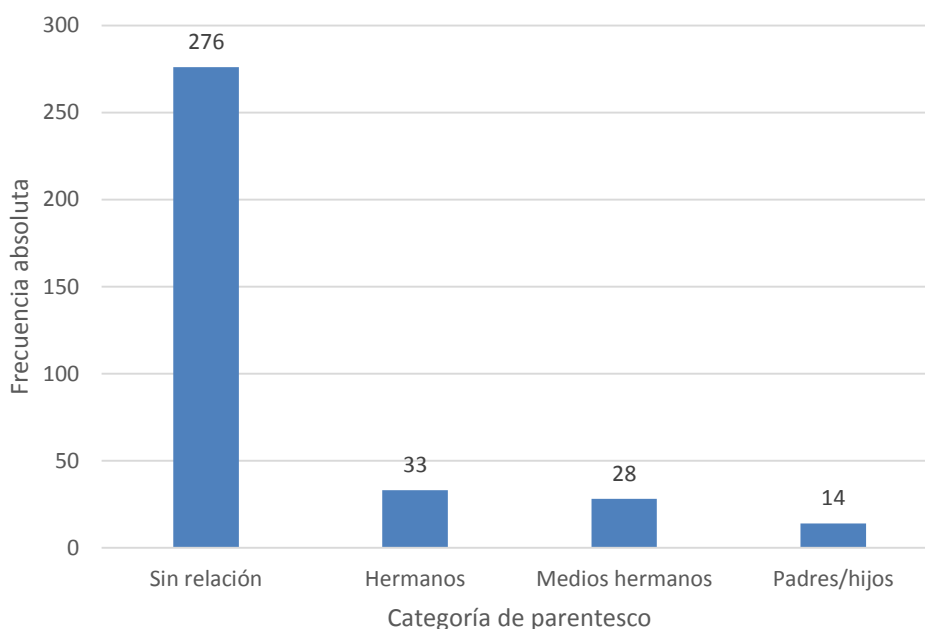
En la Figura 8 se muestra la gráfica de barras realizada en STRUCTURE con la asignación genética que explica mejor los datos. En este caso arrojaron dos grupos genéticos. Dicho resultado es congruente con los resultados obtenidos previamente en el presente trabajo, tanto en microsatélites como en secuencias, es decir, existen individuos que a pesar de que pertenecen a la misma población presentan una diferenciación genética al interior del grupo. Se clasificaron los individuos por sexo para averiguar si existía un patrón que estuviese sesgando las agrupaciones por el sexo del individuo, sin embargo, en este caso, no parece ser un rasgo determinante para la formación de las agrupaciones genéticas.



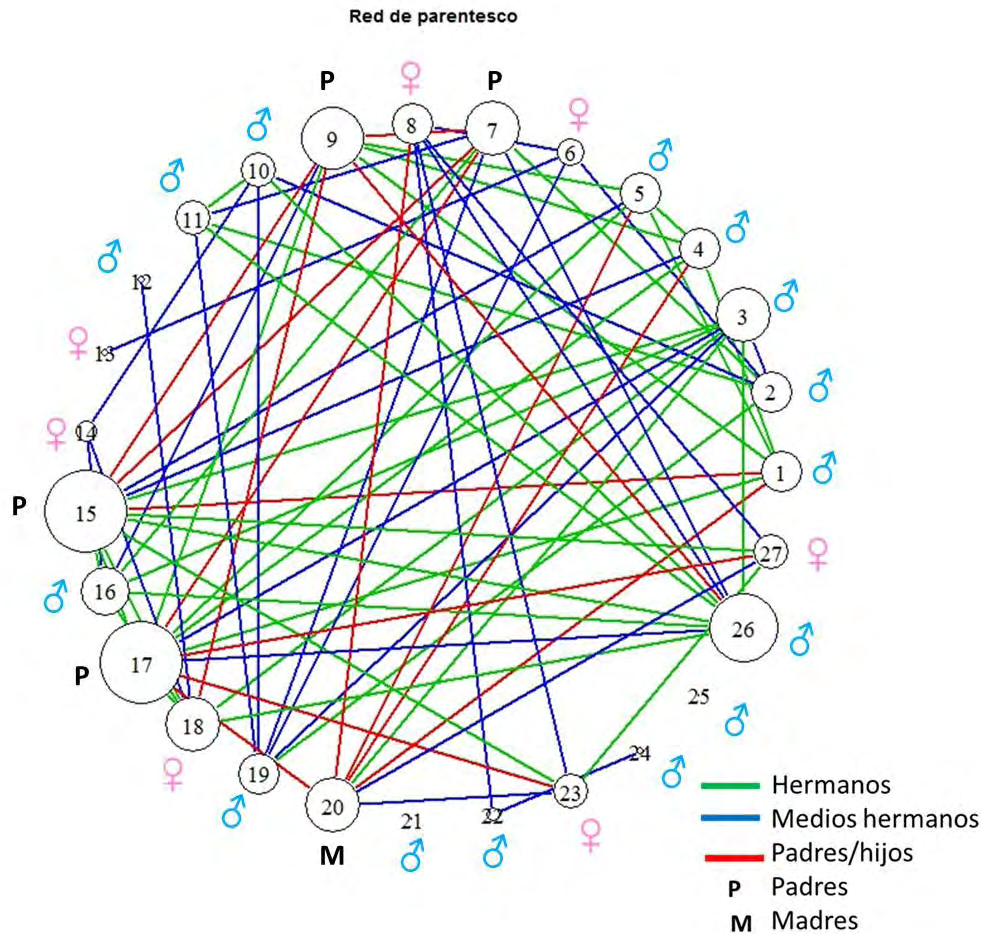
**Figura 8.** Estructura genética de los 27 individuos de la Bahía de La Paz. Cada barra representa un individuo y los colores indican la proporción asignada de cada grupo a cada individuo. La letra H indica que el individuo es hembra, el resto son machos.

## Parentesco

Se construyó una red de todas las relaciones de parentesco encontradas bajo las categorías de “padres/hijos”, “medios hermanos”, “hermanos” y “sin relación” (Figura 10). Se identificaron una madre y cuatro padres dentro del grupo. A pesar de que existe un total de 14 relaciones de padre/hijo, el individuo 20 (hembra) aparece en 5 de las 14 relaciones y los individuos 15, 9, 7 y 17 (machos) presentan cada uno tres relaciones de padre/hijo, por lo tanto, puede inferirse que se trata de individuos progenitores dentro del grupo. Únicamente hubo dos individuos que no presentaron ninguna relación y hubo tres individuos que sólo presentaron una relación. El resto de los individuos presentan un coeficiente de parentesco que los incluye mayormente en la categoría de hermanos (33), seguido de medios hermanos (28) y por último padres/hijos (14), como se observa en la figura 9. La relación de hermanos es la que tiene la probabilidad más alta de parentesco en la estimación que realiza el programa ML-Relate, y precisamente, esa relación fue la más frecuente en la muestra, lo cual indica que en estudios basados en frecuencias alélicas, los individuos son genéticamente muy cercanos.



**Figura 9.** Frecuencia absoluta de las relaciones de parentesco de un total de 351 relaciones posibles entre 27 individuos.



**Figura 10.** Red de relaciones de parentesco entre 27 individuos del Golfo de California. Cada círculo representa un individuo y el tamaño del mismo es proporcional al número de relaciones que éste tiene.

El número de relaciones que tiene cada individuo es independiente de las agrupaciones determinadas por los análisis del PCoA, es decir, el hecho de que un individuo presente un mayor o menor número de relaciones no lo asocia a una agrupación específica dentro del PCoA. Sin embargo, en los análisis de STRUCTURE sí se observó cierto patrón. Todos los individuos que presentaron relaciones de paternidad (individuos 7, 9, 15, 17 y 20) de la figura 10 pertenecen a una de las dos agrupaciones de STRUCTURE, específicamente la agrupación en la que predomina el color verde, y los cinco individuos que presentaron pocas o ninguna relación (21, 24, 25, 13 y 12) pertenecen al grupo rojo de STRUCTURE (ver figura 8, Pág. 35).

### **Foto-identificación**

Con la ayuda del catálogo fotográfico para *B. physalus* en el Golfo de California se logró identificar que de los 27 individuos, 22 individuos tienen una historia de movimientos dentro el Golfo de California, es decir, se han fotografiado en diferentes años, algunos desde 2004 o 2010, incluso se han visto después del muestreo del presente trabajo en 2015. Los registros incluyen las zonas de Bahía de Los Ángeles, Isla Danzante, Kino, Canal de San José, Bahía de La Paz y Loreto, sin embargo, el 78% de dichos avistamientos son en La Bahía de La Paz.

De manera particular 8 individuos se fotografiaron más de una vez durante los 3 meses de muestreo en La Bahía de la Paz, el resto sólo se registraron en una ocasión. De los 8, varios se observaron juntos en los mismos días, por ejemplo individuos 8 y 11 (Tabla 5), pero no necesariamente en el mismo avistamiento.

**Tabla 5.** Individuos que tuvieron recapturas fotográficas durante los tres meses de muestreo.

Individuo	25-may	10-jun	18-jun	30-jun	11-jul	30-jul
8						
9						
11						
18						
19						
21						
22						
27						



## DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la variabilidad genética y las relaciones de parentesco de un grupo de rorcuales comunes de la Bahía de La Paz, para lo cual se determinó el sexo de todos los individuos, su haplotipo por ADN mitocondrial y se obtuvieron datos de 9 microsatélites nucleares, lo que derivó en información relevante para responder a dicho objetivo.

### **Sexo**

De los 27 individuos muestreados, 19 fueron machos y 8 hembras (1.74 M:H). Esta proporción es común encontrarla en otras poblaciones de la misma especie (Aglar *et al.* 1993; Bérubé *et al.* 1998), e incluso en estudios previos para *Balaenoptera physalus* dentro del Golfo de California (38M y 23H, 1.72 M:H) (Bérubé *et al.*, 1998; Enríquez, 1996). La proporción de sexos está claramente inclinada a una dominancia numérica de machos, lo cual podría deberse a un sesgo en el muestreo, pero dados los antecedentes de la especie, es un patrón que se ha observado constantemente, por lo que se ha concluido que la proporción sesgada por los machos es real (Enríquez, 1996). Esta situación es preocupante ya que un menor número de hembras indica que hay un menor número de individuos reproductivos, que son los que contribuyen a la siguiente generación, asimismo se asocia con un tamaño efectivo poblacional pequeño, el cual a su vez se asocia con la pérdida de adecuación e incluso depresión por endogamia (Moreno, 2007).

Para estudios de parentesco, tener el sexo de cada individuo es información valiosa para identificar posibles parejas dentro del grupo. En ese sentido, se obtuvieron cuatro machos identificados como posibles padres y únicamente una hembra como madre. Sólo en una ocasión se identificó a ambos padres de un individuo, aunque el trío padre, madre e hijo nunca se observó en el mismo avistamiento. Posteriormente se explicarán estos resultados en detalle en la sección de Parentesco.

### ***Variación en el ADN mitocondrial***

Se encontraron en total 5 haplotipos en un muestreo de 27 individuos, lo cual llama la atención, ya que en estudios pasados de todo el Golfo de California sólo se habían reportado 3 haplotipos con más de 200 muestras analizadas (ver tabla 6) (Urbán, 1997; Bérubé *et al.*, 1998; Bérubé *et al.*, 2002, Rivera (en revisión)). Sin embargo, es importante destacar que en los trabajos pasados están comparando únicamente 288 pares de bases (pb), las cuales representan una parte del fragmento completo compuesto de 937 pb, que forma la región control para *Balaenoptera physalus* (Arnason *et al.*, 1991). En el presente trabajo se secuenció un total de 411 pb, es decir, se tienen 123 pb adicionales a las que se habían trabajado anteriormente, y de las cuales se puede extraer mayor cantidad de información.

Debido a lo anterior, es natural suponer que existe una alta probabilidad de que los dos haplotipos nuevos ya se hayan muestreado en los trabajos pasados dentro del Golfo de California y que pasaron desapercibidos porque las mutaciones que los diferencian estaban “ocultas” en el fragmento que sucede a las 288 pb. No obstante, el haplotipo H4, presenta diferencias mutacionales dentro de las primeras 288 pb, por lo tanto, se puede afirmar que este haplotipo no había sido muestreado anteriormente dentro del Golfo de California. También cabe mencionar que dicho haplotipo es portado únicamente por un individuo (Número 24) y que en campo el individuo también se observó con características y comportamientos particulares: tenía tamaño pequeño, iba navegando muy tranquilo y mostró curiosidad hacia la panga. Entre las observaciones destaca: “parecía una cría recién destetada”. Esto podría sugerir que se trata de un juvenil de la población del Pacífico Norte que entró al Golfo durante la temporada cálida del 2013. No obstante, carecemos de evidencia suficiente para corroborar dicha hipótesis.

Es interesante haber encontrado los tres haplotipos reportados para el Golfo de California más dos nuevos en un muestreo tan reducido en espacio y tiempo, como es la Bahía de La Paz y únicamente durante en tres meses de la temporada

cálida de 2013. Cabe mencionar que en el 2013 casi no se observaron rorcuales comunes durante la temporada de cálida, que es cuando ocurren la mayoría de los avistamientos (Tershy *et al.*, 1993), sino que para este año la mayoría de los registros fueron en temporada cálida. Se desconoce si existe una causa inmediata a este evento atípico, aunque también es sabido que la abundancia y conducta de alimentación de los rorcuales comunes varía año con año de acuerdo con los factores ambientales (Ladrón de Guevara, 2007).

Una posible explicación para la concentración de rorcuales comunes en dicha zona y en dicha temporada es que hay lugares del Golfo que concentran mayores cantidades de alimento para el rorcual, entre ellas precisamente se encuentra la Bahía de La Paz, y por eso es que pueden observarse más animales en la zona y durante mayor tiempo (Urbán, 1997). De hecho, la Bahía de La Paz ya se había reportado anteriormente como el área con el valor más alto de abundancia de rorcuales comunes dentro de la zona sur del Golfo y con una permanencia más prolongada (Enríquez, 1996).

### ***Diversidad genética***

Los niveles de diversidad haplotípica y nucleotídica que se obtuvieron para el grupo de rorcuales comunes de la Bahía de La Paz son bajos (0.393 y 0.001, respectivamente), sin embargo, son los más altos que se han reportado para *B. physalus* dentro del Golfo de California (Rivera, en revisión; Medrano, 2006). Este resultado es lógico dado que se encontraron más haplotipos que en los trabajos pasados.

En comparación con otros estudios para distintas especies de cetáceos dentro del Golfo de California, es un valor muy bajo, sin embargo es importante tomar en cuenta que el muestreo no contempla a toda la población. Por ejemplo, la diversidad haplotípica para la ballena jorobada (*Megaptera novaenglie*) es de  $h=0.836$  (Medrano, 2006), para el cachalote (*Physeter macrocephalus*) es de  $h=0.75$  (Valdes, 2011) y para el rorcual tropical (*Balaenoptera edeni*) de  $h=0.740$

(Viloria, 2015). Haciendo una comparación de la diversidad haplotípica para el rorcual común encontrada en el presente trabajo con la encontrada en otras regiones del mundo para la misma especie, sigue siendo un valor bajo (ver Tabla 6). Por ejemplo, Rivera (en revisión) reporta para el Golfo de San Lorenzo, Canadá, una  $h=0.874$ .

En los estudios previos que se han hecho para el Golfo de California se afirma que la población de rorcuales comunes tiene una diversidad genética que se encuentra entre las más bajas reportadas para cetáceos, por lo que se encuentra en un estado de vulnerabilidad (Rivera, en revisión). En efecto, con el presente trabajo se confirma que es una diversidad baja, pero es un poco más alta a la que se había reportado. Dado el incremento observado de  $h$  y  $\pi$  para una  $n$  de 27 individuos tan solo de la Bahía de La Paz, es de suponer que exista mayor diversidad en la población de la que se ha descubierto hasta ahora, por lo tanto, es necesario un muestreo que abarque la población en su totalidad, además de una ampliación y diversificación de las técnicas de análisis para determinar la salud genética de la población de *B. physalus* en el Golfo de California.

**Tabla 6.** Comparación de la diversidad genética obtenida en presente estudio con distintos estudios de la misma población, así como con distintas poblaciones y especies. Todos los trabajos utilizaron como marcador la región control del ADN mitocondrial.

Especie	Población	Referencia	Número de muestras	Número de haplotipos	Diversidad haplotípica h	Diversidad nucleotídica $\pi$
<i>Balaenoptera physalus</i>	Golfo de California	Bérubé <i>et al.</i> , 1998	61	3		0.0007
		Bérubé <i>et al.</i> , 2002	56	3		0.00059
		Rivera (en revisión)	287	4	0.133	0.00052
		El presente trabajo	27	5	0.393	0.0014
	Mar Mediterráneo	Bérubé <i>et al.</i> , 1998	72	7		0.0057
	Atlántico Norte		309	45		0.0113
<i>Eubalaena glacialis</i>	Hemisferio Sur	Archer <i>et al.</i> , 2013	48	41	0.993	
	Pacífico Norte		346	50	0.935	
<i>Eubalaena glacialis</i>	Atlántico Noroeste	Rosembaum <i>et al.</i> , 2000	269	5	0.698	0.006
<i>Megaptera novaeangliae</i>	Golfo de California	Medrano, 2006	11	5	0.836	0.0141
<i>Balaenoptera edeni</i>	Golfo de California	Viloria, 2015	82	12	0.741	0.0113

Aun así, dadas las condiciones de aislamiento y el tamaño reducido que tiene la población del Golfo de California, no sería sorprendente encontrar que la población presenta una diversidad baja. Es común que en poblaciones pequeñas y aisladas, con poco o nada de flujo génico, la diversidad genética sea baja (Torres-Florez *et al.*, 2014).

A pesar de que en el presente trabajo se está comparando una población muy grande (Pacífico Norte) contra una parte de una población (la Bahía de La Paz), fue interesante obtener el coeficiente de diferenciación poblacional entre ambos grupos. Se obtuvo un valor de  $F_{st}$  de 0.221. La interpretación del  $F_{st}$  varía

dependiendo de las características de la especie que se analiza, en este caso, de acuerdo a los resultados obtenidos en otros trabajos para cetáceos, es un valor intermedio-alto de diferenciación para dos poblaciones adyacentes (Rosenbaum *et al.*, 2000; Bérubé *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2014; Vilorio, 2015), lo cual está indicando que el grupo de ballenas de la Bahía de La Paz y la población del Pacífico Norte son dos grupos diferenciados genéticamente.

Bérubé *et al.* (1998) hicieron una comparación similar a la del presente trabajo con la misma especie; ellos contrastan la población del Mar Mediterráneo con la del Atlántico Norte, las cuales presentan tamaños poblacionales distintos y con aislamiento geográfico. Para ese análisis se reporta un  $F_{st} = 0.12$  y un valor de  $G_{st} = 0.11$ .

### ***Heterocigosidad y endogamia***

Partiendo del hecho de que la variabilidad genética es necesaria para que las poblaciones sean viables y puedan sobrevivir a los cambios ambientales, la heterocigosidad se ha utilizado como indicador de esta “salud” genética en una población (Allendorf, 1986), ya que está evaluando si un individuo en determinado locus tiene el mismo alelo heredado tanto de su padre como de su madre (homócigo) o si cada progenitor le heredó un alelo distinto (heterócigo). Los resultados de heterocigosidad muestran que en promedio la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) fue mayor que la esperada ( $H_o=0.626 > H_e=0.552$ ), indicando un mayor número de individuos heterócigos. Paradójicamente, los resultados de heterocigosidad en este trabajo son ligeramente más altos a los de otros trabajos que contemplan toda la población del Golfo (Bérubé *et al.*, 2002), esto puede atribuirse a gran variabilidad de la muestra, de la cual ya se ha hablado previamente.

La información de heterocigosidad corresponde con el resultado del índice de fijación ( $F=-0.095$ ), que derivó en la interpretación de una ausencia de endogamia dentro del grupo. Dichos resultados no eran de esperarse dados los antecedentes

que tiene *Balaenoptera physalus* dentro del Golfo, como son baja diversidad haplotípica y tamaño efectivo pequeño (Bérubé *et al.*, 2002). Esta incongruencia no es trivial y merece atención más allá del presente trabajo, ya que existe únicamente un estudio previo que hizo este tipo de análisis, por lo tanto, es necesario la realización de estudios con un mayor número de muestras y localidades para corroborar y despejar incertidumbres de la información que hasta ahora se tiene.

### ***Estructura genética dentro del grupo***

Los resultados de estructura genética con microsatélites (STRUCTURE) indican dos grupos distintos, lo cual, de primera instancia sugiere que el grupo de la Bahía de La Paz tiene una subestructura genética, sin embargo, es posible hacer otro tipo de suposiciones, como son las siguientes.

Dados los resultados de estructura genética con microsatélites (PCoA y STRUCTURE), la aparición de haplotipos que no se conocían anteriormente y la proximidad del sitio de muestreo a la boca del Golfo, es natural suponer que hay individuos de la población del Pacífico que están entrando al Golfo, es decir, la presencia de migrantes. Aunado a esto, la información del ADN mitocondrial y el análisis de Coordenadas Principales (PCoA) indica que el individuo que porta el haplotipo H4 (individuo 24) es un macho que está muy alejado de la población del Golfo de California. Con dos pasos mutacionales más que el resto de los haplotipos se asocia al haplogrupo de la población del Pacífico Norte. Además, este posible “migrante” parece ser un “añero” (juvenil) y está emparentado únicamente con el individuo 23. No obstante, dicha hipótesis, en la que se sustenta la entrada de individuos al Golfo durante una temporada del año, ya se había planteado previamente y ha sido descartada por una serie de argumentos que Urbán (1997) enlista en un informe sobre la población en el Golfo, que Bérubé *et al.* (2002) confirman con la descripción del aislamiento por datos genéticos y que Rivera (en revisión) sustenta con la baja tasa de migrantes. La evidencia genética que hasta ahora se presenta en los resultados de este trabajo sugiere un

grupo con una mayor diversidad genética de la que se tiene registrada actualmente para el Golfo de California, pero la información que se obtuvo aún es muy limitada para retomar la hipótesis de posibles migrantes temporales.

### ***Parentesco***

Con los resultados de ADN mitocondrial y con los estadísticos descriptivos de microsatélites, los individuos de la Bahía de La Paz se observan como un grupo genéticamente diverso. Por otro lado, los resultados de parentesco muestran que los individuos están tan relacionados que llegan incluso a niveles familiares.

Se encontró un número muy alto de relaciones para un grupo con tan pocos individuos: en total 75 relaciones en una muestra de 27 individuos, las cuales discriminaron en 33 relaciones de hermanos, 28 de medios hermanos y 14 de padres/hijos. Resultó que 93% de los individuos estaban relacionados con al menos otro individuo. Un escenario como este no se había observado antes en otros estudios de poblaciones con la misma especie, como es la población del Atlántico Norte en las aguas de Islandia, donde encontraron únicamente 15 individuos relacionados entre 267 perfiles genéticos comparados (Pampoulie *et al.*, 2013). Este resultado tiene sentido ya que se está hablando de una población mucho más grande y además utilizaron muestras de capturas comerciales que colectaron durante 2009 y 2010. En cambio, puesto que la población del Golfo de California es pequeña y aislada, es de esperarse que haya muchas relaciones de parentesco en un grupo pequeño.

El rorcual común dentro del Golfo tiene comportamientos exclusivos que la diferencian de las demás poblaciones, por ejemplo, los patrones de migración son muy distintos ya que se mueven únicamente dentro del área del Golfo, a diferencia de las demás poblaciones que tienen migraciones con distancias oceánicas. Otro ejemplo es que, por medio de foto-identificación, se observaron tres individuos (un macho y dos hembras) navegando juntos en temporada cálida, y luego se volvieron a observar en temporada fría (Ramírez, 2016).



A pesar de que existe un número considerable de relaciones de parentesco, el índice de fijación indica una ausencia de endogamia, este resultado sugiere que puede tratarse de varios grupos familiares, pero no hay evidencia de cruza endogámicas entre ellos. Con los resultados de parentesco no fue posible determinar si había cruza endogámicas, puesto que únicamente el individuo número uno obtuvo dos relaciones de padre/hijo, una con una hembra y otra con un macho, por lo que se infirió que eran sus padres (ver figura 10, Pág. 37), fuera de este caso, no hay relaciones claras de padre, madre e hijo, por lo tanto, dicho análisis no puede explicar si se están apareando entre familiares.

Se han realizado análisis de parentesco para otras especies de misticetos en distintas regiones del mundo (Pampoulie *et al.*, 2013; Benónisdóttir *et al.*, 2012; Pomilla *et al.*, 2006; Skaug y Givens, 2005; Valsecchi *et al.*, 2002), pero ningún estudio reporta un número tan alto de relaciones entre tan pocos individuos. Cabe destacar que el área geográfica que contemplan dichos estudios es mayor de lo que representa el Golfo de California, y más aún, la Bahía de La Paz, y que en la mayoría de los estudios, las muestras no se tomaron de agrupaciones observadas en campo, sino que fueron muestreos oportunistas entre distintos años, algunas incluso de capturas comerciales.

Valsecchi *et al.* (2002) realizaron un trabajo con rorcual jorobado en donde sí se contemplan y evalúan agrupaciones que se mueven en conjunto, principalmente tríos de madres con cría y un macho, pero no se encontraron relaciones de parentesco significativas entre el macho y la cría, por lo que no puede hablarse de grupos familiares. Por el contrario, en el presente trabajo se observaron relaciones familiares entre individuos que iban juntos. Tan solo en un día se observaron 12 relaciones de parentesco entre 10 individuos.

El hecho de que se hayan encontrado padres y hermanos en una sola agregación sugiere que pueden existir grupos de parientes que se mueven en conjunto y permanecen así durante un tiempo, como familias. Esta estructura social ha sido reportada únicamente para grupos de odontocetos como son los cachalotes y las orcas (Mann *et al.*, 2000). Por el contrario, entre misticetos se sabe que son

generalmente solitarios, con algunas agregaciones temporales, únicamente se observa una estrecha relación en lo que se refiere al cuidado de la cría, que se le atribuye completamente a la madre y una vez que la cría es destetada, no es común volverlas a observar juntas (Mann *et al.*, 2000).

El muestreo de la Bahía de La Paz en 2013 consistió en seis días durante tres meses. En tres de las seis salidas se observaron individuos emparentados en los mismos avistamientos, es decir, se observaron juntos o navegando alrededor, y con los datos genéticos se supo que en su mayoría dichas relaciones eran de hermanos. Sin embargo, no se observaron agrupaciones definidas en campo de individuos emparentados, por lo tanto, no se puede asegurar que ciertos individuos permanecen juntos, únicamente un día en el que se tienen registradas alrededor de 10 ballenas en el mismo avistamiento, se observó que tres de ellas eran hermanos y otras dos se presentan como medios hermanos.

También es importante mencionar las complicaciones de relacionar los resultados de genética con la bitácora de campo, puesto que las salidas no fueron planeadas específicamente para la observación de comportamiento o de estructura social, lo que conlleva a que las descripciones sean muy generales y sintéticas en ese aspecto. Cabe resaltar que entre las anotaciones de campo durante las seis salidas sobresalen cierto tipo de observaciones, como son: “el grupo se juntaba y se separaba”, “son las mismas que en semanas pasadas” y “hay más individuos en la zona”.

Como se indica en la Tabla 5 (Pág. 38), hubo varios “grupos” de individuos que se vieron en un solo día y luego se volvieron a ver en días posteriores, de hecho, hubo un par de individuos que se registraron en 4 de las 6 salidas. Esto no quiere decir que iban juntos o que estaban socializando de alguna manera, pero sugiere que la mayoría de los individuos estuvieron formando un tipo de agrupación no bien definida, sino dispersa dentro de la Bahía de La Paz.

Recapitulando, los resultados sugieren que durante los tres meses de muestreo hubo varios grupos familiares de ballenas que estuvieron presentes en la zona y

formando agregaciones aleatorias en distintos días. Este comportamiento ha sido reportado para cachalotes, en donde se describen grupos estables de generalmente 20 animales que permanecen juntos por periodos de horas o hasta 10 días en un espacio de 1 km aproximadamente (Mann *et al.*, 2000). Pero a diferencia de los grupos de cachalotes, aquí no se observaron agregaciones diferenciadas por sexo, cada agrupación tenía un patrón homogéneo de sexos.

Aunque parece ser un comportamiento similar al que se menciona arriba con los cachalotes, no hay evidencia suficiente para asegurar que los rorcuales comunes en la Bahía de La Paz tienen una organización social definida. Sin embargo, la posibilidad no queda descartada.

A pesar de las múltiples dificultades que presentan los mamíferos marinos para su estudio, como son la observación por periodos largos, madurez sexual tardía, intervalos de nacimiento y la colección del material genético, se necesitan estudios enfocados estrictamente a la sociabilidad, que evalúen tanto el sistema de apareamiento genético (relaciones de parentesco, paternidad) como el sistema de apareamiento social (vinculación afectiva o protección de pareja) para resolver este tipo de incógnitas.

## CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se reportan dos haplotipos nuevos para *B. physalus* en el Golfo de California, sumados a los tres ya reportados, en total se tiene un registro de cinco haplotipos.
- Los niveles de diversidad haplotípica y nucleotídica que se obtuvieron para el grupo de rorcuales comunes de la Bahía de La Paz son bajos (0.393 y 0.001, respectivamente), sin embargo, son los más altos que se han reportado para *B. physalus* dentro del Golfo de California.
- Con una heterocigosidad observada de 0.620 para nueve microsatélites nucleares, se obtuvo un coeficiente de fijación negativo (-0.095) lo cual se relaciona con ausencia de endogamia en el grupo.
- Se encontraron 75 relaciones de parentesco entre un grupo de 27 animales dentro de la Bahía de La Paz durante el verano de 2013, lo cual sugiere que se trató de varios grupos familiares que estuvieron navegando por la zona.
- Durante el muestreo se obtuvieron varias recapturas tanto por foto-identificación como por biopsias, indicando que el grupo se mantuvo junto, al menos durante los tres meses de muestreo, formando agregaciones aleatorias.
- No se logró identificar una estructura social definida debido a la ausencia de registros de subgrupos familiares; como tríos de madre-padre-hijo, ni agregaciones diferenciadas por sexo, o comportamientos que denoten una organización social.
- No se detectó una correlación entre las relaciones de parentesco y el comportamiento social de los individuos o las agregaciones que formaban.

Por lo tanto, es necesario realizar estudios dirigidos a evaluar dicha correlación.

## REFERENCIAS

- Agler, B. A., Schooley, R. L., Frohock, S. E., Katona, S. K. y Seipt, I. E. (1993). Reproduction of photographically identified fin whales, *Balaenoptera physalus*, from the Gulf of Maine. *Journal of Mammalogy* 74(3), 577-587.
- Aguirre-Dugua y González-Rodríguez. (2016). Phylogeographic Approaches to the Study of Plant Domestication, with Special Emphasis on Perennial Plants. En Lira R., A. Casas, J. Blanca. (Eds.), *Ethnobotany in Mexico. Interactions of people and plants in Mesoamerica*. (pp. 319-366). Nueva York, Estados Unidos: Springer.
- Allendorf, F.W. (1986). Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biology* 5, 181-190.
- Archer, F.I., Morin, P.A., Hancock-Hanser, B.L., Robertson, K.M., Leslie, M.S., Bérubé, M., Panigada, S. y Taylor, B.L. (2013) Mitogenomic phylogenetics of fin whales (*Balaenoptera physalus* spp.): genetic evidence for revision of subspecies. *PLoS ONE* 8(5)
- Arnason, U., Gullberg, B. y Widegren, B. (1991). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the Fin Whale, *Balaenoptera physalus*. *Journal of Molecular Evolution*, 33, 556-568.
- Árnason, Ú., Gulberg, A. y Widegren, B. (1993). Cetacean Mitochondrial DNA Control Region: Sequences of All Extant Baleen Whales and Two Sperm Whale Species. *Molecular Biology and Evolution*, 10(5), 960-970.
- Avise, J.C. (1994). Molecular markers, natural history and evolution. Nueva York: Chapman y Hall.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13:729-744.
- Benónisdóttir, S., Skaug, H. J., Glover, K., Elvarsson, B., Vikingsson, G. A. y Pampoulié, C. (2013). Genetic study on close relatedness of common minke whale *Balaenoptera acutorostrata* in the Central and Northeast Atlantic. Conference paper.
- Bérubé, M., Aguilar, A., Dendantó, D., Larsen, F., Notarbartolo Di Sciara, G., Sears, R., Sigurjónsson, J. y Urbán-R, J. (1998). Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales,

*Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758): analysis of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Ecology*, 7, 585-599.

- Bérubé, M. y Palsboll, P. (1996). Identification of sex in Cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, 5, 283-287.
- Bérubé, M., Urbán, J., Dizon, A.E., Brownell, R.L y Palsboll, P.J. (2002). Genetic identification of a small and highly isolated population of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Sea of Cortez, México. *Conservation Genetics*, 3, 183-190.
- Calmus, T. (2008). El Mar de Cortés: un océano incipiente. *Revista Universidad de Sonora*, (20), 4-6.
- Caughley, G. (1994). Directions in conservation biology. *Journal of Animal Ecology*, 63, 215-244.
- Clement, M., Snell, Q., Walke, P., Posada, D. y Crandall, K. (2002). TCS: estimating gene genealogies. Proc 16th Int Parallel Distrib Process Symp 2:184. <http://popart.otago.ac.nz>
- Committee on Taxonomy, (2014). List of marine mammal species and subspecies. Society for Marine Mammalogy (SMM), [www.marinemammalscience.org](http://www.marinemammalscience.org). Consultado el 29 de Julio del 2014.
- CONANP. (2007). Programa de conservación de especies en riesgo (PROCER).
- Conner, J.K. y Hartl, D.I. (1957). A primer of ecological genetics. Sunderland, U.S.A: Sinauer.
- Croll, D.A., Clark, C.W., Acevedo, A., Tershy, B., Flores, S., Gedamke, J. y Urbán, J. (2002). Only male fin whales sing loud songs. *Nature*, 417, 809-811.
- Díaz, C.F. (2006). Abundancia y movimientos del rorcual común, *Balaenoptera physalus* en el Golfo de California. Tesis de Maestría, UNAM, La Paz, México.
- Earl, D. A. y vonHoldt, B.M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

- Eguiarte, L. E., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., González, A. y Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Trabajo realizado durante una estancia en la Universidad de California en Irvine.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews*, 6 (5), 434-445.
- Enríquez, L.M. (1996). Ocurrencia, movimientos, estructura social y tamaño de las agregaciones de rorcual común *Balaenoptera physalus* (Linneaus, 1758) en el Golfo de California, México. Tesis de Licenciatura. UABCS. La Paz, México.
- Fossi, C.M., Marsili, L., Baini, M., Giannetti, M., Coppola, D., Guerranti, C., Caliani, I., Minutoli, R., Lauriano, G., Finoia, M.G., Rubegni, F., Panigada, S., Bérubé, M., Urbán, J. y Panti, C. (2015). Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. *Environmental pollution* 209 (2016), 68-78.
- Evano, G., Regnaut, S. y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8), 2611-2620.
- Gaskin, D.E. (1982). The ecology of whales and dolphins. Heinemann. pp. 459.
- Goto, M., Bérubé, M., Kanda, N., Ishikawa, H., Nishiwaki, S. y Pastene L. A. (s.f.). Phylogenetic analysis of fin whale mtDNA control region sequences world-wide.
- Peakall, R. y Smouse, P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Godoy J.A. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18(1):23-33.
- Guerrero, M., Urbán, J. y Rojas, L. (2006). Las ballenas del Golfo de California. México: INE-SEMARNAT.
- Jackson, J.A., Steel, D.J., Beerli P., Congdon, B.C., Olavarriá, C., Leslie, M.S., Pomilla, C., Rosenbaum, H., Baker, C.S. (2014) Global diversity and oceanic divergence of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Proceedings of the Royal Society of London.B* 281: 3-10



- Jayasankar, P., Anoop, B. y Rajagopalan, M. (2008). PCR-based sex determination of cetaceans and dugong from the Indian seas. *Current Science*, 94 (11), 1513-1516.
- Jefferson, T., Leatherwood, S. y Webber, M. (1993). Marine mammals of the world. Roma: United Nations Environment Programme.
- Kalinowski, S.T., Wagner, A.P. y Taper, M.L. (2006). ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology*, 6, 576-579.
- Kashimada, K. y Koopman, P. (2010). Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development*, 137, 3921-3930
- Kermack, K. (1948). The propulsive powers of blue and fin whales. *Journal of Experimental Biology*, 25(3), 237-240.
- Ladrón de Guevara, P. (2007). Importancia de los eufáusidos en la ecología alimentaria del rorcual común (*Balaenoptera physalus*) en el Canal de Ballenas y Bahía de Los Ángeles, Baja California. Tesis de doctorado, CICESE. Ensenada, Baja California, México.
- Ladrón de Guevara, P., Lavaniegos, B. E. y Heckel, G. (2008). Fin whales (*Balaenoptera physalus*) foraging on daytime surface swarms of the euphausiid *Nyctiphanes simplex* in Ballenas Channel, Gulf of California, Mexico. *Journal of Mammalogy*, 89 (3). 559-566.
- Laist, D. W., Knowlton, A. R., Mead, J. G., Collet, A. S., y Podesta, M. (2001). Collisions between ships and whales. *Marine Mammal Science*, 17(1), 35-75.
- Leatherwood S., Reeves R.R., Perrin W.F., y Evans W. (1988). Whales, Dolphins and Porpoises of the Eastern North Pacific and Adjacent Arctic Waters. A Guide to Their Identification. Dover Publications, Inc., Nueva York.
- Librado, P. y Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lynch, M., & Lande, R. (1998). The critical effective size for a genetically secure population. *Animal Conservation*, 1(1), 70-72.
- Márquez, L.M., Serrato, A. y Cerritos, R. (2014). Secuenciación de fragmentos de ADN. En Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. y Rocha, M.G.

(Ed.), Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos (pp. 231-249). Distrito Federal, México: INECC-SEMARNAT.

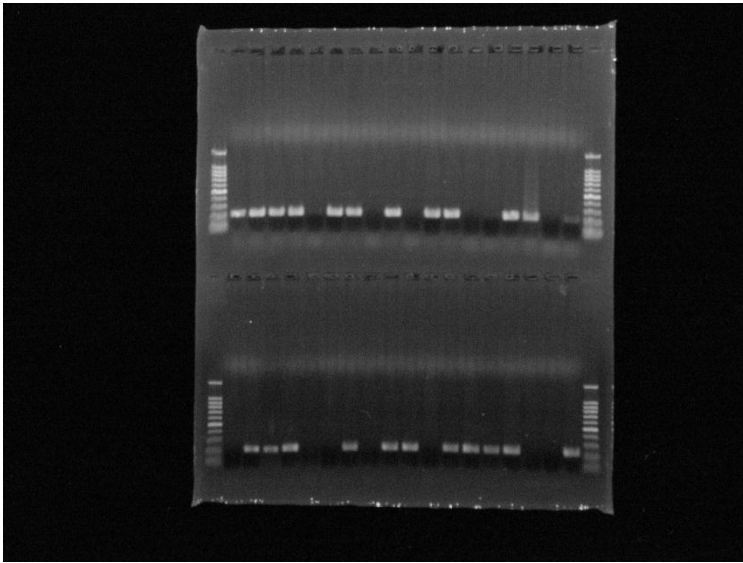
- Medrano, L. (2006). Hacia una dinámica de la mastofauna marina Mexicana: análisis de composición funcional y de algunas estructuras genéticas poblacionales. En Vázquez-Domínguez, E. y Hafner, D.J. (Eds.), *Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro*. (pp. 9-19). Nuevo México, Estados Unidos: New Mexico Museum of Natural History & Science.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. y Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16(3): 1225.
- Moreno, A. (2007). Tamaño efectivo de la población. En Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (Ed.), *Ecología molecular* (pp.63-84). Ciudad de México, México: SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO.
- Muller, K. y Muller J. (s.f.) PhyDE (Phylogenetic Data Editor). Disponible en: <http://www.phyde.de/>
- Murillo-Jiménez J. 1987. Algunas características paleoceanográficas y cuerpos de agua inferidos a partir del registro paleontológico (Radiolaria) en la Bahía de La Paz, BCS, México. Tesis Profesional, Departamento de Geología, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, 70 pp
- Nemoto, T. (1957). Foods of baleen whales in the North Pacific. *The Scientific Reports of the Whales Research Institute*, Tokyo. 12: 33-89.
- Nemoto, T. (1959). Foods of baleen whales in reference to whale movements. *The Scientific Reports of the Whales Research Institute*, Tokyo. 14: 149-290.
- Ojango, J.M., Mpofo, N., Marshall, K. y Anderson-Eklund, L. (2011). Quantitative methods to improve the understanding and utilization of animal genetic resources. En Ojango, J.M., Malmfors, B. and Okeyo, A.M. (Eds). *Animal Genetics Training Resource*, version 3. Uppsala, Suecia. International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya y Swedish University of Agricultural Sciences.
- Palsbøll, P. J., Larsen, F., y Sigurd Hansen, E. (1991). Sampling of Skin Biopsies from Free Raging Large Cetaceans in West Greenland: Development of new Biopsy Tips and Bolt Designs. *Reports of the International Whaling Commission Special Issue Series* (13).

- Piñero, D., Barahona, A., Eguiarte, L., Rocha, A. y Salas, R. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, pp. 415-435.
- Pritchard, J.K., Wen, X. y Falush, D. (2010). Documentation for structure software: Version 2.3. Universidad de Chicago y Universidad de Oxford.
- Pomilla, C. y Rosenbaum, H. C. (2006). Estimates of relatedness in groups of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on two wintering grounds of the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 15, 2541–2555.
- Pampoulie, C., Benónisdóttir, S., Skaug, H.J., Elvarsson, B. y Víkingsson, G. A. (2013). Genetic relatedness of North Atlantic fin whale *Balaenoptera physalus* in Icelantic waters. *IWC Report*, SC/65a/RMP01.
- Pompa, S., Ehrlich, P.R. y Ceballos, G. (2011). Global distribution and conservation of marine mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 33, 13600-13605.
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ramírez, K.M. (2016). Cambios espacio-temporales en los hábitos alimentarios del rorcual común (*Balaenoptera physalus*) en el Golfo de California. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, México.
- Reilly, S.B., Bannister, J.L., Best, P.B., Brown, M., Brownell Jr., R.L., Butterworth, D.S., Clapham, P.J., Cooke, J., Donovan, G.P., Urbán, J. y Zerbini, A.N. (2013). *Balaenoptera physalus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Descargada el 31 de Julio del 2014.
- Rivera, V.E. (s.f.). How vulnerable are the fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Gulf of California? Tesis de Maestría no publicada.
- Rosenbaum, H. C., Brownell, R. L., Brown, M. W., Schaeff, C., Portway, V., White, B. N., DeSalle, R. (2000). World-wide genetic differentiation of Eubalaena: questioning the number of right whale species. *Molecular Ecology*, 9(11)

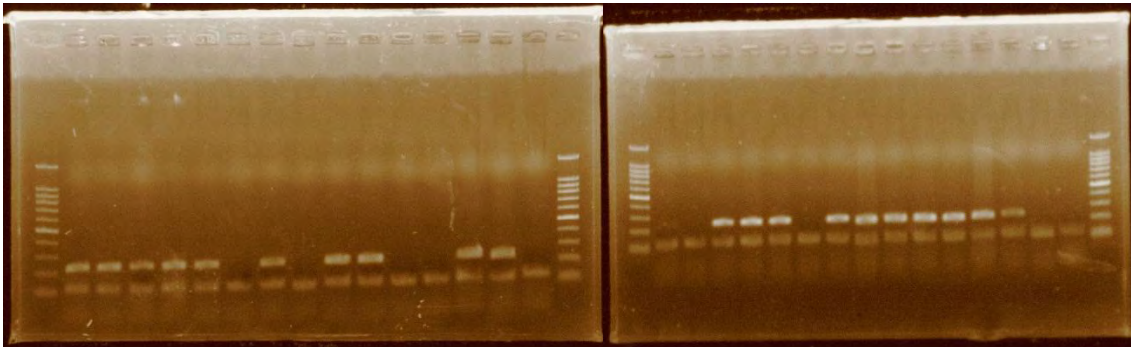
- Sanger F., S. Nicklen y A.R. Coulson. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Semarnat. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010
- Signoret, M. y Santoyo, H. (1980). Aspectos ecológicos del plancton de la Bahía de La Paz, Baja California Sur. Trabajo presentado en el VI Congreso Nacional de Oceanografía. Ensenada, México. Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limología.
- Tershy, B.R., Breese, D. y Strong C.S. (1991). Abundance, Seasonal Distribution and Population Composition of Balaenopterid Whales in the Canal De Ballenas, Gulf of California, Mexico. *Repts of the International Whaling Commission Special Issue Series*(12).
- Tershy, B. R., Urbán-Ramírez, J., Breese, D., Rojas-Bracho, L. y Findley, L. T. (1993). Are fin whales resident to the Gulf of California? *Rev. Inv. Cient.* 1 (No. Esp. SOMMEMA 1). 69-72.
- Urbán, J. (1996). La población del rorcual común *Balaenoptera physalus* en el Golfo de California, México. *Informe final de la CONABIO, proyecto de investigación B040*.
- Urbán, J. et al. (2005). Cetacean Diversity and Conservation in the Gulf of California. En: Carton, J., Ceballos, G. y Felger, R. (Eds.), *Biodiversity, Ecosystems and Conservation in the Northern Mexico*. (pp. 276-296). Oxford University Press.
- Urbán, J. (2014). Inventario fotográfico y diversidad genética de la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) y del rorcual común (*Balaenoptera physalus*) del Golfo de California. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Informe final Proyecto CONABIO No. JF066
- Valdes, M.P. (2011). Identidad genética de las agregaciones de cachalote (*Physeter macrocephalus*) en el Golfo de California: Temporalidad y uso de hábitat. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México.
- Valsecchi, E., Hale, P., Corkeron, P. y Amos, W. (2002). Social structure in migrating humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Molecular Ecology* 11. 507-518.

- Velasco, J. A. (2009). Ambientes geológicos costeros del litoral de la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Tesis de maestría, CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S.
- Verdugo-Díaz, G., Martínez-López, A., Villegas-Aguilera, M.M. y Gaxiola-Castro, G. (2014). Producción primaria y eficiencia fotosintética en Cuenca Alfonso, Bahía de La Paz, Golfo de California, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49 (3), 527-536.
- Vilorio, L. (2015). Estructura poblacional del rorcual tropical (*Balaenoptera edeni brydei*), en el Golfo de California con base en técnicas acústicas y moleculares. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur, México.
- Würsig, B. y Jefferson, T. (1990). Methods of Photo-Identification for Small Cetaceans: *Repts of the International Whaling Commission Special Issue Series(12)*.
- Zoon, R.A. (1987). Sequencing reaction cleanup. *Methods Enzimol.* 152, 25-29.

## ANEXO



**Figura 11.** Fotografía de la amplificación del gen SRY para 36 muestras iniciales. Cada carril representa un individuo. La muestra número 36 (último carril) fue un individuo que se eliminó de los análisis cuando se identificó genéticamente que la biopsia pertenecía a una ballena azul (*Balaenoptera musculus*).



**Figura 12.** Fotografía de la replicación de la amplificación de los genes SRY y ZFY/ZFX para las 30 muestras, que finalmente se redujeron a 27 individuos. Cada carril representa un individuo.

TGAAAAAGTATATTGTACAATAACCACAGGACCACAGTACTATGTCCGTATTGAAAATAACTT  
**GCCTTATTAGATATTATTATGTAATTCGTGCATGTATGTACTTCCACATAATTAATAGCGTCTT**  
**TCCATGGGTATGAATAGATATACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGA**  
**GCAGTTAAAGCCCGTATTAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATTTGTATTAATAGTACA**  
**ATAGCGCATGTTCTTATGCATCCCCAGGTTTATTTAAATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCAT**  
 TAGATCACGAGCTTAGTCAGCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC  
 TTCTCGCACCGGGCCCATTAATCGTGGGGT

**Figura 13.** Secuencia del haplotipo Bp49 (H1) de 411 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial. En negritas se indica el fragmento de 288 pares de bases que se ha usado como referencia en trabajos anteriores.