UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

Identidad Genética de la Población de Ballena Azul (*Balaenoptera musculus*) en el Pacífico Nororiental: Agregaciones Mexicanas.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
D O C T O R E N C I E N C I A S
PRESENTA

LUIS MANUEL ENRÍQUEZ PAREDES

Ensenada, Baja California, México
Abril del 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

Identidad Genética de la Población de Ballena Azul (*Balaenoptera musculus*) en el Pacífico Nororiental: Agregaciones Mexicanas.

TESIS QUE PRESENTA

Luis Manuel Enríquez Paredes

Aprobada por

Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Presidente del Jurado

Dra. Diane Gendron Laniel
Sinodal Propietario

Dra. Sarah L. Mesnick
Sinodal Propietario

Dra. Barbara Taylor
Sinodal Propietario

Dr. Eduardo Santamaría del Angel
Sinodal Propietario

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo de tesis, como el de cualquier otro, involucra a toda una serie de personas e instituciones que, ya sea por que hicieron o por que dejaron de hacer, en conjunto conducen a la culminación del mismo. Desafortunadamente, al no ser el agradecimiento una variable cuantitativa, resulta prácticamente imposible hacer una justa división de la magnitud con la que uno quisiera dar crédito a todos los involucrados. Sin embargo, a pesar de que injustamente me reservaré los desagradecimientos y seguramente pasaré por alto varios agradecimientos, hay a quienes no puedo dejar de expresar mi gratitud.

Al Dr. Jorge de la Rosa Vélez, director de la tesis, le debo el más profundo y sincero agradecimiento. Su gran interés por este trabajo, su inmensa paciencia, invaluables consejos y constante apoyo hicieron posible la realización del mismo. Gracias Jorge por compartir no sólo tu experiencia, tus conocimientos y tu motivante entusiasmo por la labor científica, sino también tu amistad.

A la Dra. Diane Gendron, directora honoraria de la tesis y no solo miembro del comité, por haber depositado toda su confianza en mi al invitarme a participar en su proyecto, facilitándome las muestras y datos producto de tantos años de esfuerzo. Gracias por el tiempo y gran interés que dedicaste a este trabajo, así como por las importantes aportaciones como experta en el conocimiento sobre la ballena azul.

A los Dres. Sarah Mesnick, Barbara Taylor y Adrew Dizon, todos ellos del Southwest Fisheries Science Center, les agradezco su participación como parte del comité de tesis. Su apoyo para el análisis de las muestras en su laboratorio, así como sus acertados comentarios y sugerencias reorientaron y enriquecieron de manera importante esta investigación.

Al Dr. Eduardo Santamaría del Angel por su gran apoyo e interés, no solo como miembro del comité de tesis, sino también como Coordinador del Programa de Maestría y Doctorado de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC.

A mis compañeros de laboratorio, la M.C. Clarissa Galindo y el M.C. Miguel Angel Cervantes por su desinteresado apoyo y sus valiosos consejos metodológicos. Muy particularmente a la Dra. Yolanda Schramm por compartir no sólo el espacio de trabajo, sino su conocimiento y nuestras dudas, además de mostrar en todo momento un entusiasta interés por mi trabajo.

A la Universidad Autónoma de Baja California, al Instituto Politécnico Nacional, a la Whales & Dolphins Conservation Society y al Marine Mammal Center (Japan) por el apoyo financiero que hizo posible este trabajo de tesis.

A Edna Sánchez, Armando Jaramillo, Ernesto Vázquez, Felipe Becerril, Guillermo Férnandez, Jorge López, Susana Camarillo y Nadia Olivares por su invaluable amistad, irrestricta confianza e incondicional apoyo. Sin ustedes esto simplemente no hubiera sido posible, gracias por ser parte de todo.

A John Hyde, Aimee Lang, Carrie DeLuc y Aviva Rosenberg, todos ellos del Southwest Fisheries Science Center, por su asistencia técnica y las facilidades otorgadas para la secuenciación de las muestras. De igual forma, a Ron Wen (Sequegene Inc.) y Kathleen McGuire (California State University Program for Education and Research in Biotechnology) por su eficiente y excelente servicio de secuenciación.

A la Dra. Reyna Castro, del Laboratorio de Ciencias del Mar - DICTUS, así como al M.C. Juan Carlos Méndez y la M.C. Ciry Vega por su apoyo técnico la realización de los cortes histológicos y la preparación de las laminillas. A la Biól. Sara Frontana y a la Ocean. Ligeia del Toro por su ayuda en los últimos intentos de amplificación y electroforesis de las muestras problemáticas. Muchas gracias a todos ellos.

A los Dres. Meredith Gould y José Luis Stephano de la Facultad de Ciencias de la UABC, al Dr. Axayacatl Rocha y a la M.C. Iris Segura por facilitarme el acceso a sus equipos de cómputo para la edición de las secuencias.

A Ciro Arista de la Rosa y Antonio Zamarrón por su esfuerzo y su siempre buena disposición para el trabajo en el campo.

A Verónica Závala, Isabelle Contreras, Ibiza Martínez y Azucena Ugalde por su empeño en la integración y revisión del catálogo de fotoidentificación de ballenas azules de las agregaciones mexicanas. Así mismo, le agradezco a Christian Ortega por compartir conmigo sus resultados sobre fotogrametría aérea en esta especie.

A las Dras. Gisela Heckel y Lydia Ladha por invitarme a trabajar en sus respectivos proyectos de investigación. A pesar de que estos proyectos no tenían relación alguna con mi trabajo de tesis, gracias a ellos obtuve el financiamiento básico para continuar escribiendo. Sin embargo, mucho

más importante fue el hecho de que trabajé al lado de extraordinarios, entusiastas y valiosos compañeros, de los que aprendí y espero seguir aprendiendo mucho.

Un especial agradecimiento a Angélica Arce, al Dr. Roberto Millán y al Dr. Ramón Cajal por su constante esfuerzo, su paciencia y su gran dispocisión al apoyar y facilitar las formalidades administrativas relacionadas con las actividades academicas y con este trabajo de tesis.

Finalmente, un gran agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apoyar económicamente mi formación académica a través de la beca CONACyT-110222.

RESUMEN GENERAL

La identidad genética, las relaciones filogenéticas y la historia demográfica de las agregaciones temporales de ballena azul adyacentes a la Península de Baja California fue determinada a través del análisis de las secuencias nucleotídicas de la región control mitocondrial y la identificación molecular del sexo. El DNA obtenido a partir de muestras de piel descamada y biopsias de individuos fotoidentificados y con un historial de avistamientos, permitió la identificación del sexo y la asignación del linaje materno para 189 individuos. Los niveles de diversidad genética resultaron moderadamente bajos al compararlos con aquellos reportados en poblaciones de especies de misticetos. Sin embargo, en los datos no se encontraron evidencias que indiquen que las intensas capturas comerciales que sufrió esta especie durante la primera mitad del siglo pasado hayan disminuido en forma drástica su diversidad genética. Aunque no se detectó segregación espacial o temporal por sexos o linajes, el análisis filogenético evidenció que en las agregaciones mexicanas ocurren actualmente dos grupos de linajes genéticamente divergentes que aparentemente reflejan dos eventos de colonización independientes. La proporción de sexos en las agregaciones, ligeramente sesgada hacia las hembras, así como presencia de madres con cría para ambos grupos de linajes en aguas del Golfo de California, confirmó la importancia de esta zona como hábitat crítico para la conservación de esta especie. De acuerdo con la estimación genética del tamaño efectivo histórico en las agregaciones mexicanas (4,812 individuos; I.C. 95%; 2,854 – 7,237), el número de ballenas azules que actualmente conforman el llamado stock México/California representa al menos un 50% del nivel previo a la explotación comercial. Sin embargo, debido a que se empleó una aproximación novedosa para el cálculo del tamaño efectivo poblacional y considerando los niveles de incertidumbre de los parámetros biológicos críticos que se incorporan a la estimación, estos números deben ser considerados con la debida reserva hasta que puedan ser validados. Las principales restricciones del modelo propuesto están asociadas con la representatividad de la muestra genética y con el establecimiento preciso de los límites de las poblaciones. La co-ocurrencia espacial y temporal de dos grupos de linajes divergentes en las agregaciones mexicanas deberá ser analizada a través de otro tipo de marcador genético que permita establecer de manera concluyente la intensidad del flujo génico entre estos grupos. Así mismo, es evidente que el muestreo debe ampliarse hacia otras agregaciones para establecer su identidad y la relación que guardan con las agregaciones mexicanas.

GENERAL ABSTRACT

The genetic identity, phylogenetic relationships and historical demography of blue whale Mexican aggregations, which temporally inhabit at Baja California Peninsula surrounding waters, was determinate by mean of mitochondrial DNA control-region sequences and through molecular identification of gender. DNA was obtained as sloughed or biopsied skin samples from photoidentified whales with a resighting history, and allowed sexing and haplotype assignment for 189 individual blue whales. Genetic diversity was found to be relatively low when compared when other misticetes. However, no evidence was found supporting that comercial whaling during the first half of the last century lead to a substantial loss of diversity. Genetic structure tests failed to detect seasonal or geographic segregation of individuals grouped by gender and/or maternal lineales, but interestingly, phylogentic analyses support the presence of two clearly divergent groups of haplotypes in the study area, suggestive of two independent colonization events. The slightly skewed sex ratio towards females, as well as the occurrence of mother and calf pairs for both groups in the Gulf of California, confirms the importance of the area as a critical habitat for the conservation of the species. Historical population effective-size for the Mexican aggregations (4,812 blue whales; I.C. 95%; 2,854 – 7,237) could be indicating that current population size is at 50% of pre-whaling stock levels. Nevertheless, since historical population size was estimated through a novel approach and there is a huge uncertainty at most of the biological key-parameters, these numbers most be interpreted with caution. The main limitations to the proposed model are: sample size and stock identity. The seasonal and geographic co-occurrence of those divergent lineages require of further analyses with other genetic markers which allow us to establish the intensity of gene flow between both groups. In the same way, it is evident that a wider sampling scheme most be implemented in order to determine the relationships between Mexican and other Pacific aggregations of blue whales.

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS i

RESUMEN GENERAL iv

GENERAL ABSTRACT v

CONTENIDO vi
ÍNDICE GENERAL vi
LISTA DE TABLAS ix
LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE ANEXOS xi

PRESENTACIÓN xii

INTRODUCCIÓN GENERAL 1

Comparación de la eficiencia de las estrategias de muestreo semi-invasiva y no invasiva de recolecta de piel de ballena azul en el análisis de marcadores moleculares de DNA. 5
RESUMEN 5
Comparison on the efficiency of semi-invasive and non-invasive sampling strategies for blue whale skin in the analysis of DNA molecular markers. 6
ABSTRACT 6
INTRODUCCIÓN 7
MATERIALES Y MÉTODOS 12
Obtención de las muestras 12
Evaluación del tejido recolectado como fuente de DNA para la detección y análisis de marcadores moleculares 15
Extracción del DNA total 17
Amplificación del DNA mitocondrial 19
Identificación molecular del sexo 21
Secuenciación del dominio hipervariable I de la región control del DNAmt (dHvI-RCmt) 25
Edición de las secuencias 26
Asignación de las muestras a los individuos: Revisión del catálogo de identificación fotográfica. 28
RESULTADOS 29
Evaluación macroscópica y microscópica de las muestras de piel 29
Pruebas de amplificación por PCR para los histotipos definidos 33
Eficiencia en la extracción del DNA, identificación molecular del sexo y asignación de los haplotipos para todas las muestras 34
Eficiencia en la asignación de las muestras a los individuos 38
Evaluación de las diferencias en la descamación entre individuos 38
DISCUSIÓN 41
Consideraciones finales 45

Identidad genética de las agregaciones de ballena azul del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California. 47
RESUMEN 47
Genetic identity of blue whale aggregations from the Gulf of California and the west coast of the Baja California Peninsula. 48
ABSTRACT 48
INTRODUCCIÓN 49
MATERIALES Y MÉTODOS 55
Frecuencia relativa de los haplotipos 55
Proporción de sexos 55
Índices de diversidad genética intrapoblacional 55
Distancia genética entre haplotipos 56
Análisis filogenético 56
Análisis de la estructura poblacional 58
RESULTADOS 60
Diversidad genética 62
Distancia genética y reconstrucción filogenética 62
Reconstrucción filogenética con la adición de grupos externos 75
Representatividad del tamaño de la muestra 77
Estructura genética en las agregaciones mexicanas de ballena azul 79
DISCUSIÓN 87
Consideraciones metodológicas 87
Identidad genética de las agregaciones mexicanas de ballena azul del Pacífico Nororiental 89
Patrones de uso del hábitat en las agregaciones mexicanas 102

Tamaño histórico de las agregaciones de ballena azul del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California inferida a partir de datos moleculares genéticos. 105
RESUMEN 105
Historical population size of blue whale aggregations from the Gulf of California and the west coast of the Baja California Peninsula inferred from molecular genetic data 106
ABSTRACT 106
INTRODUCCIÓN 107
Antecedentes 110
MATERIALES Y MÉTODOS 115
Parámetros demográficos de las agregaciones: Pruebas de neutralidad selectiva y distribución de las diferencias pareadas entre secuencias. 115
Tamaño efectivo histórico en las agregaciones mexicanas de ballena azul 116
Extrapolación al tamaño total de las agregaciones 118
Intervalos de confianza del estimador de tamaño poblacional histórico 119
Simulación de las tendencias demográficas 120
RESULTADOS 121

Tiempos de divergencia 126
Cálculo del tamaño poblacional histórico 128
Simulación de las tendencias demográficas: Comparación de los estimadores de abundancia histórica 131
Estimación del tamaño poblacional histórico en otras poblaciones de misticetos: Evaluación del modelo corregido 134
DISCUSIÓN 136
Consideraciones metodológicas 136
Historia demográfica de las agregaciones mexicanas de ballena azul 140

SUMARIO Y CONCLUSIONES GENERALES 149

LITERATURA CITADA 153

ANEXOS 171

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Muestras de piel de ballena azul incluidas en este trabajo. 14
Tabla II. Variables cualitativas y cuantitativas empleadas en la evaluación de muestras de piel de ballena azul recolectadas por métodos semi-invasivo o no invasivo. 16
Tabla III. Protocolos y patrón de fragmentos esperados para la identificación molecular del sexo por PCR o PCR/RFLP. 23
Tabla IV. Características y estadísticas descriptivas de las variables de evaluación para las muestras de piel de ballena azul agrupadas por histotipo 31
Tabla V. Eficiencia global en la identificación molecular del sexo y la asignación de haplotipos definidos a partir del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial 35
Tabla VI. Secuencia completa de la cadena ligera del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial para *Balaenoptera musculus* 36
Tabla VII. Sitios de segregación que definen los haplotipos mitocondriales de la ballena azul del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California, México. 37
Tabla VIII. Descamación diferencial en muestras del mismo individuo recolectadas en diferentes ocasiones. 39
Tabla IX. Distribución de frecuencias de haplotipos en hembras (F) y machos (M) para cada histotipo. 40
Tabla X. Comparación cualitativa global entre las estrategias de muestreo semi-invasivo y no invasivo para el caso de la ballena azul. 45
Tabla XI. Sitios de segregación filogenéticamente informativos para los haplotipos mitocondriales de ballena azul del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California, México. 61
Tabla XII. Frecuencia relativa (*fi*) de los haplotipos maternos de ballena azul de las agregaciones mexicanas. 61
Tabla XIII. Distancia genética entre los haplotipos maternos mitocondriales para las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental. 63
Tabla XIV. Secuencias homólogas de ballena azul disponibles en la base de datos del GeneBank. 68
Tabla XV. Sitios de segregación para todos los haplotipos mitocondriales de la ballena azul incluidos en el análisis filogenético global. 69
Tabla XVI. Distancia genética entre los haplotipos maternos de ballena azul incluidas en el análisis filogenético global 71
Tabla XVII. Diversidad genética y número de ballenas azules observadas por año y por haplotipo en las agregaciones mexicanas del Pacífico Nororiental. 80
Tabla XVIII. Número de ballenas azules por haplotipo, zona y hábitat presentes en las agregaciones mexicanas del Pacífico Nororiental. 81
Tabla XIX. Número de ballenas azules por haplotipo, clase de edad y sexo, presentes en las agregaciones mexicanas del Pacífico Nororiental. 84
Tabla XX. Diversidad nucleotídica para los clados filogenético de las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental 85
Tabla XXI. Índices de diversidad genética con relación a las recientes estimaciones de abundancia en algunas poblaciones de misticetos. 101
Tabla XXII. Diversidad haplotípica, nucleotídica y pruebas para los descriptores demográficos para los clados filogenéticos 124
Tabla XXIII. Parámetros empleados para la estimación del tamaño histórico con base en datos genéticos para las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental. 130

Tabla XXIV. Parámetros empleados en la simulación Monte Carlo para la estimación del tamaño histórico con base en datos genéticos para las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental..... 131
Tabla XXV. Tendencias demográficas en poblaciones de ballena azul con base en la estimación del tamaño histórico poblacional 133
Tabla XXVI. Estimación del tamaño histórico en algunas poblaciones de misticetos 135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio.. 13
Figura 2. Características macroscópicas de los tipos de piel descamada..... 30
Figura 3. Histología descriptiva de las muestras de piel de ballena azul. 32
Figura 4. Reconstrucción filogenética por mínima evolución para los linajes mitocondriales de las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental.. 64
Figura 5. Red de la mínima distancia para los linajes mitocondriales de las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental.. 66
Figura 6. Reconstrucción filogenética por mínima evolución para todos los linajes mitocondriales reportados en el GeneBank y para los linajes observados en las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental. 73
Figura 7. Red de la mínima distancia (MSN) para los linajes mitocondriales de las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental en el que se incluyeron los haplotipos definidos con base en las secuencias obtenidas del GeneBank. 74
Figura 8. Reconstrucción filogenética interespecífica por mínima evolución en el que se incluyeron las secuencias reportadas en el GeneBank para ballena azul. 76
Figura 9. Simulación de un muestreo aleatorio con reemplazo en una población hipotética de 5000 individuos con 16 haplotipos maternos..... 78
Figura 10. Relaciones filogenéticas entre linajes maternos de ballena azul en las agregaciones mexicanas para los que se han observado hembras lactantes (color verde) o crías..... 86
Figura 11. Reconstrucción filogenética basada en secuencias homólogas de la región control mitocondrial en tres especies de balenoptéridos 91
Figura 12. Reconstrucción hipotética del escenario de flujo recurrente para explicar la distribución actual de linajes maternos. 94
Figura 13. Abundancia relativa de haplotipos maternos en las agregaciones mexicanas ponderada por el esfuerzo de búsqueda en relación a los eventos El Niño Oscilación Sureña (ENOS).. 104
Figura 14. Distribución de frecuencia del número de diferencias en las comparaciones pareadas de los linajes maternos en las agregaciones mexicanas de ballena azul. 123
Figura 15. Distribución de haplotipos por clases de frecuencia. 125
Figura 16. Reconstrucción filogenético por mínima evolución (ME) para 219 haplotipos maternos de misticetos.. 127
Figura 17. Innovaciones del modelo para estimar el tamaño efectivo histórico. 137

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Secuencias blanco para los cebadores y enzimas de restricción empleados en la identificación molecular del sexo. 172
Anexo B. Secuencias del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial de Balaenoptera musculus que definen los haplotipos de las agregaciones mexicanas. 175
Anexo C. Ballenas azules fotoidentificadas en las que se identificó molecularmente el sexo y el linaje materno. 178
Anexo D. Secuencias homólogas para la región control mitocondrial empleadas en el análisis filogenético para todas las especies de misticetos reportadas en el GeneBank. 184
Anexo E. Alineamiento efectuado mediante el programa McAlign para los haplotipos mitocondriales en misticetos. 193
Anexo F. Tendencia demográfica del Stock de ballena azul del Pacífico Nororiental 1909-2005 (tasa neta de crecimiento anual 2%). 197

PRESENTACIÓN

Este trabajo de tesis forma parte de un proyecto de investigación que, por poco más de 12 años, ha estudiado a las ballenas azules en el Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California. Dicha investigación ha generado información sobre la abundancia, distribución, alimentación, reproducción, comportamiento, uso del hábitat y la estructura poblacional, y representa la suma de esfuerzos que la Dra. Diane Gendron, algunos otros investigadores, varios estudiantes, técnicos y voluntarios han dedicado al conocimiento de la especie. Gran parte de los datos estan condensados en un catálogo de individuos fotoidentificados que contiene el historial de más de 400 ballenas azules y que ha permitido dar un seguimiento continuo de su población.

Cuando fui invitado a formar parte de este estudio, se me propuso evaluar los niveles de variabilidad genética y la proporción de sexos para determinar la estructura de las agregaciones mexicanas de la especie en el Pacífico Nororiental. El muestreo se extendía por un periodo de casi 7 años, representados por poco más de 300 muestras de piel de ballenas azules fotoidentificadas y con un historial individual de avistamientos de más de 10 años; parecía una oportunidad única.

Dado el avance tecnológico y la amplia gama de marcadores con los que se cuenta hoy en día para el estudio genético de las poblaciones, consideré que obtener DNA y analizar unos cuantos marcadores moleculares no debería de representar mayor problema. Daba por hecho que podrían obtenerse resultados a corto plazo y que la interpretación de los mismos se facilitaría en gran medida por el cúmulo de información con que se contaba. Nada más lejos de la realidad.

En muchas muestras la extracción de DNA resultó problemática, algunos de los extractos de DNA no generaban productos de amplificación en las reacciones de PCR, y en aquellos que amplificaron exitosamente los resultados no eran reproducibles. Conforme se fueron analizando las muestras hubo que dar marcha atrás en repetidas

ocasiones, reevaluar la metodología e implementar nuevas estrategias con el objeto de obtener resultados consistentes en el laboratorio.

Recapitulando hoy, después de casi 6 años, solo puedo decir que esta no fue una oportunidad única.... Lo sigue siendo. Los resultados obtenidos plantean quizá más interrogantes que respuestas, pero señalan la dirección hacia la que las nuevas preguntas deberán ser orientadas.

Aunque a la vista de muchos la presente tesis podría representar una considerable cantidad de trabajo y de datos, gran parte de la información aquí generada tiene un carácter colateral y de apoyo a los no tan numerosos resultados. El escrito se encuentra organizado en tres capítulos, relativamente independientes, que reflejan las etapas en las que se fue realizando el trabajo y se fueron generando las bases para desarrollar las etapas subsecuentes.

En un primer capítulo se discuten las limitaciones, ventajas y desventajas de las estrategias empleadas en este estudio para la recolecta de muestras. Esto a través de la evaluación macroscópica y microscópica del tejido, así como de la comparación de la eficiencia en la amplificación de marcadores genéticos en función de la calidad y la cantidad de DNA obtenida.

El segundo capítulo integra la información molecular, generada a partir del análisis del polimorfismo en los marcadores amplificados (región control mitocondrial y una región específica de los cromosomas sexuales que permite la identificación del sexo), con los datos del historial de avistamientos de los individuos fotoidentificados. Aquí se discuten los resultados de las estimaciones de variabilidad genética y las relaciones filogenéticas entre los linajes maternos presentes en aguas circundantes de la Península de Baja California, y adicionalmente, así como con los que han sido reportados para otras partes del mundo. Asimismo, se analiza la distribución espacial y temporal de los linajes con el objeto de evaluar el grado de diferenciación genética entre los individuos que conforman las agregaciones.

El tercer y último capítulo presenta un ejercicio en el que, con el objeto de estimar los cambios históricos en el tamaño poblacional de las agregaciones mexicanas, se integra la información disponible sobre la historia demográfica y algunos parámetros biológicos poblacionales, con los datos moleculares obtenidos en este estudio.

Finalmente, a manera de sumario, se retoman e integran los resultados más relevantes de cada capítulo y se discuten brevemente a la luz de los planes de manejo y recuperación que se han propuesto para la especie.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Durante las últimas tres décadas, el estudio de las poblaciones de los grandes cetáceos a través de la identificación fotográfica y las observaciones de campo a largo plazo ha incrementado notablemente nuestro conocimiento sobre aspectos relacionados con el comportamiento social, los patrones de migración y la demografía de estas especies. La información así generada ha sido la base para delinear las estrategias de manejo y conservación de estos mamíferos marinos, cuyas poblaciones estuvieron sujetas a una intensa explotación comercial que redujo de manera importante sus números. Sin embargo, la efectiva conservación de estos recursos depende de nuestra habilidad para discriminar con precisión entre poblaciones genéticamente diferenciadas, ya que hemos aprendido que la delimitación de stocks, o unidades de manejo, basadas exclusivamente en características morfológicas o en la demografía pueden no ser adecuadas (ver Hoelzel 1991).

Con la introducción de las técnicas genéticas moleculares al estudio de las poblaciones de cetáceos y de muchas otras especies, la última década se ha caracterizado por una acelerada recopilación de datos genéticos que han permitido inferir la historia evolutiva y los patrones filogeográficos de las especies y sus poblaciones. De igual forma, mediante el estudio de la distribución y el flujo de genes en la escala espacial y temporal, se ha obtenido importante información sobre las estrategias reproductivas y se han resuelto problemas taxonómicos y ecológicos que difícilmente podrían haber sido evidenciados a corto plazo a través de las observaciones de campo (ver revisiones por Dover 1991, Lambert y Millar 1995, Haig 1998). Mucho más recientemente, con la incorporación de nuevas tecnologías electrónicas, el marcaje por radio o por satélite, así como los estudios bioacústicos, han potencializado un seguimiento continuo de algunas especies, aportando datos adicionales sobre la distribución, las rutas y los destinos migratorios. En conjunto, toda esta serie de estudios han posibilitado la delimitación de stocks y una estimación confiable de los niveles actuales de abundancia para un buen número de poblaciones de diversas especies de cetáceos (ver Hoelzel *et al.* 1991, Dizon *et al.* 1997).

Sin embargo, a pesar de todos estos avances, en algunas especies la información con la que contamos es aún limitada; tal es el caso de la ballena azul. Aun cuando su gran tamaño hizo de esta especie el blanco principal de la industria ballenera moderna (Holt y Young 1991), para cuando se evidenció la relevancia de los datos biológicos básicos en el estudio de las tendencias demográficas y el establecimiento de un manejo sustentable, sus poblaciones habían sido ya drásticamente reducidas. Debido a que la captura de esta especie era ya poco redituable, la cantidad de datos sobre sus poblaciones es escasa.

Las ballenas azules tienen una distribución cosmopolita y típicamente oceánica, pero realiza migraciones estacionales entre sus zonas de alimentación y sus zonas de reproducción y crianza (ver Kellogg 1929, Omura 1955, Lockyer y Brown 1981, Yochem y Leatherwood 1985). Sin embargo, aunque algunas de sus zonas de alimentación son bien conocidas, no se han encontrado sus zonas de reproducción y se ha sugerido que realizan sus actividades de reproducción en aguas oceánicas y de forma no gregaria (Tomilin 1967). Ante tal panorama, no es de sorprender que mucha de la información sobre la distribución y la biología reproductiva de la especie se restringa a los escasos datos de las bitácoras de captura. No se conocen con precisión ni su longevidad, ni su tasa de reproducción, así como también muchos otros parámetros demográficos críticos para la evaluación de sus niveles de recuperación.

En el Pacífico Nororiental la distribución de la ballena azul comprende desde la región sur de las Islas Aleutianas y el Golfo de Alaska (Rice 1974) hasta la región del Domo de Costa Rica (Reilly y Thayer 1990). Su distribución en aguas mexicanas es claramente temporal, entre noviembre y julio, donde la abundancia relativa de la especie parece coincidir con los cambios estacionales en la productividad primaria a lo largo de la región costera de la Península de Baja California (Gendron 2002). Las principales agregaciones ocurren durante el invierno en la porción sudoccidental del Golfo de California y el Domo de Costa Rica, durante la primavera en la costa occidental de la Península de Baja California y durante el verano en la costa de California (ver Gendron 2002, Calambokidis y Barlow 2004).

Las ballenas azules del Pacífico Nororiental representan el remanente poblacional más grande de la especie a nivel mundial. A estas se les ha reconocido como un stock que, aunque fue considerablemente reducido en sus números por las capturas comerciales, ha mostrado signos de recuperación (ver Perry *et al.* 1999). Lo anterior, aunado a que el Golfo de California es la única agregación invernal de la especie en la que ocurren frecuentemente madres con cría (ver Gendron 2002), resalta la importancia de la zona como un hábitat crítico para la crianza y probablemente para la reproducción de la especie. Por ello, el presente trabajo se planteó con el objeto evaluar los niveles de diversidad genética y la historia demográfica de las ballenas azules que ocurren en aguas adyacentes a la Península de Baja California a través de marcadores moleculares de DNA.

La información genética sobre las ballenas azules del Pacífico Nororiental, así como de otras partes del mundo, es escasa. Resalta solamente el trabajo de Conway y colaboradores (2003), quienes a través de un análisis preliminar de la variación genética nuclear en muestras de diferentes regiones del mundo, sugieren que las agregaciones del Pacífico Oriental conforman un grupo evolutivo independiente de aquellas agregaciones que ocurren en el Océano Índico, Antártica y el Atlántico Norte. No obstante, aun cuando la mayor parte de las evidencias parecen sustentar la existencia de un solo stock en el Pacífico Nororiental (ver Stafford *et al.* 1999, 2001; Calambokidis *et al.* 1995, Chandler *et al.* 1999), los datos bioacústicos más recientes plantean la posibilidad de que las agregaciones de ballena azul del Pacífico Norte, así como las del Océano Índico y Antártica presenten cierto nivel de mezcla (ver Stafford 2003, Stafford *et al.* 2004). Lo anterior evidencía que la relación entre las agregaciones del Pacífico Nororiental con el resto de las agregaciones del Pacífico permanece incierta.

Aun más controversial resulta el hecho de que los datos morfométricos obtenidos mediante fotogrametría aérea en aguas de California (Gilpatrick y Perryman 1999, Gilpatrick *et al.* 1999), contrastan con los obtenidos en aguas costeras de la Península de Baja California (Ortega-Ortíz 2004) y plantean la posible ocurrencia de más de un grupo genético de ballenas azules en la zona.

En el presente estudio se optó, por analizar la variación genética mitocondrial en función de que representa dos claras ventajas sobre los marcadores genéticos nucleares. En primera instancia, debido a que el genoma mitocondrial se replica clonalmente, en ausencia de recombinación, las relaciones filogenéticas entre las secuencias mitocondriales reflejan directamente la historia de los linajes maternos que conforman una población (Brown y Gibson 1983, Wilson *et al.* 1985, Hoelzel *et al.* 1991). En segundo lugar, ya que el tamaño efectivo de la población para los genomas mitocondriales es cuatro veces menor al de los genes autosómicos nucleares, la deriva génica tiene un efecto mayor en los linajes mitocondriales, lo que favorece una tasa más acelerada de diferenciación local en las poblaciones. A la vez, esta acelerada diferenciación puede verse favorecida por el hecho de que la tasa evolutiva del DNA mitocondrial es generalmente de cinco a diez veces mas rápida comparada con la del DNA nuclear codificante de muchas especies de mamíferos (ver Wilson *et al.* 1985, López *et al.* 1997, Pesole *et al.* 1999, Avise 2000).

Es así como, a través del análisis de la distribución espacial y temporal de los linajes maternos, su filogenia y la identificación molecular del sexo, el presente trabajo se orientó hacia el esclarecimiento de la identidad genética de los individuos que conforman las agregaciones mexicanas de ballena azul del Pacífico Nororiental.

1 Comparación de la eficiencia de las estrategias de muestreo semi-invasiva y no invasiva de recolecta de piel de ballena azul en el análisis de marcadores moleculares de DNA.

RESUMEN

La calidad y la cantidad de DNA que pueden obtenerse de una muestra de tejido son factores limitantes en la detección de marcadores genéticos en estudios relacionados con la ecología molecular. Los avances tecnológicos en el campo de la biología molecular, muy particularmente aquellas relacionadas con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han promovido el uso del muestreo no invasivo para el estudio de especies raras o en las que su comportamiento o hábitat las hace relativamente inaccesibles al muestreo. Tal es el caso de los cetáceos. En el presente capítulo se evaluó el rendimiento en la extracción y la calidad del DNA obtenido a partir de muestras de piel de ballena azul recolectadas de forma no invasiva (piel descamada) y semi-invasiva (biopsia). Esto con el objeto de determinar la eficiencia terminal del muestreo no invasivo en identificación molecular del sexo y la asignación de linajes maternos para el análisis ulterior de la identidad genética y la estructura de las poblaciones de esta especie. Se realizó una comparación morfología macroscópica e histológica de las muestras que evidenció que en la ballena azul la descamación involucra casi exclusivamente láminas de queratina y que en muy pocos casos se extiende hacia las capas inferiores de células epidérmicas. En contraste, una biopsia recupera no solo céluas de todas los estratos de la epidermis, sino tejido adiposo subcutáneo. La cantidad y la calidad del DNA obtenido de la piel descamada fueron significativamente más bajas que en las biopsias y estas diferencias se reflejaron de forma directa en la eficiencia en la detección de los marcadores genéticos por PCR y en la calidad de las secuencias obtenidas. A pesar de la eficiencia terminal mucho más baja de las muestras de piel descamada, estas contribuyeron de manera importante en la asignación del haplotipo y la identificación del sexo en individuos para los que no se obtuvieron biopsias. Sin embargo, el número de ensayos que fueron necesarios para obtener resultados confiables a partir de las muestras de piel descamada, implicó necesariamente un mayor costo, tiempo y esfuerzo. Lo anterior, aunado al reducido número de análisis moleculares géneticos o no genéticos que podrían efectuarse en un futuro con las muestras de piel descamada, contrasta con la potencial diversidad de moléculas que pueden ser obtenidas de las biopsias. Considerando que no existe evidencia que indique algun tipo de daño o alteración severa del comporamiento al obtener una biposia, los resultados aquí obtenidos, permiten concluir que la recolecta de biopsias debe ser considerada como la estrategia primaria de muestreo para la obtención de datos moleculares a partir del DNA en esta especie

1 Comparison on the efficiency of semi-invasive and non-invasive sampling strategies for blue whale skin in the analysis of DNA molecular markers.

ABSTRACT

The yield and quality of DNA recovered from tissue samples are limiting factors for the detection of genetic markers in molecular ecology studies. Technological innovations in molecular biology, particularly to the polymerase chain reaction (PCR), has lead to the extensive use of non invasive sampling strategies for studies on rare, evasive or behavioral problematic species for which direct sampling could represent a handicap. Cetaceans are such of these cases. Through an evaluation of the yield and the quality of DNA recovered from blue whale sloughed (non-invasive method) and biopsy (semi-invasive) skin, this chapter analyzes the overall efficiency of such kind of samples in the detection of molecular markers for gender identification and maternal lineage assignation in a study of population genetic identity and structure of the species. Macroscopic and histological description of the tissue revealed that blue whale sloughs almost exclusively keratin layers, which rarely includes cells from underlying epidermis. In contrast, biopsy skin samples recovered, besides the external keratin layers, cells from all epidermis strata and subcutaneous blubber. DNA yield and quality from sloughed skin were significantly lower than for biopsy sampling, those differences were directly related to the detection of the molecular markers through PCR and sequencing. Despite the lower efficiency of the sloughed skin samples, these contributed importantly for the identification of gender and lineage assignment in several individuals for which no biopsy was obtained. However, the number of essays that were conducted on sloughed tissue to ensure the reliability of the results, represented higher costs, as well as time and effort. Moreover, considering that the number of future molecular genetic and non-genetic essays which could be conducted on sloughed tissue will be strongly limited by the DNA yield and the absence of other sources of molecules, contrasts with the yields and the diversity of molecules that could be obtained from epidermal cells and blubber of the biopsy skin samples. Since there is no evidence of severe injuries or strong and permanent behavioral response to skin biopsing, overall results clearly point out to the use of semi-invasive sampling as the primary sampling strategy for DNA molecular ecology studies on blue whale.

INTRODUCCIÓN

Hace un par de décadas, cuando se desarrolló la tecnología para la amplificación del DNA por medio de la reacción en cadena con la polimerasa (PCR[1]), se desató una revolución en todos los campos de biología, particularmente en aquellas disciplinas relacionadas con la genética evolutiva (ver Parker *et al.* 1998, Sunnucks 2000). Con tal innovación tecnológica se promovió una acelerada y creciente disponibilidad de marcadores moleculares de DNA con gran poder de resolución para el análisis de la variabilidad genética. Hoy en día, con la tecnología automatizada para la secuenciación de DNA y el impresionante potencial de la rama de la bioinformática, se ha simplificado enormemente la obtención de datos moleculares y se han generado poderosas herramientas de simulación matemática para su análisis. Prácticamente no existe rama de la biología que no se haya sometido ante este nuevo régimen caracterizado por un intenso uso de los marcadores moleculares de DNA.

A la luz de esta amplia gama de herramientas moleculares, disciplinas como la biología de poblaciones, la genética evolutiva y la conservación de los recursos naturales han convergido en lo que hoy se conoce como la ecología molecular. En esta disciplina integral se estudian y se modelan los mecanismos biológicos, incluyendo los antropogénicos, mediante los cuales una variante génica portada por un individuo se establece en una población, permanece o se desplaza a otra, trayendo como última consecuencia la acumulación de cambios en el acervo de genes de las poblaciones, diferenciándolas y distribuyendo heterogéneamente la biodiversidad en el tiempo y en el espacio.

Aunque parezca sorprendente, con todo y los avances tecnológicos y las herramientas analíticas que se tengan a la mano, el poder de la molécula de DNA para trazar esta ruta a través de las poblaciones, del tiempo y del espacio, reside exclusivamente en sus

[1] La reacción en cadena por medio de la polimerasa (PCR), es la técnica más ampliamente usado para generar copias de regiones específicas (uno o varios genes) de la cadena de DNA, a los que llamamos marcadores genético de DNA y sobre los que se evalua la variabilidad genética. En un sólo ensayo de PCR, muestras de tejido tan pequeñas como un solo cabello o una gota de saliva, son suficientes para que a partir del DNA contenido en las células sea amplificado billones de veces, lo que permite disponer de suficiente marcador genético para efectuar diversos estudios.

propiedades biofísicas. Debido a esto, resulta obvio que existen importantes limitantes asociadas directamente con la calidad del DNA que será empleado en el análisis genético, por lo que la naturaleza y la preservación de la muestra son aspectos críticos que deben considerarse al realizar un estudio que involucre marcadores moleculares.

Dentro de la amplia variedad de métodos que se han diseñado para la obtención de muestras para el estudio de poblaciones animales en vida libre a través de marcadores genéticos[2], los métodos no destructivos han sido los más extensamente empleados. Gracias a las virtudes del PCR, los métodos no invasivos, han adquirido gran importancia en el campo de la biología enfocada a la conservación o cuando los estudios incluyen algún componente etológico. El muestreo no invasivo ha permitido conducir estudios genéticos de diversas especies animales en su hábitat natural, a partir de cantidades mínimas de tejido, obtenidas sin la necesidad de capturar, manipular o incluso observar a los individuos (ver Taberlet *et al.* 1999). Más importante aún resulta el hecho de que un muestreo no invasivo posibilita el estudio de especies evasivas o raras, así como de aquellas que presentan dificultades técnicas en cuanto a su accesibilidad o su captura; tal es el caso de los cetáceos.

En este capítulo se compara la eficiencia en la obtención de datos moleculares de las agregaciones mexicanas de ballena azul a partir de un muestreo no invasivo (piel descamada) con respecto al método convencional de muestreo semi-invasivo (biopsias).

Antecedentes

Los cetáceos permanecen en la superficie del mar sólo unos segundos, y en ocasiones se muestran evasivos a las embarcaciones, por lo que el único tejido disponible para la obtención de muestras a través de métodos no destructivos es la epidermis. Para recolectar piel en estas especies se han diseñado flechas modificadas que pueden ser

---

[2] El muestreo destructivo implica el sacrificio de los animales. En el muestreo invasivo los animales son capturados temporalmente, muestreados y liberados, lo que generalmente altera su comportamiento y puede provocar la muerte incidental. En el muestreo semi-invasivo las muestras se toman a distancia (p.e. dardos) y solo ocasionalmente se altera su comportamiento. Finalmente, en el muestreo no invasivo la muestra se obtiene de forma indirecta sin alterar a los animales.(p.e. heces, restos de plumas o pelo en los nidos).

disparados a distancias de entre 10 y 20 m mediante una ballesta o un rifle (p.e. Lambersten 1987, Palsbøll *et al.* 1991). Estos dispositivos de muestreo semi-invasivos permiten recuperar una pequeña biopsia de piel y tejido adiposo subcutáneo, aparentemente sin causar un trauma severo en los animales. Algunos estudios que han evaluado la respuesta a este tipo de muestreo en cetáceos misticetos concluyen que, más allá de la reacción inmediata al disparo, no existe evidencia que indique efectos a corto o largo plazo en el comportamiento, independientemente de la especie, la edad y el sexo (p.e. Brown *et al.* 1991, Weinrich *et al.* 1991, Gauthier y Sears 1999).

La recolecta oportunista de piel descamada[3] (p.e. Amos *et al.* 1992) o heces (p.e. Parsons *et al.* 1999), evidenció que en los cetáceos podía obtenerse DNA a partir de este tipo de muestras. Esto promovió que en algunas especies se implementara la recolecta no invasiva de piel como estrategia de muestreo alternativa para reducir al mínimo la posibilidad de alterar su comportamiento. Estudios posteriores demostraron que el DNA contenido en la piel descamada tenía el potencial para la detección de ciertos marcadores moleculares (p.e. Amos *et al.* 1992, Clapham *et al.* 1993, Gendron y Mesnick 2001). No obstante, los estudios poblacionales en los que se ha incluido este tipo de muestras son escasos y muy restringidos en la escala estacional y geográfica (p.e. Richard *et al.* 1996, Valsecchi *et al.* 1998).

Una de las principales razones por las que la recolecta de piel descamada no ha sido extensivamente empleada en estudios genéticos poblacionales, está asociada con problemas inherentes al comportamiento de las especies blanco. Aunque existe evidencia histológica de que la descamación no es igual en todas las especies de cetáceos (S. Southern[4], com. pers.), se desconoce si la descamación ocurre en todos los individuos, a las mismas tasas y homogéneamente en toda la superficie del cuerpo. En el cachalote (ver Whitehead *et al.* 1990) y en la ballena jorobada (ver Clapham *et al.* 1993), por ejemplo, se ha observado que la descamación es común sólo en los individuos involucrados en comportamientos sociales activos (p.e. saltos, roces o

[3] La epidermis de los cetáceos tienen una anatomía especializada (ver Ridgway y Carder 1993) por lo que sus láminas epiteliales externas son continuamente descamadas y regeneradas para mantenerla hidrodinámicamente funcional (Haun y Hendricks 1990). Estas láminas son de tamaño variable, y pueden recolectarse fácilmente de la superficie del mar debido a que permanecen flotando por algunos segundos.

interacciones agresivas). Esto trae como consecuencia importantes limitaciones para el uso del muestreo no invasivo en estudios poblacionales. El muestreo podría estar sesgado hacia un grupo particular de individuos, o a un área y temporada específica (p.e. machos adultos en zonas invernales de reproducción, descamación diferencial asociada con la temperatura del agua). Por otra parte, la asignación de la muestra de piel a un individuo específico se dificulta si hay varios individuos interactuando en la zona, limitando el total de muestras correctamente asignadas (ver Valsecchi *et al.* 1998).

Otras limitaciones frecuentemente reportadas para muestras obtenidas de forma no invasiva, se encuentran asociadas con la baja cantidad de DNA y la pobre calidad (degradación) del mismo, así como con la presencia de compuestos inhibidores del PCR (p.e. melaninas[5]); factores intrínsecos a la naturaleza de la muestra que restringen la amplificación del marcador genético durante el PCR, reduciendo el número de muestras disponibles para el análisis (ver Taberlet *et al.* 1999). Particularmente grave resulta el hecho de que, cuando se amplifican simultáneamente dos o más marcadores genéticos en muestras con baja calidad o cantidad de DNA, pudiese estar ocurriendo la amplificación estocástica de sólo alguno de estos marcadores (*allelic dropout*[6]), lo que implicaría una subestimación de su frecuencia real en la población.

Ante este panorama parecería que el análisis de la variabilidad genética a través de marcadores moleculares obtenidos de muestras de piel descamada en cetáceos está fuera de contexto. Sin embargo, de los resultados del trabajo de Gendron y Mesnick (2001) se desprenden suficientes evidencias que sugiere que, al menos para el caso particular de las ballenas azules que ocurre en aguas del Golfo de California y la costa

---

[4] Sarka Southern. Southwest Fisheries Science Center, NOAA- Fisheries, La Jolla, California 920387, USA.

[5] Las melaninas son biopigmentos poliméricos sintetizados en el tejido epidérmico de los vertebrados. Por sus propiedades bioquímicas tienden a co-precipitar junto con el DNA durante la extracción. Poseen residuos carboxílicos libres que los hacen afines a ciertas moléculas cargadas, por lo que su actividad inhibidora durante el PCR se atribuye a su interacción con las polimerasas de DNA.

[6] La amplificación estocástica o diferencial del marcador genético (*allelic dropout*) se explica en términos de la diferencia en la abundancia relativa de los marcadores en la muestra. La probabilidad de que uno de los marcadores sea amplificado preferencialmente con respecto al otro, se incrementa considerablemente cuando la calidad y la cantidad del DNA son muy bajas.

occidental de la Península de Baja California, es factible realizar análisis genéticos poblacionales a partir de muestras no invasivas. Esta autora realizó un muestreo sistemático de piel descamada y reporta que la descamación ocurrió en el 95% de las ballenas azules estudiadas, y que en el 92% de los casos fue posible efectuar la recolecta.

Debido a que a la ballena azul se le encuentra generalmente sola o en parejas, Gendron (2002) asignó con una eficiencia del 86% la muestra a cada individuo; eficiencia mucho mayor al 11% reportado en ballena jorobada (Valsecchi *et al.* 1998). Adicionalmente, al comparar la cantidad de tejido descamado muestreado en cada individuo, no encontró diferencias asociadas con la temperatura superficial del mar, la distancia a la costa o entre parejas madre-cría e individuos solitarios. Por otro lado, Gendron y Mesnick (2001) encontraron que la cantidad y la calidad del DNA que puede obtenerse de la piel descamada de ballena azul fue suficiente para amplificar marcadores moleculares para la identificación del sexo, y sugieren que tanto la naturaleza de la muestra, como el método de preservación que emplearon, permitirían el análisis de marcadores moleculares en dichas muestras.

Por lo anterior, este capítulo tiene como objetivo validar el uso de la piel descamada de ballena azul para el análisis molecular de marcadores genéticos. Para ello se planteó el análisis macroscópico y microscópico del tejido recolectado, así como la evaluación de la cantidad y la calidad de DNA obtenido a partir de muestras no invasivas y muestras semi-invasivas. Los resultados se contrastan en términos de la eficiencia global de las muestras después de la amplificación por PCR de marcadores moleculares nucleares y mitocondriales empleados para la identificación molecular del sexo y para el análisis de la variabilidad genética, respectivamente. Por último, se discuten las ventajas y desventajas del muestreo semi-invasivo y el muestreo no invasivo, orientadas a su aplicación en futuros estudios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Las muestras de piel de ballena azul empleadas en este estudio fueron recolectadas en el Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California (Fig. 1). La mayoría de estas muestras fueron recolectadas en el periodo 1996-2004 por la Dra. Diane Gendron[7] y el personal del Laboratorio de Ecología de Mamíferos Marinos del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN). Sin embrago, algunas muestras recolectadas en el Golfo de California (1994-2000) por el Programa de Investigación de Mamíferos Marinos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (PRIMMA-UABCS), donadas a la colección de la Dra. Gendron, también se incluyeron en este trabajo.

En la Tabla I se detallan las fuentes, la fechas, la zonas de recolecta y los métodos de recolecta de muestras incluidas en este trabajo. Todas estas muestras fueron recolectadas bajo el amparo de los permisos de pesca de fomento SEMARNAP 071197-213-03, 050199-213-03 y 240100-213-03, y se obtuvieron a partir de animales vivos, en su hábitat natural, utilizando un método de muestreo semi-invasivo (biopsia) y/o no invasivo (piel descamada). El tejido se recolectó sólo para aquellos animales en los que se consiguió obtener un registro fotográfico (ver Gendron 2002) con el objeto de poder asignar posteriormente la muestra a cada individuo fotoidentificado[8].

---

[7] Dra. Diane Gendron Laniel. Departamento de Biología Marina y Pesquerías del CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S. dgendron@ipn.mx

[8] El patrón de pigmentación moteado de las ballenas azules ha sido empleado para identificar a los individuos de esta especie (ver Sears *et al.* 1990) y conocer así aspectos sobre su dinámica poblacional. Las ballenas azules que han sido fotografiadas con suficiente detalle son comparadas y el mejor registro de cada una es catalogado como individuo. El catálogo de ballenas azules de Baja California cuenta con el historial de registros de más de 400 individuos.

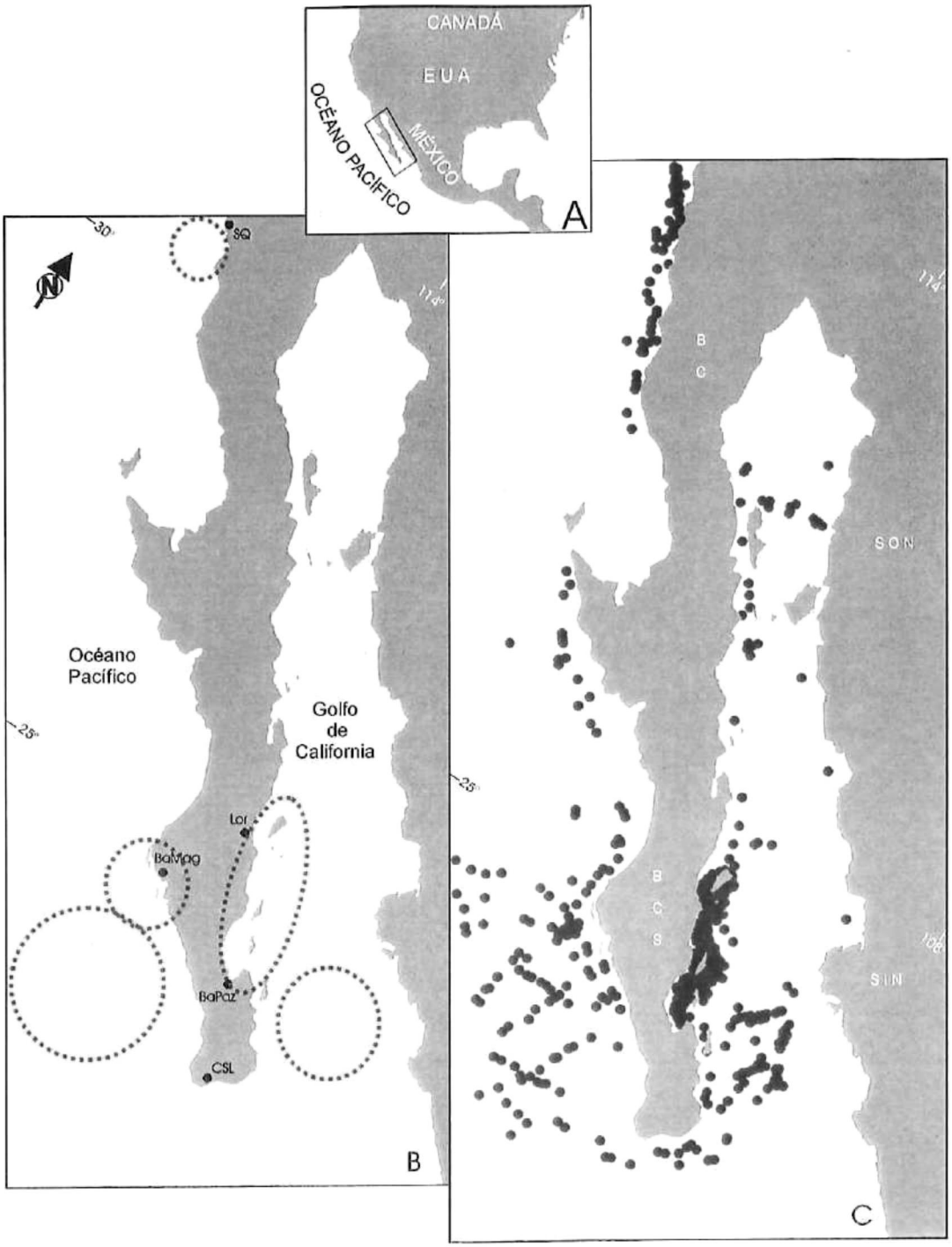


Figura 1. Área de estudio. (A) Localización de la Península de Baja California y del Golfo de California. (B) Zonas en las que se concentró el esfuerzo de recolecta de muestras de piel de ballena azul. (C) Distribución de las ballenas azules en la región costera de la Península de Baja California entre 1993 y 1999 [tomado de Gendron 2002]. BC = Baja California, BCS = Baja California Sur, SON = Sonora, SIN=Sinaloa, SQ= San Quintín, Lor = Loreto, BaMag = Bahía Magdalena, BaPaz = Bahía de la Paz, CSL= Cabo San Lucas. Los círculos discontinuos en rojo indican las zonas donde se recolectaron las muestras de piel [área costera entre Loreto y la Bahía de la Paz, área oceánica en la porción sur del Golfo de California, área costera fuera de Bahía Magdalena, área costera fuera de San Quintín y área oceánica en la porción sudoccidental de la Península de Baja California]. Los puntos de color azul indican la posición geográfica de los avistamientos de ballena azul.

Tabla I. Muestras de piel de ballena azul incluidas en este trabajo.

Fuente	Año	Biopsias	Piel descamada
J. Urbán. PRIMMA-UABCS[a]	1994	7^G	-
D. Gendron. CICIMAR[b]	1995	2^G	-
D. Gendron. CICIMAR[b]	1996	4^G	27^G : 17^P
D. Gendron. CICIMAR[b]	1997	-	61^G
D. Gendron. CICIMAR[b]	1998	-	20^G ; 6^P
D. Gendron. CICIMAR[b]	1999	-	57^G
D. Gendron. CICIMAR[b]	2000	6^G	9^G
J. Urbán. PRIMMA-UABCS[a]	2000	7^G	-
D. Gendron. CICIMAR[b]	2001	13^G	49^G
D. Gendron. CICIMAR[b]	2002	28^G	14^G
D. Gendron. CICIMAR[b]	2003	40^G	18^G
D. Gendron. CICIMAR[b]	2004	17^G	33^G
	Total	124^G	288^G ; 23^P

[a] Dr. Jorge Urbán. Programa de Investigación de Mamíferos Marinos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur, México.

[b] Dra. Diane Gendron. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional. La Paz, Baja California sur, México

[G] Golfo de California.

[P] Pacífico. Costa occidental de la Península de Baja California.

Las biopsias se recolectaron usando flechas con una punta cilíndrica hueca de acero inoxidable (7 mm de diámetro y 40 mm de largo) con barbillas internas para la retención del tejido, y una ballesta (ver Lambersten 1987). El tejido fue removido de la punta y preservado a temperatura ambiente en una solución sobresaturada de cloruro de sodio y dimetilsulfóxido (NaCl-DMSO) al 20% (ver Amos y Hoelzel 1991, Amos 1997), o envueltas en papel aluminio, refrigeradas en el campo y congeladas a –20°C en el laboratorio hasta que se procesaron para extraer el DNA. Para evitar la contaminación entre muestras y posibles infecciones en los animales, la punta de la flecha y el material con el que se manejó la muestra fueron cuidadosamente esterilizados, a fuego directo y lavados con alcohol, antes y después de cada disparo (ver Medway 1983, Hoelzel 1991).

Las muestras de piel descamada fueron recolectadas de la superficie del mar, durante las aproximaciones a los animales, utilizando una red manual de acuario, (ver Gendron y Mesnick 2001). El tejido se removió de la red con ayuda de unas pinzas esterilizadas y se preservó también en NaCl-DMSO al 20%. Alternativamente, algunas muestras de piel descamada fueron preservadas en criotubos, refrigeradas en el campo y posteriormente congeladas a –20°C en el laboratorio.

Evaluación del tejido recolectado como fuente de DNA para la detección y análisis de marcadores moleculares

La descripción del conjunto de variables empleadas en la evaluación de la eficiencia de las muestras se resume en la Tabla II. Se realizó una evaluación morfológica cualitativa a un conjunto de muestras de piel descamada y se agruparon con base en dos características macroscópicas: el grosor del tejido y la pigmentación del mismo. El grosor del tejido se consideró como un reflejo de la cantidad de láminas celulares que podrían estar presentes en la muestra. La pigmentación se incluyó como un indicador indirecto de la cantidad de melanina en el tejido.

Tabla II. Variables cualitativas y cuantitativas empleadas en la evaluación de muestras de piel de ballena azul recolectadas por métodos semi-invasivo o no invasivo.

Etapa	Variables
Recolecta	**Edad:** Período entre la recolecta y la extracción de DNA.
	Tipo: Método de recolecta (piel descamada o biopsia).
Evaluación del tejido	**Cualitativa:** Escala de pigmentación y grosor del tejido asignados después de una evaluación detallada en un estereoscopio con objetivos graduados. Se seleccionó un grupo de muestras para cada categoría de pigmentación/grosor (ver Fig. 1) y se prepararon para realizar una descripción histológica.
	Asignación de histotipos: Criterio de agrupación basado en las características microscópicas del tejido en las laminillas histológicas.
	Cuantitativas: Peso húmedo y superficie total de la muestra evaluados en una balanza analítica y un estereoscopio con ocular reticulado, respectivamente
Extracción de DNA	**Concentración:** Cantidad de DNA estimada contra estándares de concentración conocida por electroforesis y confirmada por espectrofotometría.
	Degradación: Medida de degradación del DNA cuantificada como la moda de la distribución del tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos evaluados por electroforesis contra un marcador de peso molecular estándar.
	Rendimiento de extracción: Estimada como la razón entre la concentración de DNA y el peso húmedo de tejido empleado en la extracción.
PCR	**Eficiencia en el PCR:** Porcentaje de muestras que amplificaron el fragmento esperado

Aunque resultan obvias las diferencias entre el grosor y la pigmentación de una biopsia con respecto a una muestra de piel descamada, en la comparación se agregó un grupo de biopsias ya que el objetivo central de este análisis es el de comparar la eficiencia de las muestras para la detección de los marcadores moleculares de DNA. En este trabajo, el término "eficiencia" será empleado en un sentido porcentual haciendo referencia al número de muestras que funcionaron adecuadamente en cada una de las etapas del proceso de detección de los marcadores con respecto al total de muestras procesadas. La eficiencia global será referida de forma porcentual acumulativa, representando el porcentaje final de muestras que funcionaron adecuadamente.

Se seleccionaron muestras representativas de los grupos de grosor y pigmentación del tejido para su análisis histológico. Las muestras se lavaron en una solución amortiguadora para eliminar el exceso de DMSO-NaCl. El tejido se preparó siguiendo un procedimiento estándar de deshidratación con alcoholes, inclusión en parafina y, tinción en eosina-hematoxilina (ver Bancroft y Stevens 1977). Los cortes histológicos se montaron con resina en laminillas permanentes y se realizó una descripción de las observaciones efectuadas en el microscopio.

Extracción del DNA total

El método primario que se empleó para obtener el DNA genómico total (DNAt) de las células epidérmicas fue un procedimiento estándar de extracción orgánica (ver Sambrook *et al.* 1989). La lisis celular se efectuó en 400 µL de una solución amortiguadora (pH 8.0) con dodecil-lauril sulfato de sodio (SDS) al 1.0%, clorhidrato de tris-hidroximetil-aminometano (Tris-HCl) 10 mM, NaCl 150 mM, y ácido etilen-diamino tetracético (EDTA) 1 mM. Cuando la cantidad de muestra recolectada lo permitió, entre 5 y 30 mg de tejido fueron finamente cortados con ayuda de una hoja de bisturí y homogeneizados con pistilos plásticos desechables en la solución amortiguadora. Posteriormente se añadió proteinasa K (100 µg/mL) y se permitió la digestión durante 12 h a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos fueron purificados con extracciones sucesivas en un volumen de fenol, uno de fenol-cloroformo-alcohol isopentílico (25:24:1) y por último en uno de cloroformo-alcohol isopentílico (24:1). Finalmente, el DNAt se precipitó a 4ºC en un volumen de isopropanol al 99%, se lavó en 500 µL de etanol al 70% y se secó por evaporación a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió por 12 h en 20 µL de solución amortiguadora Tris-HCl 1 mM (pH 7.5) y EDTA 0.1 mM.

Para cada grupo de muestras procesadas se incluyó un control negativo de extracción (sin tejido) para evaluar posteriormente la presencia de contaminación por DNA ajeno a la muestra.

La calidad y la concentración del DNAt fueron evaluadas por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en los que se incorporaron 0.05 µg/mL de bromuro de etidio (EtBr). El tamaño y la integridad (degradación) del DNA obtenido se estimaron comparando contra un marcador de peso molecular comercial (DNA λ digerido con *Hind* III). La concentración fue determinada contrastando las muestras contra diluciones de DNA comercial de concentración conocida (SIGMA® DNA λ o DNA de esperma de arenque) y confirmada por espectrofotometría (Ultrospec 2000 PHARMACIA BIOTECH). Finalmente, para calibrar las estimaciones de concentración de DNAt en los geles, se seleccionó al azar un grupo de muestras y se estimó su concentración por espectrofotometría.

En aquellas muestras para las que no se observó DNA en los geles se efectuó de nuevo la extracción utilizando un método modificado y que hemos probado exitosamente con diversos tejidos de varias especies en nuestro laboratorio. Básicamente el método combina varios protocolos descritos por Hoelzel (1992) y consiste en la homogenización del tejido en 150 µL de una solución amortiguadora que contiene Tris-HCl 200 mM (pH 7.4), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, y SDS al 1%. El homogenizado se incubó a temperatura ambiente en agitación constante y durante 20 min. Posteriormente se agregaron 100 µL de una solución que contiene Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, 2% bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB), 1% de polivinil-pirrolidona (PVPP) y 0.2% de 2-mercaptoetanol. Después de incubar la mezcla anterior a 65ºC durante 10 min, se añadieron 350 µL de cloruro de litio (LiCl) 5 M y se incubó

durante otros 5 minutos con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Se centrifugó la mezcla para eliminar el debris y el sobrenadante fue purificado con un volumen de cloroformo-alcohol isopentílico (24:1). El DNAt se precipitó en un volumen de isopropanol al 99%, se lavó con etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en solución amortiguadora, tal y como en el primer método mencionado.

Las muestras en las que la cantidad de tejido epidérmico fue menor de 5 mg fueron tratadas de manera significativamente diferente. El tejido fue homogenizado en 10 µL de una solución amortiguadora compatible con la que se usó más adelante para la amplificación (ver Allen *et al.* 1998), adicionado con proteinasa K (100 µg/mL). El homogenizado fue incubado por 30 min a 65ºC y posteriormente a 95ºC por 10 min. La mezcla se centrifugó para eliminar el debris y el sobrenadante, que teóricamente contenía el DNAt, se separó en alícuotas de 2 µL que se preservaron inmediatamente a –20ºC.

Amplificación del DNA mitocondrial

Un fragmento del DNAmt de aproximadamente 540 pares de bases (540 pb) que corresponde al dominio hipervariable I de la región control (dHvI-RCmt; ver Saccone *et al.* 1991, Avise 2000) fue amplificado simétricamente usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis y Faloona 1987). Para ello, se utilizó un par de oligonucleótidos cebadores específicos para dHvI-RCmt diseñados por el grupo de Ecología Molecular de Mamíferos Marinos del Southwest Fisheries Science Center[9] (SWFSC): *Tro* (5'-CCTCCCTAAGACTCAAGG-3') y *Dxx* (5'-CCTGAAGTAAGAAACCAGATG-3').

Las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen final de 30 µL de una solución amortiguadora con Tris-HCl 22 mM (pH 8.4), cloruro de potasio (KCl) 55 mM, cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 3.0 mM, mezcla de nucleótidos (dNTPs) 0.22 mM, 280 picomoles de cada cebador, y 1.1 U de *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen™) a partir de 5-15 ng de DNA genómico total. El perfil empleado en el termociclador incluyó un periodo inicial de

desnaturalización de 4 min a 94ºC seguido de 35 ciclos de amplificación. Cada ciclo consistió de 45 s en desnaturalización a 95ºC, 45 s de reincorporación a 52ºC y 60 s de extensión de la cadena a 72ºC. Un periodo final de 7 min a 70ºC se añadió para asegurar la extensión completa de los productos de PCR.

Para cada grupo de muestras procesadas se incluyeron dos controles negativos de amplificación. En un primer control se empleó, en lugar de DNA, agua di-destilada desionizada, tratada con luz UV, filtrada (0.2 µm) y esterilizada (H_20_{dde}) para evaluar la posible contaminación en los reactivos empleados para la amplificación. Un segundo control correspondió al control negativo de la extracción, en el que se evaluó la posible contaminación de los reactivos usados para la extracción del DNA.

Para el caso de aquellas muestras para las que la extracción se realizó a partir de menos de 5 mg de tejido, una de las alícuotas previamente preparadas fue resuspendida directamente en la solución amortiguadora de amplificación y sometida al perfil de ciclos térmicos ya mencionado.

El éxito de la amplificación fue evaluado mediante electroforesis en geles de agarosa/EtBr, usando un marcador de peso molecular de 250 pb (Invitrogen™ 250 bp DNA Ladder). Aquellas muestras en las que la cantidad del producto de la amplificación fue muy bajo se amplificaron nuevamente utilizando el doble de la cantidad de DNAt empleada en el primer intento. Un intento más para amplificar dHvI-RCmt se llevó a cabo en todas aquellas muestras en las que no se obtuvo producto de PCR, así como en las extracciones cuya evaluación por electroforesis y espectrofotometría sugerían la ausencia de DNA. Estas amplificaciones se realizaron reduciendo la temperatura de reincorporación a 48ºC y añadiendo a la reacción albúmina sérica bovina (BSA) en una concentración final de 0.1%, y N,N,N-trimetilglicina (betaína) en una concentración final de 0.5 M. En conjunto, estos dos últimos aditivos incrementan el rendimiento del producto de PCR y eliminan los efectos inhibidores de sustancias como la melanina (ver Frackman *et al.* 1998).

---

[9] Southwest Fisheries Science Center, National Oceanographic and Atmospheric Administration - Fisheries, La Jolla, California 920387, USA.

Por último, se procedió a extraer DNA nuevamente de las muestras en la que no se logró obtener producto de PCR. Para estas muestras, las reacciones de PCR se prepararon usando la polimerasa de DNA Platinum® *Pfx* (Invitrogen™), que posee una mayor procesividad, especificidad y rendimiento que la *Taq* polimerasa. Debido a la alta sensitividad de esta polimerasa las reacciones de PCR se realizaron siguiendo las especificaciones del fabricante y utilizando exclusivamente los reactivos suplementados por el mismo (Platinum® *Pfx* Reaction Buffer y PCR enhancer solution).

Identificación molecular del sexo

El sexo fue determinado a partir de 25-30 ng de DNAt usando amplificaciones por PCR con cebadores cuyas secuencias blanco se localizan en los cromosomas sexuales. Excepto por los cebadores, y a menos de que se especifique lo contrario, todas las reacciones de PCR para la identificación del sexo se efectuaron en un volumen final de 20 µL de la misma solución amortiguadora empleada para la amplificación inicial de dHvI-RCmt. En la Tabla III se especifican los cebadores y las condiciones de PCR empleadas.

Dada la importancia de asignar correctamente el sexo a los individuos para este estudio, cada muestra se analizó por duplicado (réplica) y se incluyeron, además de los controles negativos de extracción y de amplificación, un par de controles positivos con animales de sexo conocido. En este caso se usó una muestra de un macho joven de ballena azul varado en la Bahía de la Paz en 1998 y la muestra de un individuo que se ha observado en diferentes años con una cría pequeña, por lo que supuso que se trata de una hembra adulta. Cuando el resultado de la réplica fue consistente con la primera prueba, se asignó el sexo a la muestra correspondiente.

El método primario que se empleó en la identificación molecular del sexo fue el propuesto por Bérubé y Palsbøll (1996), que amplifica sobre una secuencia homóloga

denominada *zinc finger X/Y* situada en los cromosomas sexuales (*ZFX/ZFY*[10]; ver Schenider-Gädicke *et al.* 1989). Simultáneamente, un tercer cebador interno reconoce y amplifica sobre una secuencia específica al cromosoma *Y*.

Las muestras en las que el patrón de bandas esperado fue ambiguo se analizaron empleando el protocolo de Fain y LeMay[11] en el que se amplifica una secuencia denominada *SRY*[12] específica del cromosoma *Y*, además de una secuencia común a los dos cromosomas que funciona como control de amplificación. De igual forma, las amplificaciones se realizaron por duplicado y en este caso se asignó el sexo a las muestras que exhibieron el patrón de bandas característico de los machos. El resto de las muestras se asignaron temporal y tentativamente como hembras.

Usando como base las secuencias obtenidas por A. Rosenberg[13] reportadas en el GeneBank[14], y usando los programas *Primer Select* y *Restriction Site Analysis & Map Creation* (DNASTAR Inc.), se diseñaron varios pares de cebadores cuya secuencia blanco es el sistema *ZFX/ZFY* en cetáceos y que flanquean sitios de restricción polimórficos entre sexos (ver Anexo A). De igual forma, usando la secuencia reportadas para el sistema *SRY* en ballena azul y otros cetáceos (Nishida *et al.* 2003; Genebank Accession

---

[10] El "dedo de zinc" (*zinc finger*) es la región de una proteína con cierta secuencia de aminoácidos que se combinan con un ion de zinc. Esta región permite que la proteína con dicha estructura interactue con la doble hélice del DNA. Muchos factores de transcripción, proteínas reguladoras y otras proteínas que interactuan con el DNA contienen esta región. Aunque se han descubierto mejores candidatos, por mucho tiempo se pensó en *ZFY* como el factor determinante en el desarollo de los testículos. Ya que *ZFY* se presenta exclusivamente en el cromosoma *Y*, permite la identificación molecular de los machos.

[11] Fain, S.R. and J.P. LeMay. No publicado. Gender identification of humans and mammalian wildlife species from PCR amplified sex-linked genes. Proceedings of American Academy of Forensic Science. [Disponible en http://www.aasf.org]

[12] *SRY* es uno de los genes que intervienen en la deteminación de sexo durante el desarrollo embrionario. Se encuentra en el *cromosoma Y* de casi todos los mamíferos y otras especies. Tiene una influencia más directa como factor de desarrollo de los testículos que la del *ZFY* del sistema *ZFX/ZFY*.

[13] Aviva Rosenberg (2002). The cetacean ZFX and ZFY genes: interfamilial characterization of a novel region facilitates gender determination (Genebank Accessions No. AF260783 a AF260812). [Disponible en Marine Mammal Division, National Marine Fisheries Service (NMFS) Southwest Fisheries Science Center (SWFSC), 8604 La Jolla Shores Drive, La Jolla, CA 92038, USA.]

[14] GenBank® es la base de datos genéticos de los Intitutos Nacionales de Salud (NIH) en donde se almacenan las secuencias de DNA de acceso público, así como las referencias e información sobre la autoría de las secuencias. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/

No. AB108511) se diseñaron dos pares de cebadores que pueden ser empleados en una reacción múltiple. Las combinaciones de cebadores empleados, las secuencias de los mismos, el perfil de la reacción de PCR en el termociclador, la enzima de restricción empleada y el método de detección se resumen en la Tabla III.

Tabla III. Protocolos y patrón de fragmentos esperados para la identificación molecular del sexo por PCR o PCR/RFLP.

Referencia	Cebadores[+]	PCR	RFLP*	Detección**	Hembra	Macho
Bérubé & Palsbøll (1996)	*ZFYX0582 F* *ZFYX0785 R* *ZFYX0582 F* *ZFY0752 R*	1X : 4 min a 94°C 35X: 45 s a 95°C 60 s a 55°C 90 s a 70°C 1X : 7 min a 70°C	NO	EtBr Agarosa 3% 60 V, 2 h MP 50 pb	328 pb	328 pb 254 pb
Fain & LeMay	*SRY Y53-3c F* *SRY Y53-3d R* *P15EZ F* *P23EZ R*	1X : 4 min a 94°C 35X: 45 s a 95°C 45 s a 58°C 60 s a 70°C 1X : 7 min a 70°C	NO	EtBr Agarosa 1.5% 60 V, 1 h MP 250 pb	440 pb	440 pb 245 pb
Palsbøll *et al.* (1992) Este trabajo	*ZFXY0097 F* *ZFXY270-287 R*	1X : 4 min a 94°C 35X: 45 s a 95°C 60 s a 50°C 60 s a 70°C 1X : 7 min a 70°C	*Taq I* 65°C 8 h 0.7 ug	EtBr Agarosa 3.0% 60 V, 2 h MP 250 pb	 158 pb 80 pb 48 pb	238 pb 158 pb 80 pb 48 pb
Este trabajo	*CZFXY243-261 F* *CZFXY319-340 R*	1X : 4 min a 94°C 35X: 30 s a 95°C 30 s a 48°C 60 s a 70°C 1X : 5 min a 70°C	*Alu I* 37°C 6 h 0.8 ug	$AgNO_3$ Acrilamida 10% 35 mA, 3 h MP 50 pb	 54 pb 44 pb	98 pb
Este trabajo	*BSRY188-211 F* *BSRY264-287 R* *BSRY370-393 F* *BSRY500-523 R*	1X : 4 min a 94°C 35X: 30 s a 95°C 30 s a 54°C 60 s a 70°C 1X : 5 min a 70°C	NO	$AgNO_3$ Acrilamida 10% 35 mA, 3 h MP 50 pb	 NO	154 pb 100 pb

[+] Secuencias de los cebadores empleados: *ZFXY0582 F* (5'-ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA-3'), *ZFY0752 R* (5'-ATTACATGTCGTTTCAAATCA-3'), *ZFYX0785 R* (5'-CACTTATGGGGGTAGTCCTTT-3'), *P15EZ F* (5'-ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT-3'), *P23EZ R* (5'-GCACTTCTTTGGTATCTGAG-'3), *SRYY53-3c F* (5'-CCCATGAACGCATTCATTGTGTGG-3'), *SRYY53-3d R* (5'-ATTTTAGCCTTCCGACGAGGTCGATA-3'), *ZFXY0097 F* (5'-CATCCTTTGACTGTCTATCCTTG-3'), *BSRY188-211 F* (5'-ACGGTGAGGATTACAGCCCAGAGG-3'), *BSRY264-287 R* (5'-CGATCATTTGAGCCACCATTGTC-3'), *BSRY370-393 F* (5'-GATCAAAGGCGAAAGGTGGCTCTA-3') y *BSRY500-523 R* (5'-ATTTGTCTCGGTGCATGGCTCGTA-3').

[*] RFLP: Se indica la enzima de restricción específica, la temperatura y el tiempo de incubación y la cantidad de producto de PCR empleada en la digestión. Las digestiones se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen™)

[**] Se indica la tinción empleada para visualizar los productos, la concentración del gel empleado en la electroforesis, las condiciones del corrimiento y el marcador de peso estándar con el que se midieron los fragmentos de PCR o los productos de la digestión.

Las muestras que no fueron exitosamente amplificadas por ninguno de los dos métodos anteriores, así como el grupo de muestras asignadas tentativamente como hembras usando el método de Fain y LeMay, se amplificaron con un par de cebadores que generan un fragmento de aproximadamente 238 pb correspondiente al sistema *ZFX/ZFY* (ver Tabla III). Las secuencias homólogas *ZFX-ZFY* se diferencian por una sustitución (transición[15]) en *ZFY* que ha modificado un sitio de reconocimiento para enzima de restricción[16] y permite distinguir sin ambigüedad el sexo en cetáceos y muchos otros mamíferos (ver Palsbøll *et al.* 1992). Las muestras que fueron amplificadas exitosamente con estos cebadores fueron digeridas con enzima *Taq I* y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos generados (RFLP) se evaluó por electroforesis.

Por último, con las muestras en las que hasta este punto no se había logrado una asignación confiable del sexo, se realizó una nueva extracción de DNA (en caso de que hubiera tejido suficiente) y se procedió a amplificar cada muestra con un grupo de cebadores diseñados para amplificar otra región del sistema *ZFX/ZFY* con un sitio de restricción polimórfico entre sexos para *Alu I.* Paralelamente, se empleó otro grupo de cebadores diseñados para amplificar simultáneamente dos fragmentos específicos de *SRY.* Estos dos últimos grupos de cebadores (ver Tabla III) fueron diseñados para amplificar regiones muy pequeñas (100-150 pb), por lo que en las reacciones de PCR se añadió formamida a una concentración final 0.8 M con el objeto de incrementar el rendimiento de la reacción, reducir la amplificación no específica y prevenir la amplificación preferencial de artificios durante el PCR (ver Chakrabarti y Schutt 2001).

Además de los controles positivos y negativos usados en cada análisis, se incluyó un grupo de muestras en las que ya se había asignado el sexo con cualquiera de los otros métodos. Se reportó el sexo para aquellas muestras que mostraron un resultado consistente con su réplica y con al menos uno de los otros métodos empleados.

---

[15] Las sustituciones de nucléotidos en la cadena de DNA pueden ser de dos tipos: transiciones y transversiones. Las transiciones son cambios alternativos entre pirimidinas (C - T) o entre purinas (A - G). Por el contrario, las transversiones son cambios entre pirimidinas y purinas (C/T - A/G)

[16] Una enzima de restricción es una endonucleasa bacteriana que reconoce y corta el DNA en regiones con secuencias específicas. En el campo de la ecología molecular han sido extensamente usadas para evaluar el polimoffismo en marcadores moleculares ya que permiten detectar diferencias entre secuencias homólogas mediante un análisis conocido como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms).

Secuenciación del dominio hipervariable I de la región control del DNAmt (dHvI-RCmt)

Los productos de amplificación del dHvI-RCmt se limpiaron mediante el sistema de columnas de purificación Concert™ (Gibco-BRL Rapid PCR Purification System) modificando el volumen de solución amortiguadora para eluir el DNA de la columna, así como la temperatura y el tiempo de incubación que sugiere el fabricante en este paso. Se empleó un volumen de 25 µL y 5 minutos de incubación a 55ºC previos a la recuperación del producto purificado. Finalmente, la concentración de los productos de PCR purificados fue evaluada a través de electroforesis en agarosa/EtBr.

Por medio de una reacción cíclica de secuenciación (ver Sears *et al.* 1992), que emplea terminadores de cadena inhibidores de la DNA polimerasa (Sanger *et al.* 1977), las cadenas complementarias (pesada y ligera) del fragmento dHvI-RCmt fueron amplificadas independientemente por extensión cíclica en un termociclador. Se optó por usar la mezcla comercial de terminadores de secuencia con marcaje fluorescente BigDye®, que permite el uso de sistemas de detección automatizados con tecnología láser y reduce el tiempo en la obtención de resultados.

Las reacciones se prepararon en un volumen de 12 µL utilizando 2.2 µL de la mezcla BigDye v3.1 (BygDye® Terminator Ready Reaction Mix), 1.3 µL de solución amortiguadora de secuenciación (BigDye® Terminator Sequencing Buffer 5X), 6.4 pmoles de alguno de los cebadores (*Dxx* o *Tro*), 80-100 ng del fragmento de DNA purificado y H_2O_{dde} hasta ajustar al volumen final.

El perfil de ciclos térmicos usados para la extensión de las cadenas en la reacción de secuenciación constó de un periodo inicial de desnaturalización a 96ºC por 60 s, seguido por 25 ciclos de extensión y amplificación de cadena sencilla (asimétrica). Cada uno de estos ciclos incluyó una desnaturalización a 96ºC por 10 s, reincorporación a 50ºC por 5 s y extensión a 60ºC por 4 min. Los productos de la extensión cíclica fueron purificados por precipitación en 4 volúmenes de isopropanol al 70% a temperatura ambiente. Finalmente los productos fueron lavados con 250 µL de isopropanol al 75%, se secaron

en una centrífuga con vacío (CentriVap Concentrator LABCONCO) durante 10 min a 50ºC y se mantuvieron refrigeradas a 4ºC.

Previo a la detección electroforética capilar, las muestras fueron resuspendidas en formamida (Hi-Di™ Formamide Applied Biosystems Inc) para proceder a la electroforesis capilar de las muestras. Los sistemas de detección que se emplearon para las muestras fueron los secuenciadores automáticos ABI Prism® 377 (Vertical Gel Automated DNA Sequencer) y ABI Prism® 3100 (Automated Capillary DNA Sequencer) de Applied Biosystems Inc. Un primer lote de muestras se analizó en el Laboratorio de Ecología Molecular del SWFSC, un segundo lote en el SDSU Microchemical Core Facility[17], y dos últimos lotes en Sequegene, Inc[18].

Edición de las secuencias

Los cromatogramas [19] de las cadenas complementarias para cada muestra fueron alineadas usando el programa Sequencher™ 3.0.1, o bien el programa ChromasPro 1.15 (Technelysium Pty Ltd[20]). Las posiciones con bases ambiguas en alguna de las dos cadenas fueron revisadas y comparadas con la cadena complementaria. Se editaron manualmente sólo aquellas posiciones en las que la ambigüedad se debiera a diferencias en la movilidad o la presencia de burbujas durante la electroforesis capilar del proceso de secuenciación.

Aquellas muestras en las que no fue posible obtener una secuencia consenso sin bases ambiguas se procesaron una vez más. Se amplificó dHvI-RCmt y se realizó la limpieza del producto como se describió anteriormente. Sin embargo, se añadió en esta ocasión

---

[17] San Diego State University Microchemical Core Facility. CSL 326 MC 1030. 5500 Campanile Drive, San Diego, CA 92182-1030 http://www.sci.sdsu.edu/dnacore/sdsu_dnacore.htlm

[18] Sequegene Inc. 11526 Sorrento Valley Road. Suite B2, San Diego, CA 92121 http://www.sequegene.com

[19] Un cromatograma es el archivo de salida de la paquetería de análisis en el secuenciador automático. Las señales fluorescentes son detectadas con tecnología láser y el programa grafica la intensidad y la posición de cada señal en función de la distribución por tamaños durante la electroforesis, determinando así la secuencia de nucleótidos.

[20] Chromas Pro es un programa para la edición de secuencias de DNA y proteínas. [Disponible en http://www.technelysium.com.au/chromas.html]

5% de DMSO y 5% de glicerol (ver GeneLab Sequencing [21]) a la reacción de secuenciación cíclica. En ocasiones existe una disminución en la procesividad de la polimerasa en las regiones repetitivas en la secuencia debido a la formación de estructura secundaria. La adición de los compuestos mencionados magnifica la señal y disminuye el bloqueo de la polimerasa a lo largo de la cadena de DNA.

Con la primera secuencia editada obtenida se efectuó una comparación con las bases de datos NCBI[22] con ayuda del programa Blastn 2.2.9 (Altschul *et al.* 1997) para corroborar que el fragmento secuenciado correspondía a la región y a la especie blanco. Una vez editadas las secuencias, se efectuó un alineamiento múltiple de agrupamiento jerárquico usando el programa MultAlin (Corpet 1988), en el que se incluyeron todas las secuencias editadas. La secuencia consenso se obtuvo programando el alineamiento con base en la Tabla de comparaciones AltDNA-30-0 y sin criterio de penalización para las deleciones a lo largo de la secuencia.

Finalmente, la secuencia consenso se editó nuevamente, localizando y eliminando las regiones correspondientes a los cebadores. Mediante el programa MEGA v3.0 (Kumar *et al.* 2004) y usando como base la secuencia consenso global editada, se removieron a su vez las regiones de los cebadores del resto de las secuencias y se construyó la Tabla de sitios variables a partir de la cual se definieron los haplotipos[23].

---

[21] GeneLab Sequencing. Troubleshooting Guide. [Disponible en http://www.vetmed.lsu.edu/vmp/genelab]

[22] NCBI (National Center for Biotechnology Information) genera bases de datos de acceso público, dirige diversas líneas de investigación en bioinformática, desarrolla paquetería especializada como herramienta pricipal en el análisis de datos genómicos y difunde información biomédica atraves de boletines y otras publicaciones periodicas.

[23] Un haplotipo es una secuencia determinada de nucleótidos en el DNAmt que caracteriza a ciertos individuos. En el caso de los mamíferos puede interpretarse como el linaje materno al que pertence el individuo que lo porta. Haplotipo se refiere a una condición haploide y se distingue del genotipo que tiene una condicion diploide.

Asignación de las muestras a los individuos: Revisión del catálogo de identificación fotográfica.

Debido a que en el campo es difícil reconocer a los individuos que ya han sido observados previamente, frecuentemente se recolecta más de una muestra por individuo. Al no descartar las muestras repetidas en los análisis, se estaría introduciendo un importante sesgo en la estimación de los descriptores genéticos de la población bajo estudio. Por esta razón, las muestras recolectadas en el campo son asignadas temporalmente con un código que la asocia a un registro fotográfico del presunto individuo muestreado. Todos los registros fotográficos son organizados y debidamente etiquetados (p.e. fecha, ubicación geográfica, código de la muestra de piel, etc.). Posteriormente cada registro fotográfico es comparado con el resto y de esta forma todas aquellas ballenas azules que puedan ser individualizadas con base en sus patrones de pigmentación o marcas naturales sobre su cuerpo, son incorporadas al catálogo de individuos fotoidentificados.

El catálogo fotográfico está a su vez asociado con una base de datos en la que se registra cada ocasión que un individuo ha sido observado permitiendo con ello contar con un historial de ocurrencia individualizado. Como se mencionó anteriormente, este catálogo de individuos fotoidentificados es producto de muchos años de estudio de las ballenas azules en aguas de la Península de Baja California. La Dra. Diane Gendron me facilitó amablemente toda esa información con el objeto de evaluar errores de asignación de las muestras en el campo, la presencia de contaminación cruzada durante la manipulación de las muestras en el campo o en el laboratorio y otras potenciales fuentes de error.

Una vez que se identificó molecularmente el sexo y el haplotipo de cada muestra, se procedió a revisar las asignaciones del código temporal para corroborar la congruencia entre los códigos de identificación de los individuos en el catálogo de fotoidentificación con los resultados de la asignación molecular. En el presente trabajo se incluyeron sólo aquellas muestras que pudieron ser asignadas sin ambigüedad a un individuo y para las que se identificó molecularmente tanto el sexo, como el linaje materno.

RESULTADOS

Evaluación macroscópica y microscópica de las muestras de piel

Para la descripción de las características macroscópicas y microscópicas del tejido se emplearon exclusivamente 176 muestras de piel descamada de ballena azul catalogadas con base en las variables descritas en la Tabla II. Se definieron 5 grupos de muestras en función del grosor de la lámina epidérmica descamada y su pigmentación (Fig. 2). Un grupo adicional de 82 biopsias se empleó con fines comparativos. La evaluación histológica permitió observar características que resultaron congruentes con el primer criterio de clasificación macroscópico por lo que se decidió mantener estos grupos (histotipos) en los subsecuentes análisis comparativos.

La Figura 3 resume los aspectos más relevantes de la descripción histológica. En general, las muestras de piel descamada estuvieron conformadas por un número variable de láminas de queratina y, aunque los núcleos no eran evidentes en las pocas células que pudieron observarse, se consideró que la presencia de ácidos nucleicos era mínima por la ausencia de zonas de basofílicas en la tinción histológica.

Las estadísticas descriptivas para cada uno de los histotipos se muestran en la Tabla IV. A pesar de la concordancia entre las características microscópicas y macroscópicas, la concentración y la calidad del DNA extraído en las muestras de piel descamada (histotipos I-V; Tabla IV) fue extremadamente variable, por lo que no se observaron diferencias significativas entre ellos (Prueba de Mediana $\chi^2=4.61$, $p>0.05$). La concentración y la calidad de DNA fue significativamente mayor y más homogénea en las biopsias que en la piel descamada (Prueba de Mediana $\chi^2=132.05$, $p<0.05$).

Aunque no se observaron diferencias significativas en la cantidad y la calidad de DNA en los grupos de piel descamada, los histotipos II, IV y V fueron en los que se obtuvo mayor cantidad y calidad de DNA (ver Tabla IV). Estos tres histotipos presentaron no sólo láminas de queratina sino una capa de células basofílicas, presumiblemente del estrato granuloso subyacente, que podría explicar esas pequeñas diferencias (ver Tabla IV y Fig. 2).

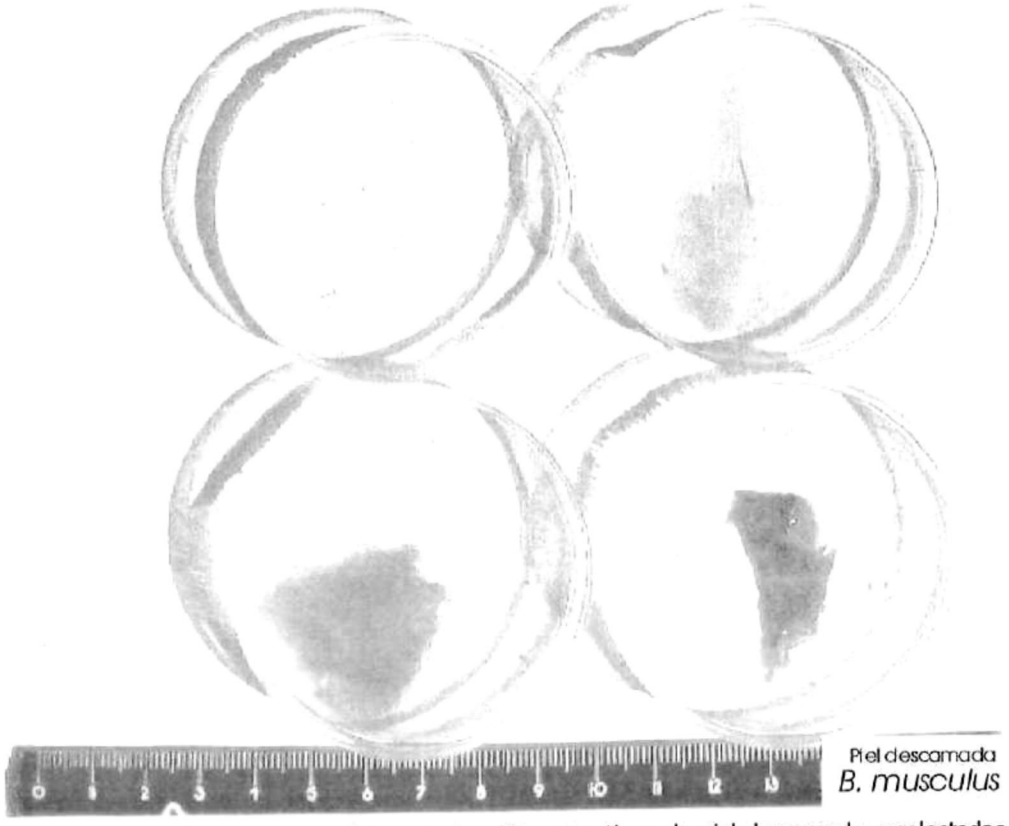


Figura 2. Características macroscópicas de los diferentes tipos de piel descamada recolectadas que representan las categorías de grosor y pigmentación empleadas para definir los grupos para su posterior análisis histológico. Códigos de grosor: (1) lámina delgada flexible, (2) lámina gruesa rígida y (3) masivo, correspondería a una biopsia (no se muestra). Códigos de pigmentación: (0) translúcido sin pigmentación, (1) traslúcido pigmentado, (2) lámina opaca con pigmentación moderada, (3) lámina opaca densamente pigmentada. Del extremo superior izquierdo al inferior derecho: 1-1, 1-2, 2-2, 2-3.

Tabla IV. Características y estadísticas descriptivas (media ± desv. est.) de las variables de evaluación para las muestras de piel de ballena azul agrupadas por histotipo

			Morfología macroscópica			Extracción de DNA		
Tipo de muestra	**Histotipo[a]**	**n**	**Superficie (cm^2)**	**Grosor[b]**	**Pigmentación[b]**	**Concentración (ng_{DNA}/mg_{Tejido})**	**Calidad[c]**	**Edad[d] (meses)**
Piel descamada	I	60	0.75 ± 1.49	1	0	6.44 ± 7.48	Baja	13.31 ± 13.72
Piel descamada	II	22	15.04 ± 15.58	1	1	8.84 ± 13.22	Media-Baja	12.81 ± 12.79
Piel descamada	III	54	6.00 ± 9.55	2	3	4.17 ± 3.81	Baja	13.31 ± 13.36
Piel descamada	IV	16	4.10 ± 2.20	2	2	7.34 ± 16.67	Media-Baja	13.27 ± 13.02
Piel descamada	V	24	0.77 ± 1.77	1	2	15.61 ± 15.73	Media-Baja	13.11 ± 13.24
Biopsia	VI	82	-	-	-	85.70 ± 50.80	Buena-Media	13.42 ± 13.57

[a] Los códigos de los histotipos corresponden a los de la Figura 3.
[b] Los códigos de grosor y pigmentación corresponden a los de la Figura 2.
[c] Las categorías de calidad reflejan la integridad del DNA extraído: buena (fragmentos > 8500 pb; sin degradación), media (fragmentos 5000 - 8500 pb; degradación moderada) y baja (fragmentos < 5000 pb; degradación evidente). Ver Amos y Hoelzel (1991).
[d] La edad de la muestra refiere el periodo, en meses que la muestra estuvo preservada. Tiempo transcurrido desde la colecta hasta la extracción del DNA.

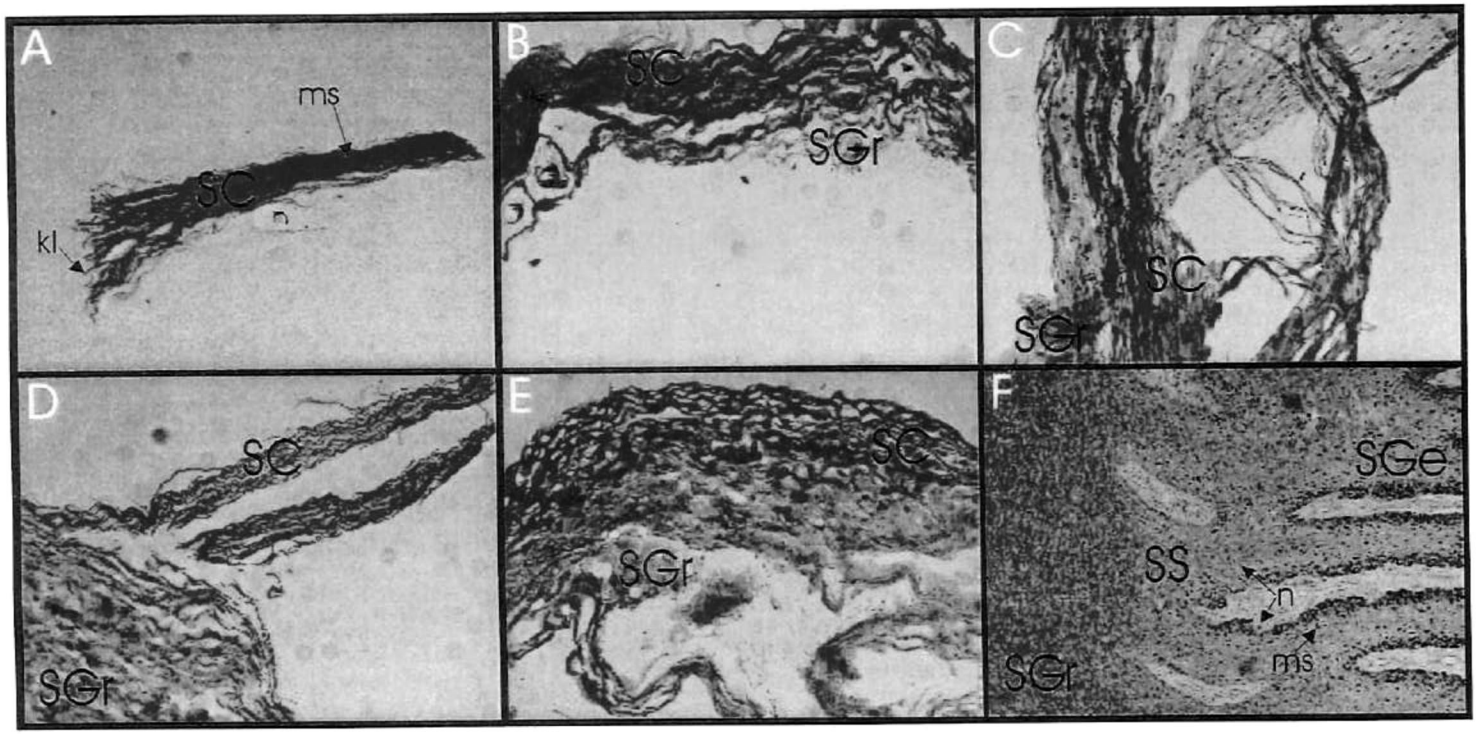


Figura 3. Histología descriptiva de las muestras de piel de ballena azul (40X; eosina-hematoxilina). (A) Histotipo I: conformado exclusivamente por láminas delgadas de queratina (kl) del estrato córneo (SC) y algunos cúmulos de melanina (ms). (B) Histotipo II: formado por láminas de queratina menos compactas pero corrugadas. Se distingue fácilmente por la presencia de una o dos capas de células basofílicas presumiblemente del estrato granuloso (SGr). Los núcleos de no son evidentes pero el color azul-púrpura del citoplasma en estas células posiblemente se deba a la ruptura del núcleo. (C) Histotipo III: presenta una conformación similar a la del histotipo I pero posee un mayor número de cúmulos de melanina, reflejo de un estrato córneo densamente pigmentado. (D) Histotipo IV: caracterizado por la presencia de varias láminas (20-50) de epitelio plano escamoso y células poligonales llenas de queratina y varios cúmulos de queratina. En apariencia, este histotipo se asemeja a la capa externa del estrato granuloso situada directamente bajo el estrato córneo. (E) Histotipo V: presenta varias láminas corrugadas de células planas queratinizadas y algunos cúmulos dispersos de melanina. Se asemeja bastante al histotipo III pero exhibe una zona basofílica mucho más evidente. (F) Histotipo VI: representa una biopsia en la que se aprecian todas las capas características de la epidermis de los mamíferos. La capa masiva de células cúbicas compactas y nucleadas corresponde al estrato germinativo (SGe). Los núcleos (n) son evidentes por su color azul-púrpura, que los diferencian de la gran cantidad de melanocitos presentes en ese estrato. El estrato espinoso (SS) contiene células nucleadas con forma poligonal. Sobre el estrato espinoso se encuentran las células escamosas aplanadas del estrato granuloso en las que también se aprecian los núcleos. Finalmente en la parte externa (extremo izquierdo, Fig. 3F) se observa el estrato córneo anucleado. Los códigos para cada histotipo corresponden a aquellos de la Tabla IV.

Las láminas de piel más grandes resultaron ser también las más pigmentadas y presentaron rendimientos de extracción bajos. Sin embargo, al ser muy pocas las muestras de este tipo y tan amplias las varianzas, la correlación entre la cantidad de DNA y la superficie de tejido descamado resultó baja, aunque significativa ($R_{Spearman}$= -0.21, p<0.05).

No se encontraron diferencias en concentración o calidad del DNA asociadas con el método de preservación (χ^2=0.65, p>0.05) o con el método de extracción empleado (χ^2=0.89, p>0.05). Por último, y contrario a lo que se esperaba, la edad de la muestra no mostró correlación significativa ni con la cantidad ($R_{Spearman}$= 0.42, p>0.05), ni con la calidad del DNA ($R_{Spearman}$= 0.34, p> 0.05).

Pruebas de amplificación por PCR para los histotipos definidos

Los resultados de la PCR para los marcadores nucleares (sistema *ZFX/ZFY*; Bérubé y Palsbøll 1996) y el marcador mitocondrial (dHvI-RCmt) mostraron diferencias significativas en la eficiencia de amplificación asociadas a la concentración de DNA (χ^2=11.84, p<0.05) y la calidad del mismo (χ^2=14.35, p<0.05). A pesar de que estas diferencias fueron mucho más evidentes para los marcadores nucleares con respecto a los mitocondriales (χ^2=6.11, p<0.05), se obtuvieron cantidades bajas de producto de PCR en algunas muestras en las que no se observó DNA durante la electroforesis y cuya concentración estimada en el espectrofotómetro estaba por debajo de 1 ng/µL.

Con base en lo anterior, se decidió trabajar primero con el grupo de muestras en las que hubiera suficiente tejido y para las que se lograra una extracción con suficiente DNA de buena calidad. Posteriormente se implementaron estrategias para intentar la amplificación en las muestras con bajo rendimiento de DNA.

Eficiencia en la extracción del DNA, identificación molecular del sexo y asignación de los haplotipos para todas las muestras

En la Tabla V se resume la información referente a la extracción, la amplificación por PCR y la eficiencia en asignación del sexo y el haplotipo para el total de las muestras analizadas. Los resultados fueron congruentes con lo observado anteriormente; menor cantidad y calidad de DNA para la piel descamada y por ende menor eficiencia en la amplificación, así como una menor eficiencia en la amplificación de los marcadores nucleares con respecto al marcador mitocondrial.

Se logró amplificar el fragmento dHvI-RCmt con una eficiencia del 100% para las biopsias y del 70% para las muestras de piel descamada. El uso de betaína, BSA o polimerasa *Taq* Platinum® *Pfx* en las reacciones de PCR permitió incrementar la eficiencia, particularmente para el caso de la piel descamada. Por su parte, la eficiencia en la identificación molecular del sexo resultó del 99% y del 65% para biopsias y piel descamada, respectivamente.

Como se puede observar en la Tabla V, la eficiencia en la identificación molecular del sexo empleando el protocolo de Bérubé y Palsbøll (1996) fue casi del 100% para las biopsias y sólo del 23% en las muestras de piel descamada. El porcentaje de eficiencia tan bajo no indica necesariamente que no se hayan obtenido productos de amplificación, pero si que el patrón de bandas esperado no fue los suficientemente evidente como para asignar sin ambigüedad el sexo.

En las muestras con baja calidad de DNA con frecuencia se presentó una incongruencia en las replicas de amplificación, por lo que la eficiencia del 65% reportada representa el porcentaje acumulado de asignaciones no ambiguas a través de los diferentes protocolos empleados (ver Tabla III para protocolos). El uso de cebadores cuya secuencia blanco fuera progresivamente más corta, incrementó la eficiencia del 23% hasta el 65%. El número total de muestras sexadas por más de un método (sin ambigüedades) fue de 325.

Tabla V. Eficiencia global en la identificación molecular del sexo y la asignación de haplotipos definidos a partir del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial (dHvI-RCmt).

Etapa/Proceso	Piel descamada	Biopsia	Total
Recolecta	311	124	435
Extracción DNA[a]			
Buena calidad	128/311 (41%)	120/124 (97%)	248/435 (57%)
Mala calidad	87/311 (28%)	4/124 (3%)	91/435 (21%)
Sin DNA	96/311 (31%)	0/124 (0%)	96/435 (22%)
Amplificación de dHvI-RCmt[b]			
Directa	167/311 (54%)	121/124 (98%)	288/435 (66%)
Directa + Aditivos	193/311 (62%)	121/124 (98%)	314/435 (72%)
Directa + Aditivos + Polimerasa *Pfx*	217/311 (70%)	124/124 (100%)	341/435 (78%)
Secuenciación	173/217 (80%)	124/124 (100%)	297/341 (87%)
Asignación no ambigua del haplotipo	156/173 (90%)	118/124 (95%)	274/297 (92%)
Identificación molecular del sexo[c]			
B&P	71/311(23%)	115/124 (93%)	186/435 (43%)
B&P + F&L	87/311 (30%)	115/124 (93%)	202/435 (46%)
B&P + F&L + *Taq I*	155/311 (50%)	117/124 (94%)	272/435 (63%)
B&P + F&L + *Taq I* + *Alu I*	186/311 (60%)	120/124 (97%)	306/435 (70%)
B&P + F&L + *Taq I* + *Alu I* + SRY^{100}	202/311 (65%)	123/124 (99%)	325/435 (75%)
Identificación no ambigua del sexo	154/202 (76%)	120/123 (98%)	274/325 (84%)
Asignación completa[d]			
Individuos haplotipados y sexados	154/311 (49%)	117/124 (94%)	271/435 (62%)
Revisión del historial fotográfico[e]			
Identificación individual	135	105	189

* El porcentaje acumulativo refiere al porcentaje total de muestras en las que la identificación del sexo o del linaje materno fueron exitosa al aplicar sucesivas estrategias. Por ejemplo, el número de muestras de piel descamada en las que se amplificó exitosamente el marcador mitocondrial fue del 54%, mientras que al añadir algunos aditivos (A+) el total de muestras amplificadas aumento del 54% al 62%. Esto indica que del 56% que no amplificaron con la primera estrategia, algunas muestras amplificaron con los aditivos, acumulando un total de 62% de eficiencia en la amplificación.

[a] Los códigos para las categorías de la extracción hacen referencia a la calidad del DNA: Buena calidad, sin degradación (BC); mala calidad, con degradación (MC); y no evidente en la evaluación electroforética (NE).

[b] Los códigos para la amplificación de dHvI-RCmt refieren el protocolo estándar (DNAmt), el uso de aditivos (DNAmt A+) y el uso de polimerasa *Platinum*[9]

[c] Los códigos para la identificación molecular del sexo refieren el protocolo empleado: Bérubé y Palsbøll (B&P), Fain y LeMay (F&L), digestión con *TaqI* (T), digestión con *AluI* (A) y amplificación con los cebadores específicos en ballena azul para *SRY* (SRY^{100}). Ver Tabla III para mayor detalle.

* Nótese que para el caso de la identificación individual, que representa la asignación combinada del linaje materno y del sexo a los individuos del catálogo fotográfico, los totales no corresponden a la suma de las asignaciones independientes. Esto se debe a las recapturas intra e interanuales de individuos (muestras múltiples para el mismo individuo).

Después de analizar los cromatogramas y editar las secuencias, se pudieron leer sin ambigüedades 500 pares de bases de cada secuencia con los que se definieron 17 haplotipos en función de 20 sitios variables (Tablas VI y VII; Anexo B). El número de muestras en las que logró amplificarse la región *dHvI-RCmt* fue de 314, pero sólo para el 87% (297) de ellas se obtuvieron secuencias lo suficientemente limpias y sin ambigüedades (Tabla V). Todos los cromatogramas con pobre resolución se obtuvieron del grupo de muestras de piel descamada, y aunque se procesaron de nueva cuenta usando glicerol y DMSO en la reacción de secuenciación, sólo se incrementó la eficiencia en un 6%.

Tabla VI. Secuencia completa de la cadena ligera del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial para *Balaenoptera musculus* (500 pb; Haplotipo NPBW01).

pb	Secuencia nucleotídica
001	AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAA
051	CTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAAGCCACAGTACT
101	ATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCG
151	TGCATGTATGTACTCCCCCATAACCAGTTAATCAGTGTTATCCCTGTGAA
201	TATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCAC
251	CACGAGCAGTTAAAGCCCGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACAT
301	AATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCTCAGGTCA
351	ATTTAAATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAAT
401	CACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTCTTCTC
451	GCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

* La secuencia corresponde a los sitios 15,911 a 16,184 de la secuencia completa del genoma mitocondrial de la ballena azul (Arnason y Gullberg 1993; GeneBank NC_001601).

Tabla VII. Sitios de segregación que definen los haplotipos mitocondriales de la ballena azul del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California, México.

	Sitios variables*																			
Haplotipo	074	147	148	157	164	165	168	172	181	213	251	267	320	325	343	347	350	368	369	379
NPBW01	G	T	T	T	T	C	C	A	A	C	C	C	G	A	T	G	A	C	C	T
NPBW02	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW03	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW04	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW05	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	G	.	.	.
NPBW06	.	.	C	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.
NPBW07	.	.	C	C	.	T	T	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	T	.	.
NPBW08	.	.	C	C	.	T	T	.	.	T	T	.	.	G	C	.	.	.	.	.
NPBW09	.	.	C	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW10	.	.	C	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.
NPBW13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C
NPBW14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
NPBW15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
NPBW16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	C	A	.	.	.	.
NPBW17	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW18	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	T	.

* El número del sitio variable hace referencia a las posiciones 1 a 500 con respecto a la secuencia de la Tabla VI. Los sitios invariables están representados por un punto (.). La secuencia completa para cada haplotipo se presenta en el Anexo C.

* Nótese que el código con el que se identifican los haplotipos incluye 4 letras que hacen referencia a la zona de origen de los especimenes y al nombre común de la especie en inglés (North Pacific Blue Whale). El código incluye también un número que identifica a cada haplotipo. Este número se fue asignando conforme se fueron detectando en los alineamientos, sin embargo, después de la última revisión se detectó que el haplotipo que originalmente se había asignado como NPBW12 se diferenciaba del haplotipo NPBW06 por la presencia de un sitio variable localizado en la región de los cebadores. Al eliminar de las secuencias la región de los cebadores, el individuo único individuo que presentaba el haplotipo NPBW12 quedó incluido en el NPBW06. Por esta razón, aunque a primera vista la numeración pareciera indicar que el número total de haplotipos es 18, realmente son sólo 17.

Eficiencia en la asignación de las muestras a los individuos

De las 325 muestras sexadas y 297 secuencias editadas, la revisión y comparación de los registros en el catálogo fotográfico permitió identificar el sexo y el haplotipo en 189 ballenas azules (ver Tabla V). Esta notable diferencia en los números se debió principalmente a que varias muestras fueron asignadas a los mismos individuos (recapturas intra e interanuales), lo que refleja la alta tasa de retorno anual de las ballenas azules en aguas de la Península de Baja California (ver Gendron 2002).

Sin embargo, las otras causas por las que el número de individuos identificados fue mucho menor que el número de muestras analizadas incluyeron: (1) Mala calidad del registro fotográfico y por ende la incertidumbre para poder reconocerlo en un futuro; (2) errores de asignación de las muestras en la bitácora de campo; y (3) la posibilidad de que existiera contaminación cruzada entre muestras de diferentes individuos, ya sea por la manipulación de las muestras en campo o en el laboratorio. En la mayoría de los casos, los datos moleculares coincidieron con las observaciones de campo. A pesar de ello se detectaron algunos errores de asignación en el catálogo fotográfico; muestras con haplotipo o sexo diferente asignadas al mismo individuo, parejas madre-cría con haplotipos diferentes, etc. La mayoría de estos errores pudieron ser corregidos, pero todas aquellas muestras en las que no se tuvo la certeza para la asignación fueron excluidas del resto de los análisis. Un total de 21 muestras en las que se identificó en sexo y el haplotipo no pudieron ser asignadas a ningún individuo del catálogo fotográfico.

Evaluación de las diferencias en la descamación entre individuos

Al contrastar los datos moleculares con los datos del catálogo fotográfico se encontraron algunos casos en los que las muestras obtenidas para un mismo individuo en diferentes ocasiones resultaron ser de diferente histotipo y con diferente eficiencia de amplificación (Tabla VIII). Esto motivó una última serie de comparaciones para evaluar la posibilidad de que el muestreo estuviera sesgado a un grupo particular de individuos.

El rendimiento en la extracción de DNA no resultó significativamente diferente en los grupos de machos y hembras independientemente del histotipo que presentaran

(χ^2=9.74, p>0.05). Tampoco se observaron diferencias para la proporción de sexos entre los diferentes histotipos (χ^2=8.65, p>0.05).

Por último, se efectuó un prueba de bondad de ajuste permutada (ver Fayyad e Irani 2003) para identificar si algun haplotipo se encontraba asociado particularmente a algun histotipo o clase de sexo. Se realizaron 1000 permutaciones y los valores de χ^2 generados se compararon con el valor observado para evaluar la probabilidad de obtener valores mayores a este. La prueba resultó no significativa (χ^2=1.075, p>0.05). Como puede apreciarse en la Tabla IX, no parece haber evidencia que indique que alguno de los haplotipos ocurriese con mayor frecuencia en machos o hembras de cada categoría histológica.

Tabla VIII. Descamación diferencial en muestras del mismo individuo recolectadas en diferentes ocasiones.

Individuo	Histotipo	Identificación del sexo					Haplotipo
		B&P	F&L	T	A	*SRY*'''	
Bm0001	VI	NF	NF	NF	NF	ND	NF
Bm0001	I	hembra	hembra	ND	ND	ND	NPBW08
Bm0001	II	NF	hembra	ND	hembra	ND	NPBW08
Bm0001	III	NF	NF	NF	NF	NF	NPBW08
Bm0001	II	NF	NF	hembra	ND	hembra	NPBW08
Bm0060	I	NF	NF	ND	macho	macho	NPBW01
Bm0060	I	NF	NF	NF	NF	NF	NPBW01
Bm0060	II	NF	NF	NF	NF	macho	NPBW01
Bm0135	III	NF	NF	macho	macho	ND	NPBW02
Bm0135	III	macho	macho	ND	ND	ND	NPBW02
Bm0135	II	NF	NF	NF	NF	NF	BC
Bm0135	I	macho	macho	ND	ND	ND	BC
Bm0135	I	NF	NF	macho	macho	ND	NPBW02
Bm0136	III	hembra	hembra	ND	ND	ND	NPBW01
Bm0136	IV	NF	NF	NF	hembra	hembra	NPBW01
Bm0136	I	NF	NF	NF	NF	NF	NPBW01
Bm0136	II	NF	NF	NF	NF	hembra	NPBW01
Bm0136	I	NF	NF	hembra	ND	hembra	NPBW01

* El código del individuo corresponde al número que este tiene asignado en el catálogo fotográfico. Los códigos de los histotipos corresponden a aquellos de la Figura 3. Los códigos de identificación del sexo corresponden a los especificados en la Tabla V. Adicionalmente: NF = amplificación negativa o ambigua, ND = no existe el dato, y BC = baja calidad, asignación ambigua.

Tabla IIX. Distribución de frecuencias de haplotipos en hembras (F) y machos (M) para cada histotipo.

	Histotipos											
	I		II		III		IV		V		VI	
Haplotipo	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
NPBW01	8	7	8	5	4	3	6	4	5	4	26	20
NPBW02	3	2	2	1	1	1	2	2	1	0	8	9
NPBW03	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0
NPBW04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NPBW05	2	0	1	0	0	1	1	0	1	0	2	2
NPBW06	2	2	2	1	1	1	0	1	1	1	4	6
NPBW07	1	2	0	0	1	0	0	2	0	1	0	2
NPBW08	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NPBW09	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
NPBW10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
NPBW13	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
NPBW14	4	2	2	1	1	1	1	1	3	1	4	4
NPBW15	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
NPBW16	3	1	2	0	1	0	0	0	1	0	5	4
NPBW17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
NPBW18	2	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1

DISCUSIÓN

Aun cuando la tecnología del PCR permita la detección de marcadores moleculares a partir de cantidades ínfimas de tejido o DNA, la calidad y la naturaleza del tejido son factores críticos, cuyas limitaciones no pudieron solventarse al 100% a través de las distintas estrategias aquí implementadas. De la evaluación morfológica e histológica realizada en las muestras de piel descamada de ballena azul, resultó evidente que la cantidad y la calidad del DNA obtenido de este tipo de muestras fueron mucho menores de las que pudo obtenerse mediante la recolecta de biopsias. Esto, aunado a otras fuentes de error, se reflejó en la incertidumbre para asignación de algunas muestras a los individuos identificados, reduciendo el tamaño original de la muestra representativa de las ballenas azules de las agregaciones mexicanas del Pacífico Nororiental, y en consecuencia, la resolución para el análisis de los marcadores moleculares.

Aunque se ha reportado una eficiencia de muestreo de hasta el 95% de los individuos observados (Gendron y Mesnick 2001, Gendron 2002), la superficie de descamación fue extremadamente variable (0.02 – 50 cm^2) y las cantidades de DNA obtenidas generalmente muy bajas. Con base en la evidencia histológica, la presencia de células nucleadas en escasa en las muestras de piel descamada debido a que la ballena azul descama casi exclusivamente láminas de células muertas queratinizadas. Este patrón de descamación concuerda con observaciones previas en las que se ha comparado la piel descamada de otras especies de cetáceos como el cachalote (*Physeter macrocephalus*) y la beluga (*Delphinapterus leucas*) con la de la ballena azul (S. Southern com. pers.; Gendron y Mesnick 2001). Sin embargo, no existen estudios histológicos que permitan comparar si en otros misticetos el patrón de descamación es similar al observado en ballena azul. En los vertebrados terrestres los núcleos se reabsorben en las capas celulares subyacentes de la epidermis, el citoplasma de las células es reemplazado por queratina que solidifica cuando las células se rompen al ser empujadas hacia la superficie por el constante crecimiento del estrato germinativo, formando el estrato córneo. Ya que la piel descamada de las ballenas azules esta conformada en su mayor parte por queratina, los rendimientos en la extracción de DNA resultaron bajos y de menor calidad en comparación con los obtenidos para las biopsias. Las biopsias

contienen una gran cantidad de células nucleadas de las capas celulares basales de la epidermis y su contenido de queratina es mínimo (ver Fig. 3).

Ya que con base en las variables morfológicas pudieron distinguirse diferentes categorías de piel descamada, es posible que estas diferencias reflejen variaciones en la extensión y la tasa de descamación entre los individuos. Aunque aparentemente todos los individuos descaman, la forma en que lo hacen podría estar limitando la obtención de marcadores moleculares en cierto grupo de individuos. Sin embargo, para el caso de la ballena azul, aunque la superficie de piel que sufre la descamación es variable y con características histológicas particulares, esas diferencias no se reflejaron en la cantidad y la calidad de DNA obtenido. La única evidencia que sugiere que las diferencias podrían estar asociadas con el patrón de descamación fue la baja, pero significativa, correlación negativa entre la superficie de tejido descamado y el rendimiento de la extracción. Las muestras de piel descamada con mayor superficie fueron también las más pigmentadas (ver Fig. 2) y resultaron particularmente problemáticas durante la amplificación por PCR. Al descamar una mayor superficie de tejido muy pigmentado, las ballenas azules podrían estar respondiendo a un trauma causado por el ambiente que acelera la tasa de renovación del tejido epidérmico; de forma similar a lo que sucede cuando sufrimos quemaduras de sol. La baja frecuencia de este tipo de tejido en las muestras no permitió realizar mayores comparaciones.

Las diferencias en la eficiencia de amplificación por PCR entre las biopsias y la piel descamada reflejaron directamente la calidad y la cantidad de DNA. A pesar de que muchas muestras en las que no se detectó la presencia de DNA pudieron ser amplificadas, la eficiencia global en la obtención de los marcadores nucleares y mitocondriales fue claramente inferior para la piel descamada. Esto resultó particularmente evidente para los marcadores nucleares empleados en la identificación molecular del sexo. A diferencia de los genes nucleares, de los que existe una sola copia por célula, existe una copia de cada gen mitocondrial en cada mitocondria de la célula. La probabilidad de que en una muestra con bajas concentraciones o baja calidad de DNA existan suficientes copias íntegras del gen mitocondrial blanco es mucho mayor que en los genes nucleares (ver Bérubé y Palsbøll 1996). Las incongruencias detectadas

entre algunas muestras y sus réplicas en la identificación del sexo, muy probablemente se debieran a estas diferencias en la abundancia de ambos tipos de DNA (amplificación diferencial de alguno de los marcadores). Otra posible explicación para estas incongruencias podría ser la presencia de inhibidores de la polimerasa como la melanina. La melanina es un pigmento universal en la epidermis de los vertebrados y su presencia en muchas de las muestras, tanto en piel descamada como en biopsias, fue evidente en los cortes histológicos (ver Fig. 3). Sin embargo, las biopsias no presentaron problemas de incongruencia entre réplicas, y no se encontró evidencia de diferencias en el rendimiento de extracción o en la eficiencia de amplificación entre los histotipos de piel descamada, por lo que la primera explicación resulta más probable.

A pesar de que se implementaron diferentes métodos y estrategias que permitieron incrementar la eficiencia de la amplificación de los marcadores moleculares, el mayor porcentaje de muestras en las que fue posible asignar sin ambigüedades el sexo y el haplotipo correspondió a las biopsias (ver Tabla V). El hecho de que la estrategia que aumentó notablemente la eficiencia en el caso de los marcadores nucleares (identificación del sexo) fue el utilizar secuencias blanco de amplificación más cortas, confirmó que la otra principal limitante del uso de la piel descamada como método de muestreo sistemático en el estudio de la ballena azul es la baja calidad de DNA que puede obtenerse a partir de ésta. Este tipo de problemas es común en el genotipado (marcadores nucleares) con muestras no invasivas y se ha reportado como una fuente importante de sesgo en el análisis de marcadores moleculares nucleares (Gagneux *et al.* 1997, Taberlet *et al.* 1999). De hecho, en un análisis preliminar para la evaluación de *loci* microsatélites en el mismo grupo de muestras empleadas en el presente trabajo (Enríquez *et al.* 2001), se detectaron numerosos casos de amplificación diferencial de los alelos (*allelic dropout*) que limitó el uso de estos marcadores.

En la comparación de la distribución de los haplotipos entre las diferentes categorías de piel descamada y el grupo de biopsias, la proporción de individuos de ambos sexos en cada grupo no mostró un patrón que pudiera reflejar que los marcadores moleculares estuviesen amplificando preferencialmente en uno de los sexos o que la descamación se presentara en un grupo particular de individuos (ver Tabla IX). Por lo tanto, ante la falta

de evidencias de sesgo en la eficiencia de amplificación asociada con un grupo particular de individuos, se consideró que la recolecta de piel descamada representa una muestra aleatoria de los componentes poblacionales de ballena azul en las agregaciones invernales mexicanas del Pacífico Nororiental. Lo anterior concuerda con las observaciones de Gendron y Mesnick (2001), quien reporta no haber detectado diferencias en la descamación entre hembras con cría, hembras no lactantes e individuos solitarios, así como entre las ballenas observadas cerca de la costa y en aguas oceánicas, y en aguas con diferente temperatura superficial.

Considerando la alta congruencia entre las observaciones de campo del catálogo fotográfico con los datos moleculares, el número de errores detectados que no pudieron ser corregidos fue mínimo (21 asignaciones de un total de 325).

A pesar de que las muestras de piel descamada exhibieron una menor eficiencia, al incluir estas muestras se pudieron asignar 86 individuos más de los se asignaron exclusivamente considerando las biopsias, con lo que indudablemente la resolución del análisis de la población de ballena azul a través de marcadores moleculares se incrementará. Sin embargo, recapitulando la comparación de las estrategias de muestreo en términos de: (1) los costos del equipo necesario para el muestreo, (2) el esfuerzo invertido para la recolecta en el campo, (3) el rendimiento y la calidad del DNA, (4) los costos y el tiempo que se invierte en el laboratorio para la detección de los marcadores moleculares, (5) la eficiencia global de asignación a los individuos, y (6) la confiabilidad o resolución de los datos generados, la biopsias es, sin lugar a duda, la mejor opción para la obtención de datos genéticos de las agregaciones de ballena azul (Tabla X).

Tabla X. Comparación cualitativa global entre las estrategias de muestreo semi-invasivo y no invasivo para el caso de la ballena azul.

Etapa/Proceso	Piel descamada	Biopsia
Campo		
Eficiencia de recolecta	Excelente	Buena
Potencial daño a los animales	Nulo	Bajo
Costo del equipo	Bajo	Moderado
Laboratorio		
Eficiencia en la extracción	Baja	Buena
Cantidad de DNA	Baja	Buena
Calidad del DNA	Media-Baja	Excelente
Eficiencia en la amplificación y secuenciación	Media	Excelente
Ensayos múltiples	Alto	Bajo
Uso de aditivos	Necesario	No necesario
Tiempo para la obtención de resultados	Alto	Bajo
Costo	Alto	Moderado
Potencial de análisis moleculares futuros	Bajo	Bueno
Eficiencia en la asignación individual		
Correspondencia muestra-registro fotográfico	Alta	Alta

Consideraciones finales

Recientemente se ha considerado que las ballenas azules del llamado stock México/California muestran signos evidentes de recuperación y que podrían ser recatalogadas y excluidas de la categoría de especie/población amenazadas (ver Perry *et al.* 1999). Sin embargo, el plan de recuperación de esta especie, formulado en 1998 por el National Marine Fisheries Service de E.U.A., plantea como uno de sus principales objetivos la obtención de datos moleculares confiables que permitan delimitar el stock para planear la estrategia adecuada de conservación y manejo de la especie (ver Reeves *et al.* 1998). Como se discutirá en el siguiente capítulo no se cuenta aún con información precisa sobre los límites de este stock y se desconoce su relación con las ballenas azules de otras áreas del Pacífico Norte.

Las consecuencias del uso de un muestreo no invasivo, sin una extensa y profunda evaluación preliminar de los errores asociados con la calidad y la cantidad del DNA,

pueden ser particularmente serias cuando los datos son la base de estudios relacionados con la conservación y el manejo de especies amenazadas o protegidas. Aun cuando el muestreo no invasivo ha mostrado ser una atractiva alternativa para evitar la interacción con los animales y no alterar su comportamiento, no existen evidencias de ningún tipo que indiquen que la recolecta de biopsias tenga un efecto mayor en el comportamiento de los misticetos (Brown *et al.* 1991, Weinrich *et al.* 1991). Por lo tanto, resultaría poco práctico invertir recursos y esfuerzo en la recolecta y el análisis de la piel descamada, cuya menor eficiencia limita la obtención de resultados confiables para un número importante de las muestras; más aún sabiendo de antemano que existe una efímera oportunidad de recolectar una biopsia.

Adicionalmente, uno de los aspectos más relevantes que debe considerarse en futuros estudios es el hecho de que, indudablemente, los avances tecnológicos en el campo de la biología molecular proveerán a corto plazo nuevas herramientas moleculares que podrían ser aplicadas en el campo de la ecología molecular. En este sentido, a pesar de que las muestras de piel descamada de ballena azul permitieron la identificación del sexo y la asignación de los haplotipos en un número considerable de muestras, el potencial de información que podría obtenerse con nuevos marcadores de DNA o con el análisis de otras moléculas sería mínimo. El tejido adiposo subcutáneo que puede obtenerse al recolectar biopsias en los cetáceos ha mostrado ser una fuente importante de moléculas que tienen el potencial para ser empleadas en estudios sobre la alimentación (ácidos grasos e isótopos estables), metabolismo y estado fisiológico (hormonas y contaminantes), así como de edad, crecimiento y citogenética (ver Hoezel 1991, George *et al.* 1999, Kastelle *et al.* 2003, Smit 2003). Sobre estas bases, mi recomendación es emplear como método primario de muestreo la recolecta de biopsias en futuros estudios con esta especie.

Dado que el equipo y el esfuerzo necesarios para recolectar piel descamada son mínimos, esta podría recolectarse eventualmente. En conjunto con las observaciones de campo, el análisis histológico de la piel descamada podría aportar información adicional sobre el estado fisiológico de los animales y ser empleada solo como última alternativa en el análisis molecular de DNA cuando no se cuente con la biopsia de algún individuo.

2 Identidad genética de las agregaciones de ballena azul del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California.

RESUMEN

Los misticetos siguen un patron migratorio estacional entre sus zonas de alimentación en altas latitudes, donde se distribuyen durante el verano, y las zonas de baja latitud en las que realizan sus actividades reproductivas durante en el invierno. No obstante, las rutas y los destinos migratorios de la ballena azul no han podido ser establecidas con precisión; en parte debido a que la mayor parte de los estudios de esta especie han sido de carácter local, y por otra parte debido a sus hábitos oceánicos. Por lo anterior, los límites o la intensidad del flujo de individuos entre las agregaciones de esta especie permanecen inciertos. Para el caso de las agregaciones de ballena azul en el Pacífico Nororiental, las evidencias obtenidas a traves de estudios de marcaje-recaptura, detección bioacústica, estimaciones de abundancia y algunos datos genéticos preliminares, han sugerido que las ballenas azules que ocurren entre las costas de California y el Domo de Costa Rica conforman una stock independiente de aquellas otras agregaciones del Pacífico. A partir de muestras de piel de individuos de ballena azul recolectadas en el Golfo de California y la costa occidental de la península de Baja California, en el presente capítulo se investigó la identidad genética de las agregaciones mexicanas de la especie. La filogenia inferida a partir de las secuencias de la región control del DNA mitocondrial, la identificación molecular del sexo y la revisión del historial de avistamientos de las ballenas azules fotoidentificadas permitió reconocer dos grupos de linajes maternos, marcadamente divergentes, presentes en las agregaciones invernales mexicanas. Sin embargo no se encontró evidencia de una estructura espacial o temporal de los individuos pertenecientes a dichos grupos. El análisis filogenético con la adición de secuencias de ballenas azules de otras regiones geográficas sugiere que las agregaciones mexicanas actualmente se encuentran conformadas por individuos de al menos dos eventos de flujo hacia el Pacífico Nororiental; tal escenario evolutivo, que también puede ser inferido para los linajes homólogos de otros balenoptéridos, sustentan esta idea. La proporción de sexos, ligeramente sesgada hacia las hembras, aunada a la ocurrencia de crías en el Golfo de California para ambos grupos de linajes, confirman la importancia de las agregaciones mexicanas como hábitat crítico y estrategico para la recuperación de la población de ballena azul. Más aún, considerando que los niveles relativamente bajos de diversidad genética detectados en el presente estudio, así como la ausencia de linajes correspondientes a la epoca de las capturas comerciales en las muestreos más recientes, muy probablemente sean reflejo de la intensa explotación que sufrió la especie en el Pacífico Nororiental.

2 Genetic identity of blue whale aggregations from the Gulf of California and the west coast of the Baja California Peninsula.

ABSTRACT

Mysticetes follow a seasonal migration pattern between their high latitude feeding grounds, where they spend the summer, and their winter calving and breeding grounds located at lower latitudes. However, migratory routes and destinations of the blue whale has not been clearly established; mainly due to the local character of most studies on this species, but perhaps also to their more oceanic habits. Therefore, the limits of blue whale aggregations and the extent of individual interchange between those aggregations remain uncertain. Particularly, for the Northeast Pacific blue whale aggregations, there are strong evidences (mark-recapture, bioacoustic detection, abundance estimation and preliminary genetic data sets) suggesting a stock which extents from California to the Costa Rican Dome and distinguishable from other aggregations of the species in the Pacific Ocean. From skin samples collected at the Gulf of California and the west coast of Baja California Peninsula, this chapter asses the genetic identity and structure of blue whale Mexican aggregations. The inferred phylogeny for mitochondrial DNA control region, as well as gender identification and historical sighting history of photoidentified individuals lead to the recognition of two groups of maternal lineages using the study area as a wintering ground. However there was no evidence of spatial or temporal structure of individuals of those lineages. A phylogenetic analysis which incorporated sequences of blue whales from other geographic regions suggest that mexican aggregations are represented by individuals from two independent colonization events to the Northeast Pacific; such an evolutionary scenario can also be infered from homologous lineages of other balaenopterids, supporting this hypotesis. The slighltly skewed sex-ratio to females, in addition to the ocurrence of calves for both group of lineages at the Gulf of California, confirm the importance of the study area as a critical and strategic habitat for the recovery of blue whale population. Moreover if we consider that the relatively low levels of genetic diversity detected in the present study, as well as the current absence of lineages from commercial whaling samples, are probably a direct consequence of the intensive explotaition of the species in the Northeast Pacific.

INTRODUCCIÓN

Entender los procesos de fragmentación y diferenciación genética de las poblaciones de misticetos, así como sus relaciones filogeográficas, resulta particularmente complejo debido a que algunas especies exhiben amplias distribuciones, en las que prácticamente no existe ninguna barrera geográfica evidente, y tienen altas capacidades de movimiento.

La mayoría de los misticetos se alimentan durante el verano en las fértiles y frías aguas de altas latitudes después de una extensa migración desde latitudes templado-cálidas, donde pasan el invierno y realizan sus actividades reproductivas. A pesar de que las rutas y los destinos migratorios de las ballenas azules no han logrado establecerse con precisión, los registros de las capturas comerciales del siglo pasado y los patrones de distribución actual sugieren que, tanto en el Pacífico Nororiental como en otras partes del mundo, los movimientos de esta especie se ajustan en general al patrón mencionado (ver Omura 1955, Tomilin 1967, Tønnessen y Johnsen 1982, Yochem y Leatherwood 1985, Reeves *et al.* 1998, Perry *et al.* 1999).

La migración es una fuerza evolutiva de gran importancia en el proceso de diferenciación genética de las poblaciones (Tiedemann *et al.* 2000) y en los misticetos, como en muchos otros mamíferos, es común que exista migración diferencial por sexos y que sean las hembras las que muestran filopatria[24] (p.e. Baker *et al.* 1993, Palsbøll *et al.* 1995). Esta característica tiene un profundo impacto en la historia evolutiva de las especies y se refleja en la aparición de unidades poblacionales discretas dentro del área de distribución de las especies (ver Tiedemann *et al.* 2000, Avise 2000). Tal es el caso de aquellas poblaciones de misticetos con patrones migratorios predecibles (p.e. en la ballena gris *Eschrichtius robustus*, y la ballena jorobada *Megaptera novaeangliae*), en los que el uso de marcadores moleculares de DNA mitocondrial ha evidenciado una distribución heterogénea de los linajes maternos y cierto grado de estructuración

[24] La filopatria puede entenderse como la fidelidad por un área particular, generalmente al sitio de nacimiento, en la que los individuos se agregan permanente o temporalmente. Estas marcadas preferencias por un hábitat pueden resultar en una distribución heterogénea del acervo genético de las poblaciones.

filopátrica asociada con las zonas invernales de reproducción de sus poblaciones (p.e. Baker *et al.* 1993, Palsbøll *et al.* 1995, Goerlitz *et al.* 2003).

A través del análisis de un marcador genético neutral, el presente capítulo explora la distribución espacial y temporal de los linajes maternos en las agregaciones mexicanas de ballena azul con el objeto de evaluar los niveles de diversidad genética y determinar si dichas agregaciones se encuentran estructuradas genéticamente.

Antecedentes

La información reunida durante la época de la captura comercial de las ballenas azules en el Pacífico Norte, así como la distribución actual sugerida por sus avistamientos y detecciones acústicas, sugieren la existencia histórica de al menos seis áreas de agregación importantes (ver Oshumi y Wada 1972, Rice 1986, Reilly y Thayer 1990, Reeves *et al.* 1998, Perry *et al.* 1999, Stafford *et al.* 2001, Moore *et al.* 2002): (1) Sur de Japón, (2) norte de Japón/Kurils/Kamchatka, (3) Islas Aleutianas, (4) la porción sureste del Golfo de Alaska, (5) California/México y (6) la zona Domo de Costa Rica. Sin embargo, debido a la escasa información sobre las rutas migratorias y las zonas donde esta especie pasa el invierno, estas agregaciones deben considerarse tan sólo como subpoblaciones putativas ya que se desconoce la intensidad del flujo de individuos entre ellas.

En respuesta a esta incertidumbre, la Comisión Ballenera Internacional (IWC [25]; International Whaling Commision) reconoce a las ballenas azules del Pacífico Norte como un solo stock (ver Donovan 1991). Sin embargo, es importante resaltar que el criterio que se usa para el establecimiento de este único stock es meramente operacional y su fundamento carece de bases biológicas (ver Perry *et al.* 1999).

[25] La Comisión Ballenera Internacional (IWC) es el organismo internacional que coordina y administra las actividades orientadas a la conservación y el manejo de las poblaciones de cetaceos con miras a obtener la información necesaria para un aprovechamiento sustentable de estas especies. Promueve, coordina y patrocina la recolecta de información a través de la investigación y la publicación de los resultados de las mismas. Uno de los aspectos más importantes en los que esta involucrada la IWC es la delimitación de los stocks. La información que se reune acerca de la abundancia, distribución y estructura genética de las especies es reevaluada constantemente para establecer los limites geograficos y el estado actual de dichos stocks.

Con base en una importante cantidad de datos bioacústicos, se han encontrado sólidas evidencias que indican que las diferencias entre los sonidos producidos por las ballenas azules del Pacífico Noroccidental (Watkins *et al.* 2000, Moore *et al.* 2002) y el Pacífico Nororiental (Rivers 1997, Stafford *et al.* 1999, 2001), pudiesen ser reflejo de la existencia al menos dos stocks en el Pacífico Norte.

A través de un plan de prospección y seguimiento anual de los recursos naturales marinos del Pacífico Nororiental, el National Marine Fisheries Service de E.U.A, ha establecido criterios fundamentados en la discontinuidad en la distribución de esta especie, y plantea la existencia de dos stocks en el Pacífico Nororiental: el stock hawaiano y el stock México/California (ver Perry *et al.* 1999). Las ballenas azules que ocurren en aguas hawaianas han sido detectadas exclusivamente mediante prospecciones acústicas (Northorp *et al.* 1971, Thompson y Friedl 1982), pero la persistencia de estos registros durante verano e invierno podría indicar que esta zona representa una zona de agregación invernal de alguna o varias de las subpoblaciones putativas del Pacífico Norte. En lo que respecta al denominado stock México/California, en el que se han concentrado la mayor parte de los estudios, la información que se ha reunido recientemente pone en duda la designación de este grupo como un stock independiente de aquellas agregaciones en otras regiones del Pacífico Nororiental:

(1) Los datos bioacústicos apuntan hacia la ocurrencia de un solo grupo en el Pacífico Nororiental que se extiende desde Vancouver hasta el Domo de Costa Rica, y probablemente más allá del ecuador (ver Stafford *et al.* 1999, 2001).

(2) Las marcas satelitales (telemetría) y los estudios de fotoidentificación han evidenciado que existen movimientos no sólo entre el Golfo de California y la costa Occidental de la Península de Baja California (ver Gendron 2002), así como entre estas dos zonas y California (ver Calambokidis *et al.* 1990), sino también entre California y el Domo de Costa Rica (ver Calambokidis *et al.* 1995, Chandler *et al.* 1999, Mate *et al.* 1999). Dichos movimientos se ajustan al patrón temporal de movimientos observado entre México, donde permanecen durante el invierno y primavera, y California, en donde pasan el verano y gran parte del otoño.

(3) La presencia de animales en zonas oceánicas frente a la punta de la península de Baja California entre junio y octubre (Mangels y Gerrodete 1994, Barlow *et al.* 1997), incluida una pareja madre-cría en la zona oceánica durante agosto (ver Gendron 2002), que indican un desfase en el patrón migratorio postulado para el stock México/California.

(4) El Golfo de California representa la única agregación invernal conocida en la que ocurren actividades relacionadas con la crianza, y muy probablemente con otros aspectos reproductivos de la especie (Gendron y Zavala-Hernández 1995, Gendron 2002). Sin embargo, el número de ballenas azules estimado por Gendron (2002) el Golfo, representa menos de la tercera parte del número estimado en California (ver Calambokidis y Steiger 1994, Barlow y Gerrodete 1996, Barlow 1997, Calambokidis y Barlow 2004). Por ende, a pesar de la alta frecuencia de avistamientos de hembras lactantes y la alta tasa de retorno anual de individuos jóvenes y hembras en el Golfo (ver Gendron 2002), deben existir otras zonas de agregación invernal que no han sido detectadas.

(5) El notable incremento en la abundancia de las ballenas azules en aguas de California durante los últimos 20 años (Calambokidis *et al.* 1989, Calambokidis y Steiger 1994) que, aunque ha sido interpretado como un signo positivo de recuperación (ver Perry *et al.* 1999), contrasta con la también reciente ausencia de avistamientos en zonas donde la especie era abundante (Forney *et al.* 1995b). Históricamente la costa occidental de Baja California (durante primavera-otoño) ha representado una zona importante y aparentemente estable de alimentación para las ballenas azules (Scammon 1874, Rice 1966, Tønnessen y Johnsen 1982, Gendron 2002). Por el contrario, las grandes agregaciones observadas en aguas de California (durante verano-otoño) durante los últimos años (ver Forney *et al.* 1995a, Croll *et al.* 1998, Fiedler *et al.* 1998, Calambokidis y Barlow 2004), contrastan con la abundancia de esta especie en la década de los 70's (ver Rice 1974). Este incremento en la abundancia pudiera ser entonces más una respuesta a un cambio en la distribución reciente de las ballenas azules que hace que coincidan ahí individuos de más de una zona de agregación invernal.

(6) Las diferencias morfométricas entre los individuos fotografiados en aguas de California y el Domo de Costa Rica (Gilpatrick *et al.* 1995, 1999), con aquellos fotografiados y los de las agregaciones del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California (Ortega-Ortíz 2004), plantean la posible existencia de dos grupos distintos de ballenas azules en el Pacífico Nororiental. De acuerdo con los resultados de Gilpatrick y colaboradores (*op cit.*) las ballenas azules del Pacífico Nororiental presentan proporciones corporales similares a las de la ballena azul pigmea (*Balaenoptera musculus brevicauda*); subespecie que se distribuye en el hemisferio sur. En contraste, los resultados de Ortega-Ortíz (2004) indican que las ballenas de las agregaciones mexicanas corresponden a la subespecie del hemisferio norte, *Balaenoptera musculus musculus*.

(7) Y por último, los datos genéticos generados recientemente por Conway y sus colaboradores (2003) evidencian, con base en el análisis de marcadores nucleares, homogeneidad entre las agregaciones de California, México, Domo de Costa Rica, Islas Galápagos y la parte norte de Chile.

En resumen, la extensión y por ende los límites del llamado stock México/California parecen ser mucho más amplios pero aún inciertos.

Las muestras de piel recolectadas de individuos presentes en aguas del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California representan una excelente oportunidad para buscar evidencias, a través del análisis filogenético de los linajes maternos, de que otras agregaciones invernales coincidan en California. Las altas tasas de retorno y el uso preferencial de la zona costera del la porción sur del Golfo de California por parte de las hembras lactantes parecen indicar que, como sucede en otras especies de misticetos (p.e. Baker *et al.* 1993, Palsbøll *et al.* 1995), las ballenas azules exhiben un patrón migratorio filopátrico.

Si el Golfo de California representa en realidad la única zona invernal del grupo de ballenas que pasa el verano en aguas de California, entonces solamente los linajes maternos que frecuentan el Golfo deberán estar representados a lo largo de la costa occidental de la Península. Por el contrario, si los linajes maternos que ocurren en la costa occidental son los mismos que ocupan el Golfo, entonces individuos de agregaciones más oceánicas o más norteñas podrían estar concentrándose en California durante el verano.

MATERIALES Y MÉTODOS

De acuerdo con los resultados del primer capítulo, el muestreo efectuado en las agregaciones de ballena azul del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California no parece haber estado sesgado hacia cierto grupo en particular de individuos. Por lo tanto, se consideró que la muestra es representativa de las ballenas azules presentes en las agregaciones que ocupan las aguas adyacentes a la Península de Baja California durante invierno y primavera (ver Gendron 2002). Adicionalmente, con el objeto de evaluar si el tamaño de muestra era adecuado (ver Taylor y Chivers 1997), se simuló un muestreo aleatorio con reemplazo y réplicas para diferentes tamaños de muestra.

Frecuencia relativa de los haplotipos

A partir de los 189 individuos identificados (ver Anexo B), sexados molecularmente y asignados a un haplotipo materno en el capítulo anterior, se calculó la frecuencia relativa de los haplotipos en las agregaciones por medio de un estimador insesgado usando el programa Arlequin v2.000 (Schneider *et al.* 2000),

Proporción de sexos

La frecuencia relativa de individuos machos y hembras fue calculada directamente a partir del número de individuos sexados mediante el análisis molecular (ver Anexo B). Posteriormente se recalculó dicha proporción considerando por separado a las crías. Finalmente, la proporción se sexos por zona y por año se calculó a partir del historial de avistamientos de los individuos fotoidentificados en los que pudo determinarse el sexo molecularmente.

Índices de diversidad genética intrapoblacional

El cálculo de los índices diversidad genética se efectuó utilizando el programa del programa Arlequin v2.000 (Schneider *et al.* 2000). La diversidad genética (H) se calculó como la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar a partir de la muestra sean

diferentes (Nei 1987). Se calcularon también el número promedio de diferencias pareadas (π) y la diversidad nucleotídica promedio (π_n) entre todos los individuos (Tajima 1993).

Distancia genética entre haplotipos

El cálculo de las distancias genéticas y la construcción de los árboles filogenéticos se realizaron en el programa MEGA v3.0 (Kumar *et al.* 2004).

Con base en las secuencias editadas obtenidas del alineamiento efectuado en el programa MultAlin en el capítulo anterior (ver Anexo C), se calcularon las distancias genéticas entre todos los linajes maternos (haplotipos) presentes en las agregaciones mexicanas usando el modelo de Tamura y Nei (1993). Este modelo corrige las distancias interhaplotípicas mediante un modelo con distribución Gamma[26] que considera una tasa diferencial de sustituciones entre nucleótidos y desigualdad en la proporción de estos últimos; modelando de esta forma las tasas evolutivas entre sitios homólogos en las secuencias. El parámetro de forma α de la distribución Gamma (Γ shape parameter alpha) se calculó por medio del programa GZ_{gamma} (Gu y Zhang 1997) y los otros descriptores (frecuencia de nucleótidos, número de transversiones y transiciones) se calcularon a través del programa MEGA v3.0.

Análisis filogenético

Como primer paso para el análisis de la filogenia entre los haplotipos se seleccionó el método de la mínima evolución (ME; ver Rzhetsky y Nei 1992) como criterio de optimización (ver Swofford *et al.* 1996). Este método filogenético, muy parecido al de parsimonia, consiste en transformar las diferencias observadas entre haplotipos en una matriz de distancias pareadas con la que se construye un árbol filogenético en el que la

[26] En el caso del análisis de secuencias nucleotídicas la distribución Gamma esta determinada por la tasa de variación del número esperado de sustituciones nucleotídicas en cada sitio. El parámetro de forma (α) de la distribución Gamma tiende a infinito cuando no existe variación en número de sustituciones entre sitios.

longitud de las ramas es optimizada; las distancias entre los haplotipos en el árbol se optimizan haciendo que se ajusten lo más posible a las de la matriz de distancias.

La estrategia empleada en la búsqueda para la topología más aproximada al criterio de optimización fue la de agrupamiento del vecino más cercano (Neighbor-Joining [NJ]; ver Saitou y Nei 1987). El método NJ es una versión simplificada del método ME, en el que a diferencia de este último, se produce un árbol no anclado o enraizado ya que no requiere del supuesto de una tasa constante de evolución, por lo que requiere de la inclusión de un taxón externo (ver Nei y Kumar 2000). Para todos los casos se condicionó la construcción del árbol con un nivel de búsqueda entre vecinos más cercanos de 2.0 (close-neighbor-interchange) y una retención de 100 árboles o posibles topologías. La robustez de la topología optimizada de la filogenia se evaluó a partir de 10,000 réplicas generadas por el método de remuestreo de bootstrap[27].

Adicionalmente se generó la red de la mínima separación (MSN; minimum spanning network; ver Excoffier *et al.* 1992) mediante el programa Arlequin v2.000. Este análisis estima la relación entre los haplotipos a partir de una matriz de distancias cuadradas entre los haplotipos. El análisis por MSN sigue el método de Wagner para la construcción de árboles parsimoniosos (ver Felsenstein 1989, Swofford y Olson 1990, Ravindra *et al.* 1993) pero ubica los haplotipos como nodos de interconexión en la red en lugar de usarlos como la punta de las ramas en un árbol filogenético. Su representación gráfica permite inferir si existe un patrón de distribución espacial para los haplotipos, por lo que ha sido ampliamente usada para el análisis de datos moleculares en estudios biogeográficos (p.e. Excoffier *et al.* 1992, Encalada *et al.* 1996, Redenbach y Taylor 1999).

Para establecer la identidad de las agregaciones se efectuó un nuevo análisis filogenético en el que se incluyeron, además de los haplotipos de las agregaciones

[27] El método de remuestreo por bootstrap consiste en generar submuestras aleatorias con reemplazo a partir de la muestra original, cada submuestra es analizada independientemente y la significancia se evalúa en función del número de veces que el resultado fue el mismo. De esta manera puede evaluarse si el agrupamiento es consistente o si hay una gran variedad de agrupamientos igualmente significativos.

mexicanas, los haplotipos definidos a partir del análisis de secuencias homólogas disponibles en el GeneBank para la especie. En el Anexo D se detallan las fuentes y los números de acceso al GeneBank de las secuencias empleadas.

Debido a que la adición de un solo grupo externo frecuentemente identifica incorrectamente la posición basal del grupo interno en las reconstrucciones filogenéticas (Maddison *et al.* 1994, Smith 1994), se incluyeron varios grupos externos. Para ello se empleó un conjunto de 417 secuencias homólogas, representando a 9 especies de misticetos, disponibles en el GeneBank (ver Anexo D).

La porción hipervariable del genoma mitocondrial de los cetáceos está caracterizada por la presencia de bloques de deleción con marcadas diferencias en longitud (Arnason *et al.* 1993). Por lo tanto, decidí emplear para este caso un alineamiento estocástico para regiones no codificantes parametrizado por la distribución de frecuencia de los eventos de inserción y deleción, así como de la tasa de ocurrencia de los mismos en relación a las sustituciones nucleotídicas mediante el programa MCALIGN (Keightley y Johnson 2004).

El análisis filogenético interespecífico se realizó con el mismo modelo de sustitución nucleotídica y los mismos criterios de optimización y agrupamiento empleados en el análisis intraespecífico.

Análisis de la estructura poblacional

Para determinar la posible subdivisión de la población se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) jerárquico, por medio del programa Arlequin v2.000 (Schneider *et al.* 2000), usando el índice de fijación de Wright, *F*-estadístico (F_{ST}; ver Wright 1965; Weir y Cockerham 1984), y su estadístico análogo Φ (Φ_{ST}; ver Excoffier *et al.* 1992). A diferencia de F_{ST}, en el cálculo de Φ_{ST} se incorpora la información sobre la distancia genética entre los haplotipos (el número de sitios variables o mutaciones) y no sólo la frecuencia de estos.

El nivel de significancia de los componentes de la varianza asociados a los diferentes niveles de estructura genética, se calculó por medio de 16,000 permutaciones no-paramétricas (ver Excoffier *et al.* 1992). Usando un nivel de significancia al 95% (α=0.05) y bajo la hipótesis nula de panmixia, cuando p<0.05 se consideró una población estructurada.

Los criterios empleados para formar los grupos de comparación se basaron en el historial de individuos de ballenas azules fotoidentificadas. Las comparaciones que se realizaron fueron las siguientes: (1) Entre años y entre localidades para evaluar diferencias en el uso del hábitat por parte de las agregaciones, (2) entre machos y hembras adultos para explorar segregación por sexos y aspectos sobre la estrategia reproductiva, (3) entre hembras lactantes y no lactantes para evaluar la importancia de las agregaciones con respecto a las actividades de crianza, y (4) entre los grupos filogenéticos para evaluar la estructura de las agregaciones en la escala evolutiva.

RESULTADOS

Como se mencionó en primer capítulo, la asignación de haplotipos maternos con base en la secuencias del DNA mitocondrial y la identificación molecular del sexo permitió reconocer 189 individuos del catálogo fotográfico de ballenas azules; representando cerca del 47% del total de individuos fotoidentificados hasta la fecha (D. Gendron com. pers.). Dentro de las muestras que no pudieron ser asignadas a ningún individuo (identificación ambigua del sexo, mala calidad del registro fotográfico o discrepancias en la asignación de la muestra a los individuos), se detectó un haplotipo más, representado por un solo individuo, que decidí incluir en el análisis genético dada la certeza de que representa a un individuo diferente de los 189 ya identificados (ver Tabla VII, capítulo 2; Anexo C). Por lo tanto, los análisis filogenéticos y de estructura genética realizados en el presente capítulo incluyen 17 haplotipos y 190 individuos.

La composición nucleotídica promedio entre las secuencias de ballena azul resultó en una proporción ligeramente sesgada hacia las pirimidinas (T= 31.3%; C= 22.8%; A= 31.4%; G= 14.4%). El alineamiento de las secuencias se realizó sin necesidad de incluir inserciones o deleciones y no se detectó heteroplasmia en la composición nucleotídica o en el tamaño del fragmento.

De los 500 pares de bases analizados, 20 sitios presentaron sustituciones; todas ellas transiciones (65% C/T y 35% A/G). Sólo 13 de los 20 sitios variables resultaron filogenéticamente informativos (Tabla XI).

La frecuencia relativa de los haplotipos fue heterogénea, con cinco de los haplotipos representando al 80% de los individuos muestreados, mientras que cinco haplotipos más estuvieron representados, cada uno, por un solo individuo (Tabla XII).

Tabla XI. Sitios de segregación filogenéticamente informativos para los haplotipos mitocondriales de ballena azul del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California, México.

	Sitios variables*																			
Haplotipo	074 *	147 *	148 *	157 *	164	165 *	168 *	172	181	213	251 *	267 *	320	325 *	343 *	347 *	350	368 *	369	379 *
NPBW01	G	T	T	T	T	C	C	A	A	C	C	C	G	A	T	G	A	C	C	T
NPBW02	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW03	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW04	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW05	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	G	.	.	.
NPBW06	.	.	C	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.
NPBW07	.	.	C	C	.	T	T	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	T	.	.
NPBW08	.	.	C	C	.	T	T	.	.	T	T	.	.	G	C	.	.	.	.	.
NPBW09	.	.	C	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW10	.	.	C	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.
NPBW11[a]	.	.	.	C	.	T	T	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	T	.	.
NPBW13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C
NPBW14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
NPBW15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
NPBW16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	C	A	.	.	.	.
NPBW17	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW18	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	T	.

* Los sitios marcados con un asterisco corresponden a aquellos parsimoniosamente informativos. El número de los sitios refiere a los de la Tabla VII y corresponden a los sitios 15,826 a 16,324 de la secuencia completa del genoma mitocondrial de la ballena azul (Arnason y Gullberg 1993; GeneBank NC_001601).

[a] EL haplotipo NPBW11 se añadió en este análisis aunque pertenece a un individuo no identificado. Al representar un haplotipo único se tuvo la certeza de que es un individuo distinto al resto.

Tabla XII. Frecuencia relativa (*fi*) de los haplotipos maternos de ballena azul de las agregaciones mexicanas.

Haplotipo	Individuos	*fi*
NPBW01	76	0.400 (0.036)
NPBW02	22	0.116 (0.023)
NPBW03	2	0.011 (0.007)
NPBW04	1	0.005 (0.005)
NPBW05	8	0.005 (0.015)
NPBW06	17	0.089 (0.021)
NPBW07	8	0.042 (0.015)
NPBW08	2	0.011 (0.007)
NPBW09	1	0.005 (0.005)
NPBW10	2	0.011 (0.007)
NPBW11	1	0.005 (0.005)
NPBW13	2	0.011 (0.007)
NPBW14	26	0.137 (0.025)
NPBW15	1	0.005 (0.005)
NPBW16	11	0.058 (0.017)
NPBW17	1	0.005 (0.005)
NPBW18	9	0.047 (0.015)

* Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar del estimador insesgado de frecuencia.

Diversidad genética

A pesar de las marcadas diferencias en la frecuencia relativa de los haplotipos, la diversidad haplotípica estimada y su desviación estándar fue de 0.7943 ± 0.0232; valor que refleja la ocurrencia de más de un haplotipo común en las agregaciones mexicanas. Por su parte, el número promedio de diferencias nucleotídicas en las comparaciones pareadas y su desviación estándar fue de 3.202 ± 1.662, mientras que la estimación de diversidad nucleotídica promedio y su desviación estándar fue de 0.0064 ± 0.0037. Los coeficientes de variación para estos dos últimos índices, cercanos al 50%, reflejan la presencia de haplotipos con niveles de divergencia relativamente altos.

Distancia genética y reconstrucción filogenética

La estimación del parámetro de forma (α) de la distribución Gamma que se empleó para corregir la distancia genética por diferencias en las tasas de sustitución y composición nucleotídica, resultó en un valor de 0.2084 cuando se incluyeron sólo secuencias de ballena azul y su congénere la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*).

La distancia promedio interhaplotípica estimada fue de 0.012 ± 0.037. En la Tabla XIII se muestran las distancias genéticas y las desviaciones estándar (10,000 remuestreos por bootrstap), calculadas por medio del modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei con corrección Gamma α = 0.2084), entre los 17 haplotipos mitocondriales detectados en las agregaciones mexicanas de ballena azul.

El análisis filogenético bajo el criterio de optimización por mínima evolución (ME) resultó en un árbol de mayor consenso (10,000 remuestreos por bootstrap) cuya topología reconstruida por el método de agrupamiento de vecinos (Neighbor-Joinning) se muestra en la Figura 4. La topología de este árbol sugiere la existencia de dos clados para las agregaciones de ballena azul del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California.

Tabla XIII. Distancia genética entre los haplotipos maternos mitocondriales para las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental.

	NPBW01	NPBW02	NPBW03	NPBW04	NPBW05	NPBW06	NPBW07	NPBW08	NPBW09	NPBW10	NPBW11	NPBW13	NPBW14	NPBW15	NPBW16	NPBW17	NPBW18
NPBW01		[0.002]	[0.003]	[0.002]	[0.005]	[0.006]	[0.007]	[0.007]	[0.004]	[0.005]	[0.006]	[0.003]	[0.002]	[0.002]	[0.004]	[0.002]	[0.004]
NPBW02	0.002		[0.002]	[0.003]	[0.006]	[0.006]	[0.007]	[0.008]	[0.004]	[0.006]	[0.007]	[0.004]	[0.003]	[0.003]	[0.005]	[0.003]	[0.004]
NPBW03	0.004	0.002		[0.004]	[0.007]	[0.007]	[0.008]	[0.008]	[0.005]	[0.006]	[0.007]	[0.004]	[0.004]	[0.004]	[0.006]	[0.004]	[0.005]
NPBW04	0.002	0.004	0.006		[0.004]	[0.007]	[0.008]	[0.008]	[0.005]	[0.006]	[0.007]	[0.004]	[0.003]	[0.003]	[0.005]	[0.003]	[0.004]
NPBW05	0.011	0.013	0.015	0.008		[0.008]	[0.008]	[0.009]	[0.007]	[0.007]	[0.008]	[0.006]	[0.006]	[0.006]	[0.005]	[0.006]	[0.007]
NPBW06	0.014	0.016	0.018	0.016	0.021		[0.002]	[0.004]	[0.005]	[0.002]	[0.003]	[0.006]	[0.005]	[0.007]	[0.007]	[0.006]	[0.006]
NPBW07	0.016	0.018	0.021	0.019	0.023	0.002		[0.004]	[0.006]	[0.003]	[0.002]	[0.007]	[0.006]	[0.006]	[0.008]	[0.007]	[0.007]
NPBW08	0.018	0.021	0.023	0.021	0.026	0.008	0.006		[0.007]	[0.005]	[0.004]	[0.007]	[0.006]	[0.008]	[0.008]	[0.007]	[0.007]
NPBW09	0.006	0.008	0.011	0.009	0.018	0.011	0.014	0.016		[0.005]	[0.007]	[0.005]	[0.004]	[0.004]	[0.006]	[0.004]	[0.004]
NPBW10	0.011	0.013	0.015	0.014	0.018	0.002	0.004	0.011	0.009		[0.004]	[0.005]	[0.005]	[0.006]	[0.006]	[0.006]	[0.006]
NPBW11	0.014	0.016	0.018	0.016	0.021	0.004	0.002	0.006	0.016	0.006		[0.006]	[0.005]	[0.007]	[0.007]	[0.007]	[0.007]
NPBW13	0.004	0.006	0.008	0.006	0.015	0.014	0.016	0.018	0.011	0.011	0.014		[0.002]	[0.002]	[0.004]	[0.004]	[0.005]
NPBW14	0.002	0.004	0.006	0.004	0.013	0.011	0.014	0.016	0.009	0.009	0.011	0.002		[0.003]	[0.004]	[0.003]	[0.004]
NPBW15	0.002	0.004	0.006	0.004	0.013	0.016	0.019	0.021	0.009	0.014	0.016	0.002	0.004		[0.005]	[0.003]	[0.004]
NPBW16	0.008	0.011	0.013	0.011	0.011	0.018	0.021	0.023	0.015	0.015	0.018	0.008	0.006	0.011		[0.005]	[0.006]
NPBW17	0.002	0.004	0.007	0.004	0.013	0.016	0.018	0.021	0.008	0.013	0.016	0.006	0.004	0.004	0.011		[0.004]
NPBW18	0.006	0.008	0.011	0.008	0.018	0.016	0.018	0.016	0.008	0.013	0.016	0.011	0.008	0.008	0.015	0.008	

* En la diagonal inferior se indican el estimador de distancia y en la diagonal superior, entre paréntesis, la desviación estándar del estimador obtenida mediante 10,000 remuestreos (bootstrap). Las distancias fueron obtenidas con base en el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei ($\alpha = 0.2084$).

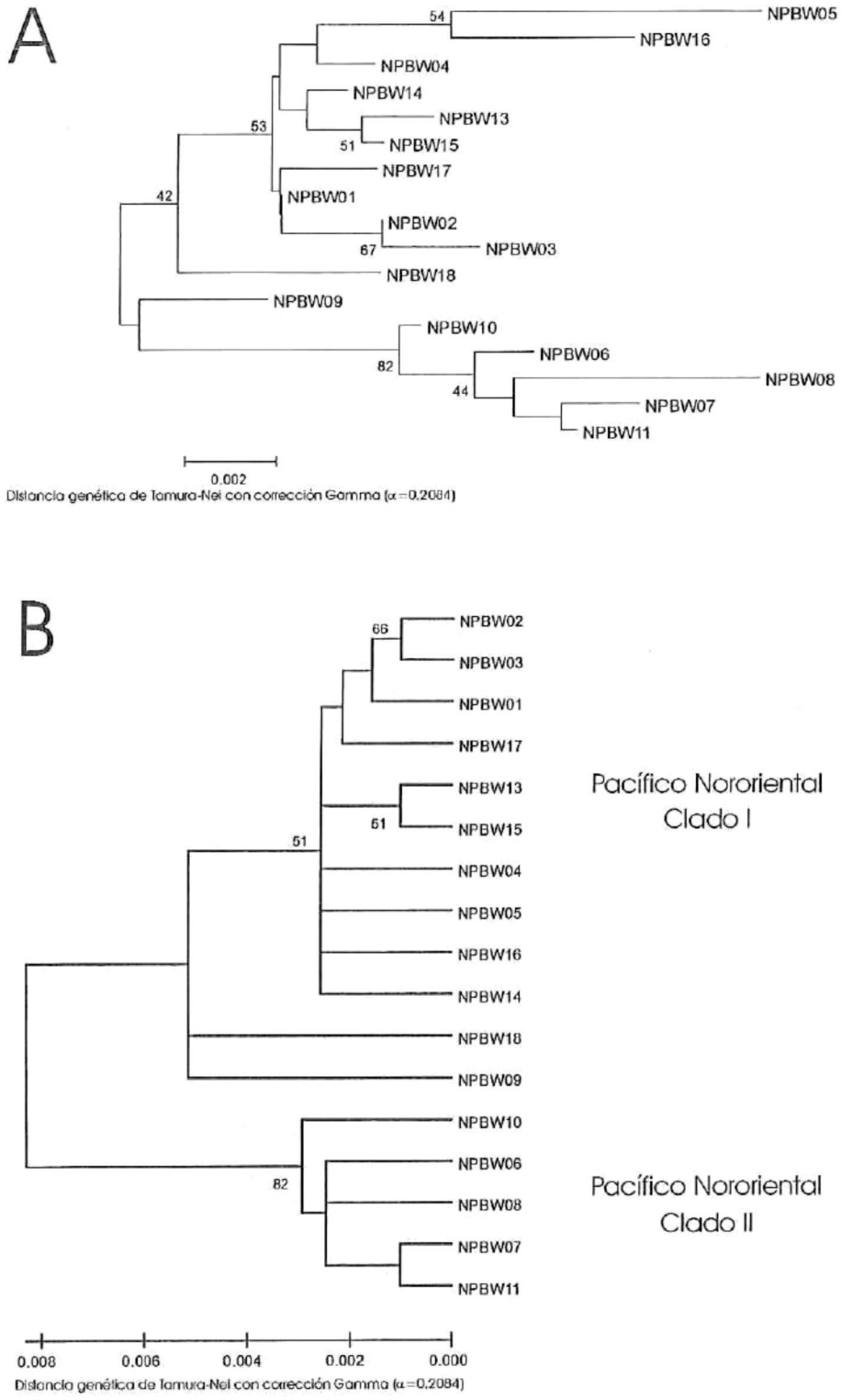


Figura 4. Reconstrucción filogenética por mínima evolución para los linajes mitocondriales (500 pb) de las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental. Modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei con corrección Gamma (α = 0.2084) y 10,000 replicaciones (bootstrap). Se indican sobre las ramas los valores de remuestreo que las sustentan. (A) Árbol no linearizado de mayor consenso. (B) Árbol linearizado de consenso estricto en el que se indican con el sombreado los dos clados soportados por valores altos de remuestreo.

El clado Pacífico Nororiental I agrupó la mayor parte de los linajes comunes (p.e. NPBW01, NPBW02, NPBW14 y NPBW16; ver Tabla XII), que representan a su vez cerca del 79% de los individuos muestreados en las agregaciones mexicanas. El clado Pacífico Nororiental II, a pesar de ser el más solidamente sustentado en la topología, agrupó sólo uno de los linajes comunes y varios de baja frecuencia; representando al 16% de los individuos de las agregaciones mexicanas (p.e. NPBW06, NPBW07). Los haplotipos NPBW09 y NPBW18 no fueron agrupados dentro de ninguno de estos clados, y aunque la topología de mayor consenso (Fig. 4a) sugiere que cada uno de ellos pudiese estar más estrechamente relacionado a uno de los clados definidos, la topología de consenso estricto y el alto valor de remuestreo para el caldo II indica que ambos se encuentran más relacionados con el clado Pacífico Nororiental I (Fig. 4b).

Es de resaltar la posición basal de los haplotipos del clado I en la topología del árbol filogenético, lo que sugiere un carácter ancestral del mismo.

Aunque en términos generales la MSN evidenció el mismo patrón filogenético, en el que los linajes forman dos grupos, la posición central del haplotipo NPBW01 y el número de haplotipos que de él derivan sugieren también el carácter ancestral del clado I. En la arquitectura de la red de la mínima separación (MSN) se observó que la ambigüedad topológica del haplotipo NPBW09 se debe a la asignación de una conexión alternativa (igualmente parsimoniosa) con el haplotipo basal (NPBW10) del clado II (Fig. 5). Adicionalmente el análisis indicó una conexión alternativa entre los haplotipos NPBW13 y NPBW15.

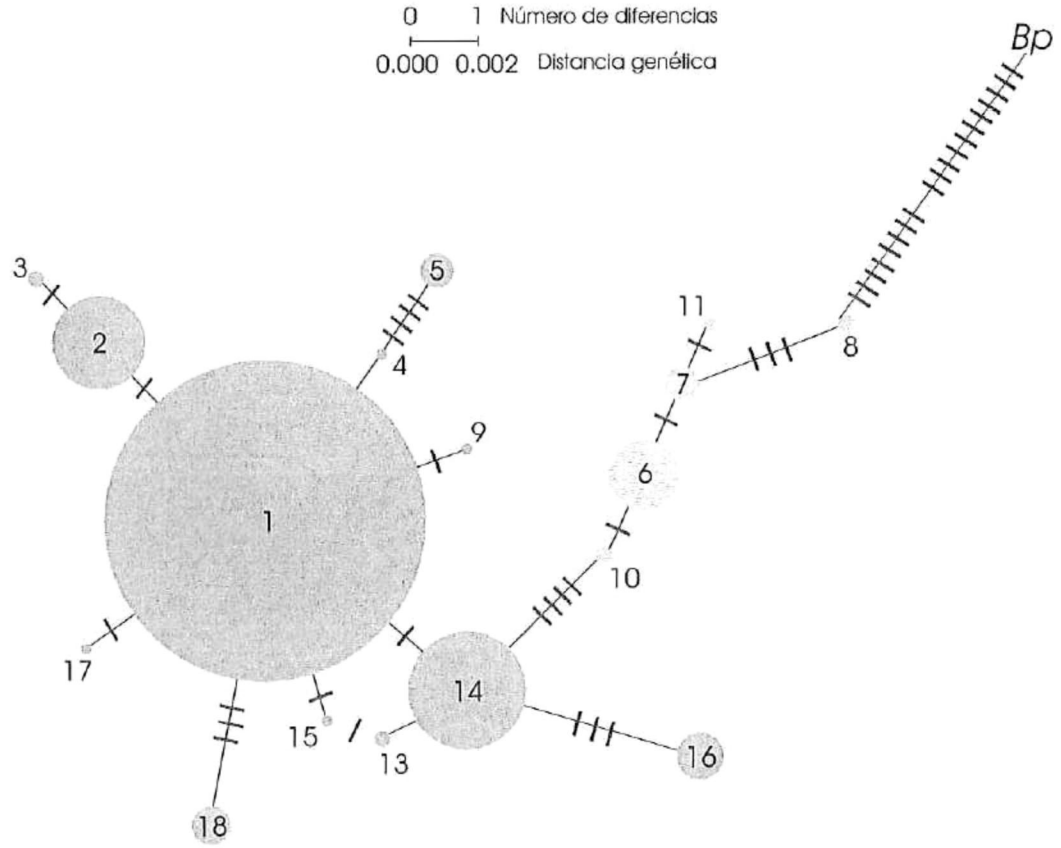


Figura 5. Red de la mínima distancia (MSN) para los linajes mitocondriales de las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental. Los círculos denotan los haplotipos (gris oscuro para el clado Pacífico Nororiental I y gris claro para el clado Pacífico Nororiental II) y su tamaño es proporcional al número de individuos que presentan cada linaje. Las líneas negras contínuas que interconectan los linajes representan la distancia genética entre los linajes y las líneas discontinuas de color gris claro denotan las conexiones alternativas (igualmente parsimoniosas). Las líneas gruesas perpendiculares a las conexiones entre haplotipos representan el número de sustituciones nucleotídicas. Los números corresponden a la designación de los linajes (p.e. NPBW01 = 1, NPBW02 = 2). *Bp* = *Balaenoptera physalus* (ballena de aleta).

Paralelamente, y con el objeto de evaluar la robustez de los dos clados identificados en las agregaciones mexicanas, se realizó un nuevo análisis filogenético en el que se incorporaron secuencias homólogas de otros especimenes de ballena azul disponibles en GeneBank (Tabla XIV, Anexo D). Es sumamente importante resaltar en este punto que no se encontró información detallada sobre de estas secuencias, por lo que se desconocen con precisión la procedencia, el período en que se obtuvieron las muestras y la frecuencia relativa de los haplotipos maternos definidos a partir de dichas secuencias. El alineamiento y la edición de estas últimas secuencias, en conjunto con las obtenidas en este trabajo, permitieron la comparación de un fragmento de 301 pb (299 sitios útiles). Se detectaron 39 sitios variables (37 transiciones y 2 deleciones) que permitieron definir un total de 30 haplotipos (Tabla XV); 19 sitios variables más de los que se detectaron empleando sólo las muestras de las agregaciones mexicanas.

El valor de diversidad nucleotídica promedio para los 30 linajes maternos de ballena azul se estimó considerando dos alternativas: frecuencias homogéneas para todos los haplotipos y las frecuencias observadas de estos. Los valores de π_n obtenidos fueron de 0.0257 ± 0.0116 y de 0.0108 ± 0.0058, respectivamente. Dichos valores representan con toda seguridad sobre-estimaciones de la diversidad nucleotídica por lo que deben considerarse como meras aproximaciones e interpretarse con reserva.

Tabla XIV. Secuencias homólogas (dominio hipervariable I – región control mitocondrial) de ballena azul disponibles en la base de datos del GeneBank incorporadas al análisis filogenético de los linajes de las agregaciones mexicanas.

Etiqueta	Procedencia	Localidad	Fuente	No. GeneBank
Is01	Biopsia	Islandia	Arnason *et al.* 1993	X72204.1
Is02	Biopsia	Islandia	Arnason y Gullberg 1993	NC_001601.1
BC01	Biopsia	Baja California	Baker *et al.* 1996	L35607
BC02	Biopsia	Baja California	Baker *et al.* 1996	L35608
NC01	Varamiento (necropsia)	Nueva Caledonia	Borsa *et al.* (No publicado)	AY235201
T01	Captura comercial (textil)	Atlántico Norte?	McEwing (No publicado)	AY340958
B01	Captura comercial (bula timpánica)	Atlántico Norte?	McEwing (No publicado)	AY390265
B03	Captura comercial (bula timpánica)	Atlántico Norte?	McEwing (No publicado)	AY390266
B05	Captura comercial (bula timpánica)	Atlántico Norte?	McEwing (No publicado)	AY390267
B07	Captura comercial (bula timpánica)	Atlántico Norte?	McEwing (No publicado)	AY390268
B12	Captura comercial (bula timpánica)	Atlántico Norte?	McEwing (No publicado)	AY390269
B17	Captura comercial (bula timpánica)	Antártica?*	McEwing (No publicado)	AY390270
B18	Captura comercial (bula timpánica)	Antártica?*	McEwing (No publicado)	AY390271
B19	Captura comercial (bula timpánica)	Antártica?*	McEwing (No publicado)	AY390272
B20	Captura comercial (bula timpánica)	Antártica?*	McEwing (No publicado)	AY390273
B21	Captura comercial (bula timpánica)	Antártica?*	McEwing (No publicado)	AY390274
B22	Captura comercial (bula timpánica)	Antártica?*	McEwing (No publicado)	AY390275
B23	Captura comercial (bula timpánica)	Atlántico Sur?	McEwing (No publicado)	AY390276
B24	Captura comercial (bula timpánica)	Antártica?*	McEwing (No publicado)	AY390277

* Especimenes capturados entre 1856 y 1915 de acuerdo con Herman (1992). La secuencia NC01 corresponde a un varamiento ocurrido entre 2000 y 2003 pero no se cuenta con la fecha exacta.

Tabla XV. Sitios de segregación (polimórficos) para todos los haplotipos mitocondriales de la ballena azul incluidos en el análisis filogenético global.

Haplotipo/Sitio	14	38	79	87	88	89	91	97	104	105	108	112	121	127	129	131	132	149	153	158	169	185	191	207	215	217	218	247	252	261	265	266	271	284	288	291	297
NPBW01	G	A	T	T	T	C	T	T	T	C	C	A	A	G	T	T	C	C	C	G	T	C	C	C	A	T	T	T	A	G	T	A	T	T	G	A	A
NPBW02	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW03	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW04	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW05	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.
NPBW06	.	.	.	.	C	.	.	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
NPBW07	.	.	.	.	C	.	.	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
NPBW08	.	.	.	.	C	.	.	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.
NPBW09	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW10	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
NPBW11	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
NPBW13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
NPBW16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	A	.	.
NPBW17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NPBW18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
T01	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	C	.	.	C	A	.	.
B24	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	G	C	.	A	.	.
B23	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	C	A	.	.
B21	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	C	.	T	.	.	A	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	A	.	.
B20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B19	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	C	.	A	.	.
B18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
B17	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	A	.	G
B12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B07	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B05	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B03	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
B01	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
NC01	.	.	.	.	C	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
Is01	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

* El código que identifica a cada haplotipo corresponde a aquellos de las Tablas XII y XIV. La secuencia empleada corresponde a los sitios 15,911 a 16,184 de la secuencia completa del genoma mitocondrial de la ballena azul (Arnason y Gullberg 1993; GeneBank NC_001601).

** La reducción en el número de sitios (nucleótidos) empleados resultó en un menor número de haplotipos para las agregaciones mexicanas y algunos de ellos fueron reagrupados dentro de otros (NPBW01=NPBW015; NPBW13 =NPBW14=BC01=BC02; Is01 = Is02; B01=B22).

De la reconstrucción filogenética basada en estos 30 haplotipos resulta evidente que la sólida topología previamente descrita para las agregaciones mexicanas se modificó de manera importante (Fig. 6). El clado I (clado común de aquí en adelante) se disgregó sugiriendo la ocurrencia de más de dos grupos de linajes en las agregaciones mexicanas. Aunque estos grupos no fueron sustentados por valores de remuestreo altos, llama la atención la asociación de haplotipos geográficamente distantes (Nueva Caledonia e Islandia) dentro del grupo donde se encuentra el haplotipo más común de las agregaciones mexicanas (NPBW01). Por su parte, a pesar de que el valor de remuestreo en el árbol de mayor consenso fue ligeramente menor, el clado II mantuvo su integridad, incorporando además un par de haplotipos que en el análisis de las agregaciones mexicanas se encontraban más asociadas al clado I (NPBW13 y NPBW14, ver Fig. 5 y 6)

A través de la red de la mínima separación (MSN) se observó un arreglo congruente con la topología del árbol filogenético para todos los haplotipos maternos de ballena azul, pero fue posible además evidenciar que los bajos valores de robustez en los remuestreos (bootstrap) se deben a la ocurrencia de conexiones alternativas (igualmente parsimoniosas) entre un par de haplotipos en la porción central del MSN (Fig. 7; haplotipos B03/B20). La posición central del haplotipo más común en las agregaciones mexicanas (NPBW01) en este MSN, aunada a la asociación de haplotipos geográficamente distantes, concuerdan con el patrón que podría esperarse para un haplotipo ancestral (Fig. 7). Sin embargo, los bajos valores de remuestreo y la presencia de linajes de diferentes regiones geográficas sin un patrón de agrupamiento definido, no permiten establecer de manera concluyente el carácter ancestral que se había sugerido inicialmente para el clado I.

Tabla XVI. Distancia genética entre los haplotipos maternos de ballena azul incluidas en el análisis filogenético global. En la diagonal inferior se indican el estimador de distancia y en la diagonal superior, entre paréntesis, la desviación estándar del estimador obtenida mediante 10,000 remuestreos (bootstrap). Las distancias fueron obtenidas con base en el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei (α = 0.2084).

	NPBW01	NPBW02	NPBW03	NPBW04	NPBW05	NPBW06	NPBW07	NPBW08	NPBW09	NPBW10	NPBW11	NPBW13	NPBW16	NPBW17	NPBW18	T01
NPBW01		[0.0038]	[0.0060]	[0.0036]	[0.0095]	[0.0115]	[0.0139]	[0.0166]	[0.0074]	[0.0095]	[0.0117]	[0.0036]	[0.0083]	[0.0038]	[0.0053]	[0.0120]
NPBW02	0.0035		[0.0038]	[0.0052]	[0.0113]	[0.0120]	[0.0142]	[0.0170]	[0.0084]	[0.0100]	[0.0121]	[0.0051]	[0.0103]	[0.0060]	[0.0070]	[0.0128]
NPBW03	0.0075	0.0035		[0.0069]	[0.0133]	[0.0129]	[0.0150]	[0.0180]	[0.0096]	[0.0111]	[0.0131]	[0.0069]	[0.0127]	[0.0084]	[0.0090]	[0.0140]
NPBW04	0.0035	0.0070	0.0109		[0.0082]	[0.0138]	[0.0163]	[0.0192]	[0.0091]	[0.0116]	[0.0139]	[0.0056]	[0.0095]	[0.0052]	[0.0067]	[0.0141]
NPBW05	0.0188	0.0232	0.0282	0.0147		[0.0148]	[0.0169]	[0.0198]	[0.0147]	[0.0126]	[0.0148]	[0.0110]	[0.0098]	[0.0108]	[0.0126]	[0.0147]
NPBW06	0.0205	0.0241	0.0280	0.0257	0.0333		[0.0035]	[0.0064]	[0.0094]	[0.0036]	[0.0055]	[0.0095]	[0.0132]	[0.0123]	[0.0102]	[0.0140]
NPBW07	0.0258	0.0293	0.0333	0.0315	0.0390	0.0035		[0.0050]	[0.0117]	[0.0055]	[0.0036]	[0.0115]	[0.0152]	[0.0144]	[0.0123]	[0.0164]
NPBW08	0.0351	0.0390	0.0434	0.0413	0.0497	0.0108	0.0070		[0.0142]	[0.0079]	[0.0065]	[0.0140]	[0.0182]	[0.0173]	[0.0137]	[0.0192]
NPBW09	0.0113	0.0148	0.0188	0.0157	0.0333	0.0157	0.0205	0.0293		[0.0074]	[0.0141]	[0.0093]	[0.0127]	[0.0084]	[0.0069]	[0.0140]
NPBW10	0.0157	0.0193	0.0232	0.0205	0.0280	0.0035	0.0072	0.0148	0.0113		[0.0074]	[0.0077]	[0.0114]	[0.0104]	[0.0085]	[0.0120]
NPBW11	0.0206	0.0241	0.0280	0.0258	0.0333	0.0072	0.0035	0.0108	0.0258	0.0113		[0.0095]	[0.0132]	[0.0123]	[0.0103]	[0.0138]
NPBW13	0.0035	0.0070	0.0109	0.0072	0.0232	0.0157	0.0205	0.0293	0.0157	0.0113	0.0157		[0.0072]	[0.0052]	[0.0067]	[0.0100]
NPBW16	0.0147	0.0192	0.0242	0.0188	0.0188	0.0280	0.0333	0.0435	0.0280	0.0232	0.0281	0.0110		[0.0100]	[0.0112]	[0.0086]
NPBW17	0.0035	0.0075	0.0119	0.0070	0.0232	0.0241	0.0293	0.0390	0.0148	0.0193	0.0241	0.0070	0.0191		[0.0071]	[0.0129]
NPBW18	0.0070	0.0109	0.0154	0.0108	0.0276	0.0193	0.0241	0.0259	0.0108	0.0148	0.0193	0.0108	0.0232	0.0109		[0.0110]
T01	0.0241	0.0280	0.0324	0.0293	0.0293	0.0293	0.0350	0.0452	0.0293	0.0241	0.0293	0.0192	0.0148	0.0280	0.0232	
B24	0.0280	0.0324	0.0374	0.0331	0.0451	0.0331	0.0388	0.0411	0.0147	0.0260	0.0451	0.0331	0.0389	0.0324	0.0192	0.0410
B23	0.0188	0.0232	0.0282	0.0232	0.0332	0.0232	0.0280	0.0376	0.0232	0.0188	0.0332	0.0147	0.0188	0.0232	0.0276	0.0192
B21	0.0603	0.0668	0.0739	0.0670	0.0672	0.0826	0.0746	0.0772	0.0670	0.0746	0.0672	0.0670	0.0604	0.0666	0.0484	0.0484
B20	0.0035	0.0070	0.0109	0.0072	0.0232	0.0157	0.0206	0.0294	0.0072	0.0113	0.0158	0.0072	0.0188	0.0070	0.0035	0.0193
B19	0.0280	0.0324	0.0374	0.0331	0.0451	0.0450	0.0518	0.0553	0.0232	0.0388	0.0451	0.0331	0.0389	0.0324	0.0192	0.0292
B18	0.0193	0.0232	0.0277	0.0241	0.0241	0.0241	0.0294	0.0391	0.0241	0.0193	0.0241	0.0241	0.0294	0.0232	0.0188	0.0315
B17	0.0280	0.0324	0.0374	0.0331	0.0451	0.0232	0.0280	0.0376	0.0232	0.0188	0.0332	0.0232	0.0280	0.0324	0.0276	0.0192
B12	0.0113	0.0149	0.0188	0.0158	0.0233	0.0158	0.0206	0.0295	0.0158	0.0113	0.0158	0.0158	0.0282	0.0149	0.0108	0.0294
B07	0.0035	0.0070	0.0110	0.0073	0.0148	0.0158	0.0206	0.0295	0.0158	0.0113	0.0158	0.0073	0.0189	0.0070	0.0108	0.0294
B05	0.0073	0.0108	0.0148	0.0113	0.0188	0.0113	0.0158	0.0242	0.0113	0.0073	0.0206	0.0113	0.0233	0.0108	0.0149	0.0351
B03	0.0149	0.0188	0.0233	0.0193	0.0378	0.0193	0.0241	0.0334	0.0193	0.0149	0.0193	0.0108	0.0233	0.0188	0.0147	0.0233
B01	0.0070	0.0110	0.0154	0.0108	0.0192	0.0193	0.0242	0.0259	0.0193	0.0149	0.0193	0.0108	0.0233	0.0110	0.0073	0.0334
NC01	0.0193	0.0232	0.0277	0.0241	0.0241	0.0241	0.0294	0.0391	0.0241	0.0193	0.0352	0.0241	0.0294	0.0232	0.0281	0.0446
Is01	0.0072	0.0108	0.0147	0.0113	0.0188	0.0205	0.0258	0.0351	0.0205	0.0157	0.0206	0.0113	0.0232	0.0108	0.0148	0.0350

Tabla XVI. Distancia genética entre los haplotipos maternos de ballena azul incluidas en el análisis filogenético global (Continuación).

	B24	B23	B21	B20	B19	B18	B17	B12	B07	B05	B03	B01	NC01	Is01
NPBW01	[0.0128]	[0.0096]	[0.0235]	[0.0036]	[0.0126]	[0.0103]	[0.0129]	[0.0078]	[0.0037	][0.0057]	[0.0083]	[0.0054]	[0.0096]	[0.0057]
NPBW02	[0.0142]	[0.0113]	[0.0260]	[0.0052]	[0.0140]	[0.0114]	[0.0142]	[0.0086]	[0.0052	][0.0068]	[0.0092]	[0.0071]	[0.0106]	[0.0068]
NPBW03	[0.0157]	[0.0133]	[0.0290]	[0.0070]	[0.0156]	[0.0130]	[0.0158]	[0.0099]	[0.0071	][0.0083]	[0.0109]	[0.0091]	[0.0122]	[0.0084]
NPBW04	[0.0144]	[0.0110]	[0.0258]	[0.0056]	[0.0144]	[0.0124]	[0.0148]	[0.0098]	[0.0057	][0.0074]	[0.0101]	[0.0069]	[0.0112]	[0.0076]
NPBW05	[0.0198]	[0.0151]	[0.0272]	[0.0112]	[0.0195]	[0.0122]	[0.0202]	[0.0109]	[0.0081	][0.0093]	[0.0161]	[0.0097]	[0.0118]	[0.0092]
NPBW06	[0.0148]	[0.0112]	[0.0339]	[0.0095]	[0.0196]	[0.0121]	[0.0109]	[0.0096]	[0.0093	][0.0074]	[0.0103]	[0.0101]	[0.0119]	[0.0115]
NPBW07	[0.0172]	[0.0128]	[0.0299]	[0.0116]	[0.0228]	[0.0142]	[0.0125]	[0.0117]	[0.0114	][0.0093]	[0.0124]	[0.0120]	[0.0143]	[0.0137]
NPBW08	[0.0190]	[0.0156]	[0.0318]	[0.0141]	[0.0252]	[0.0169]	[0.0152]	[0.0141]	[0.0138	][0.0117]	[0.0149]	[0.0134]	[0.0171]	[0.0163]
NPBW09	[0.0080]	[0.0111]	[0.0268]	[0.0057]	[0.0110]	[0.0120]	[0.0112]	[0.0097]	[0.0096	][0.0076]	[0.0104]	[0.0104]	[0.0117]	[0.0118]
NPBW10	[0.0128]	[0.0099]	[0.0297]	[0.0075]	[0.0171]	[0.0101]	[0.0096]	[0.0076]	[0.0074	][0.0055]	[0.0084]	[0.0084]	[0.0098]	[0.0093]
NPBW11	[0.0203]	[0.0148]	[0.0265]	[0.0096]	[0.0197]	[0.0120]	[0.0146]	[0.0096]	[0.0094	][0.0114]	[0.0104]	[0.0101]	[0.0165]	[0.0115]
NPBW13	[0.0148]	[0.0082]	[0.0261]	[0.0055]	[0.0146]	[0.0121]	[0.0109]	[0.0096]	[0.0056	][0.0075]	[0.0066]	[0.0069]	[0.0115]	[0.0076]
NPBW16	[0.0170]	[0.0098]	[0.0244]	[0.0096]	[0.0170]	[0.0143]	[0.0128]	[0.0131]	[0.0097	][0.0113]	[0.0115]	[0.0113]	[0.0143]	[0.0111]
NPBW17	[0.0141]	[0.0109]	[0.0259]	[0.0053]	[0.0140]	[0.0113]	[0.0141]	[0.0088]	[0.0054	][0.0069]	[0.0096]	[0.0072]	[0.0106]	[0.0069]
NPBW18	[0.0100]	[0.0127]	[0.0194]	[0.0038]	[0.0097]	[0.0095]	[0.0124]	[0.0070]	[0.0071	][0.0087]	[0.0081]	[0.0059]	[0.0125]	[0.0087]
T01	[0.0193]	[0.0102]	[0.0200]	[0.0100]	[0.0138]	[0.0160]	[0.0101]	[0.0141]	[0.0143	][0.0168]	[0.0112]	[0.0151]	[0.0220]	[0.0166]
B24		[0.0149]	[0.0315]	[0.0110]	[0.0095]	[0.0167]	[0.0149]	[0.0110]	[0.0152	][0.0130]	[0.0161]	[0.0144]	[0.0163]	[0.0129]
B23	0.0331		[0.0332]	[0.0112]	[0.0198]	[0.0172]	[0.0080]	[0.0153]	[0.0112	][0.0096]	[0.0127]	[0.0127]	[0.0117]	[0.0130]
B21	0.0717	0.0823		[0.0214]	[0.0232]	[0.0286]	[0.0332]	[0.0264]	[0.0266	][0.0297]	[0.0243]	[0.0249]	[0.0367]	[0.0295]
B20	0.0232	0.0232	0.0541		[0.0107]	[0.0083]	[0.0112]	[0.0057]	[0.0059	][0.0077]	[0.0068]	[0.0071]	[0.0116]	[0.0077]
B19	0.0157	0.0449	0.0582	0.0232		[0.0161]	[0.0199]	[0.0148]	[0.0149	][0.0173]	[0.0157]	[0.0141]	[0.0219]	[0.0172]
B18	0.0350	0.0350	0.0692	0.0149	0.0350		[0.0172]	[0.0081]	[0.0084	][0.0103]	[0.0128]	[0.0095]	[0.0139]	[0.0099]
B17	0.0331	0.0147	0.0823	0.0232	0.0449	0.0350		[0.0153]	[0.0153	][0.0132]	[0.0126]	[0.0163]	[0.0168]	[0.0176]
B12	0.0233	0.0333	0.0674	0.0073	0.0333	0.0149	0.0333		[0.0056	][0.0074]	[0.0102]	[0.0068]	[0.0114]	[0.0036]
B07	0.0333	0.0233	0.0674	0.0073	0.0333	0.0149	0.0333	0.0072		[0.0036]	[0.0102]	[0.0038]	[0.0079]	[0.0037]
B05	0.0281	0.0188	0.0748	0.0113	0.0390	0.0194	0.0281	0.0113	0.0035		[0.0121]	[0.0053]	[0.0066]	[0.0057]
B03	0.0377	0.0277	0.0605	0.0108	0.0377	0.0281	0.0277	0.0192	0.0192	0.024		[0.0112]	[0.0170]	[0.0123]
B01	0.0293	0.0277	0.0617	0.0108	0.0293	0.0189	0.0377	0.0108	0.0035	0.007	0.0232		[0.0091]	[0.0053]
NC01	0.0350	0.0241	0.0865	0.0241	0.0480	0.0259	0.0350	0.0242	0.0149	0.0108	0.0392	0.0189		[0.0096]
Is01	0.0280	0.0280	0.0746	0.0113	0.0388	0.0193	0.0388	0.0035	0.0035	0.0073	0.0241	0.007	0.0193	

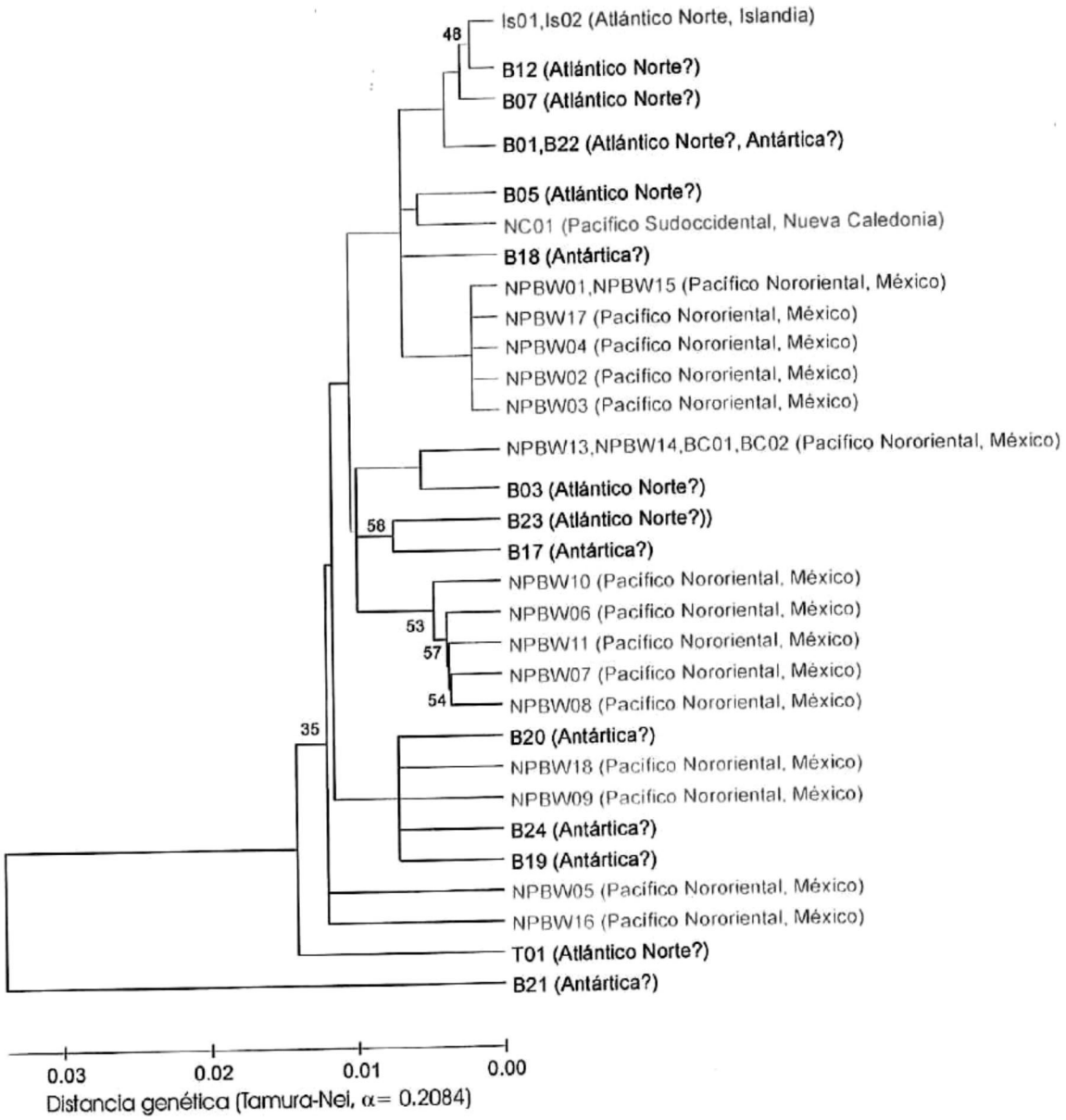


Figura 6. Reconstrucción filogenética por mínima evolución para todos los linajes mitocondriales reportados en el GeneBank y para los linajes observados en las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental. Modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei con corrección Gamma (α = 0.2084) y 10,000 replicaciones (bootstrap). Árbol no linearizado de consenso estricto (301 pb, 289 sitios homólogos útiles). Se indican sobre las ramas los valores de remuestreo que las sustentan. El color verde representa a los haplotipos de las agregaciones mexicanas; el color azul representa los haplotipos actuales de otras agregaciones (Atlántico Norte y Pacífico Sudoccidental).

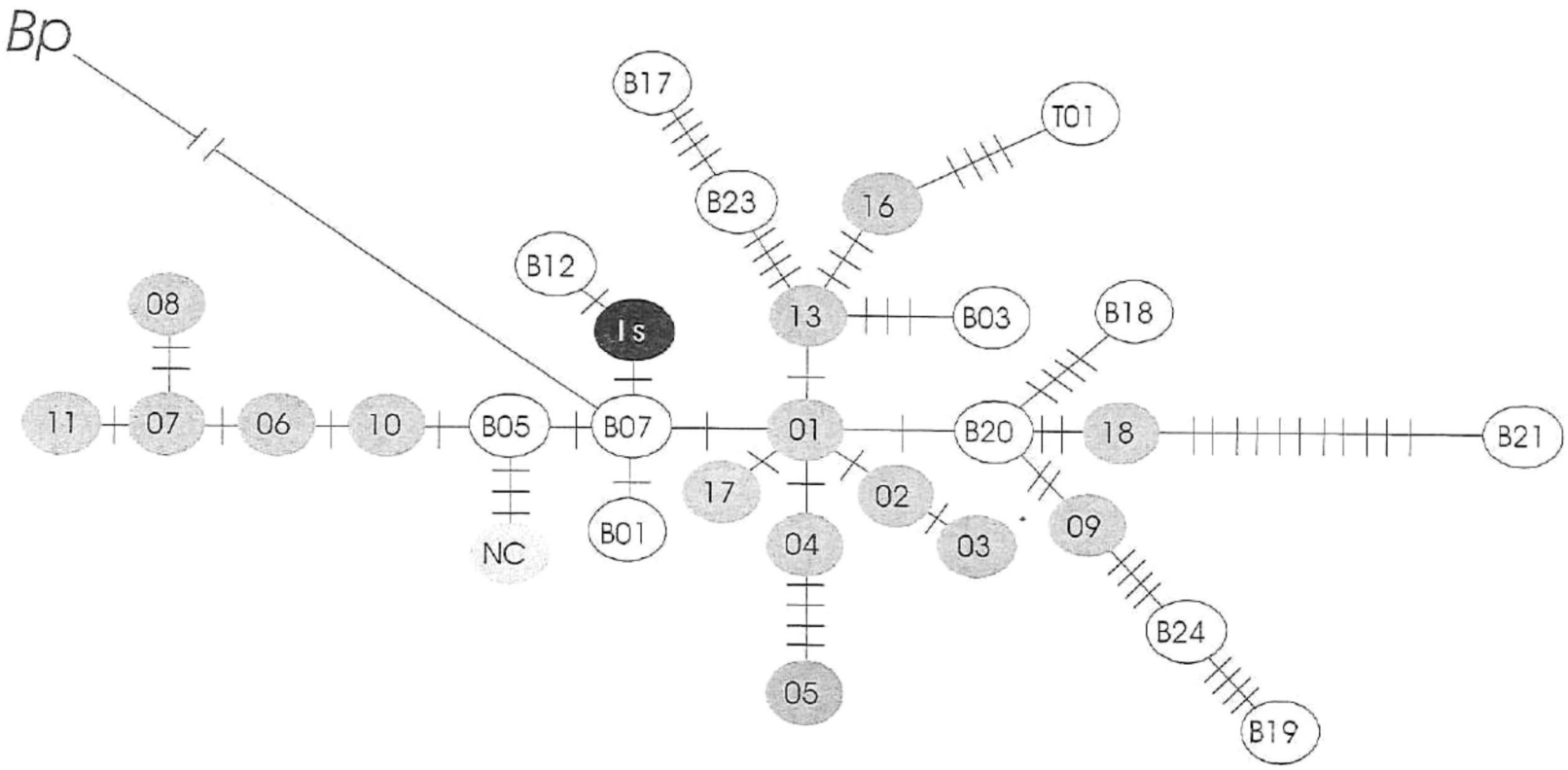


Figura 7. Red de la mínima distancia (MSN) para los linajes mitocondriales de las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental en el que se incluyeron los haplotipos definidos con base en las secuencias obtenidas del GeneBank. Los círculos denotan los haplotipos (gris oscuro para las agregaciones mexicanas; gris claro para Nueva Caledonia; negro para Islandia). El tamaño de los círculos y las distancias entre ellos no son proporcionales a las abundancias ni a las distancias genéticas entre ellos. Las etiquetas de los haplotipos corresponden a aquellas de la Tabla XIV. Adicionalmente, *Bp* = *Balaenoptera physalus* (ballena de aleta).

Reconstrucción filogenética con la adición de grupos externos

Con el fin de obtener una mayor resolución en la topología interna se construyó un nuevo árbol filogenético con secuencias homólogas de otras especies de misticetos (417 secuencias; ver Anexo D). El parámetro α de la distribución Gamma resultó en un valor de 0.3601 al incluir este conjunto de secuencias.

El alineamiento de dichas secuencias (258 pb, 197 sitios útiles) permitió la identificación de 219 haplotipos cuya reconstrucción filogenética resultó en la topología que se presenta en la Figura 8. Esta topología resalta el hecho de que los dos clados originalmente sugeridos por el análisis de los haplotipos de las agregaciones mexicanas se mantuvieron relativamente estables, aunque mostrando también claras evidencias de subdivisión dentro de cada clado. La modificación más relevante en la topología, al incluir los grupos externos, fue la reincorporación del haplotipo NPBW05 al clado común y la exclusión definitiva del haplotipo NPBW16, cuya nueva posición basal en el árbol sugiere la independencia de este último linaje con respecto al clado común, en el que originalmente había sido ubicado (ver Fig. 4 y 6).

La inclusión de grupos externos resultó en valores de remuestreo muy bajos ya que al emplear un mayor número de taxas, y una región caracterizada por bloques de inserción/deleción (ver Anexo E), el número de sitios útiles en la comparación global se redujo considerablemente (de 500 a 197). Sin embargo, la topología del árbol filogenético no se modificó de manera importante y se consideró que las relaciones evidenciadas del análisis filogenético son reales y no producto de un arreglo aleatorio de las secuencias.

De la arquitectura de los análisis MSN resulta evidente que los haplotipos que representan a las secuencias obtenidas del GeneBanK se intercalaron entre los nodos del MSN de las agregaciones mexicanas. En concordancia con el árbol filogenético de mínima evolución, el haplotipo NPBW16 fue excluido del grupo común ocupando ahora una posición basal.

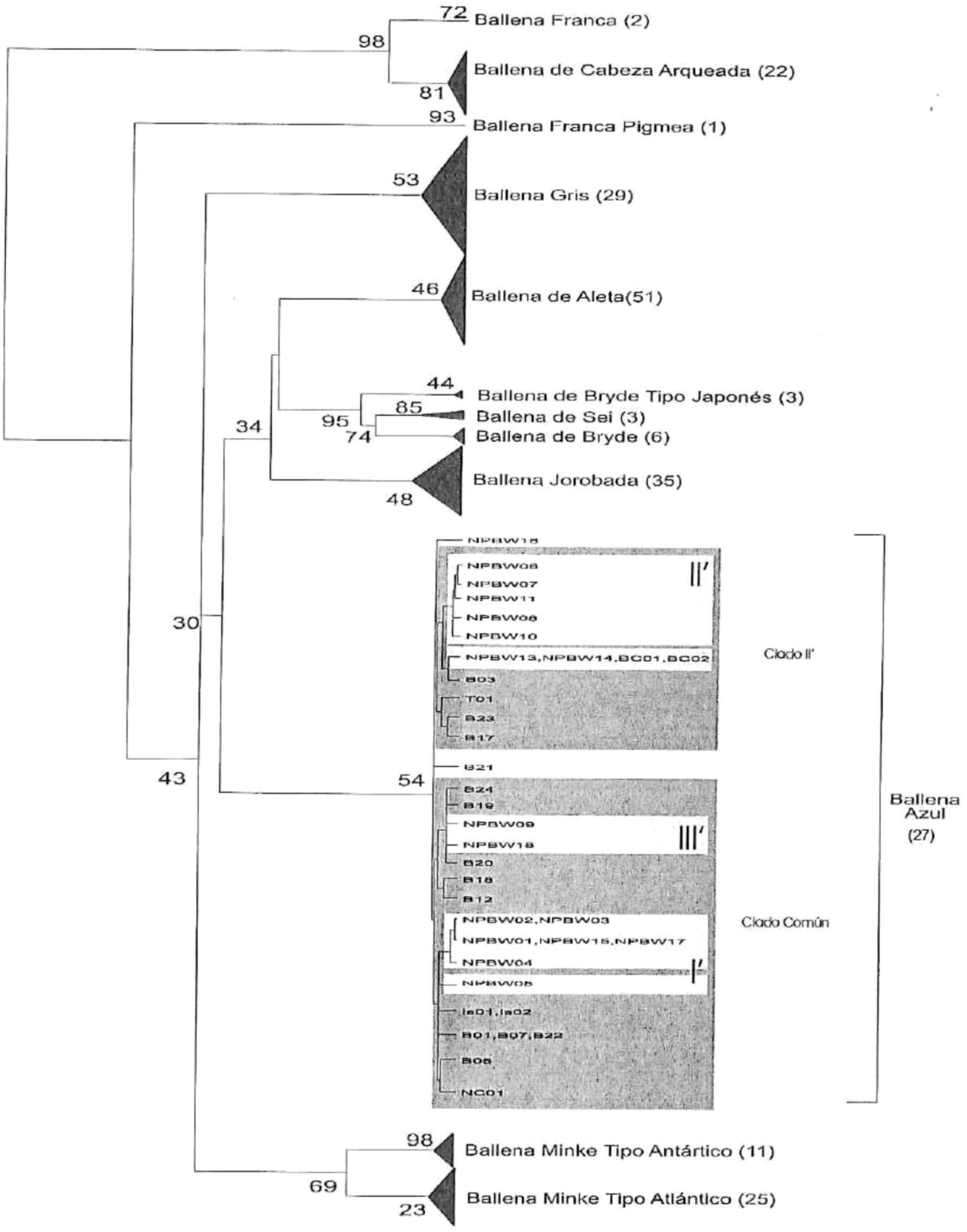


Figura 8. Reconstrucción filogenética interespecífica por mínima evolución. Modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei con corrección Gamma (α = 0.36) y 10,000 replicaciones (bootstrap). Árbol linearizado de consenso estricto (258 pb, 197 sitios homólogos útiles). Los cuadros sombreados en gris representan los dos grandes clados en los que se ubicaron los haplotipos de las ballenas azules de las agregaciones mexicanas. Se indican sobre las ramas los valores de remuestreo que las sustentan. Entre paréntesis se indica el número de haplotipos maternos para cada especie.

Representatividad del tamaño de la muestra

Ya que una de las posibles razones que podría haber limitado la detección de estos haplotipos es la deficiencia en el muestreo, se simuló un muestreo aleatorio con reemplazo suponiendo una población no estructurada de 5000 individuos y 16 haplotipos con frecuencias iguales observadas para este trabajo (ver Tabla XII). Al considerar 100 réplicas en cada simulación y diferente tamaños de muestra (5, 10, 15, ..., 1000), se observó que el tamaño de muestra empleado en este trabajo se encuentra ligeramente por debajo del punto en el que la probabilidad de detectar un haplotipo nuevo fuera nula (Fig. 9).

Sin embargo, y como lo evidenció el análisis filogenético, existen diferentes grupos de linajes en las agregaciones mexicanas que podrían estar segregados tanto espacial como temporalmente limitando la probabilidad de muestrear aquellos haplotipos de menor frecuencia. Este y otros factores que podrían haber introducido un sesgo en el muestreo, y consecuentemente en los valores de diversidad genética aquí reportados, se discutirán posteriormente. Sin embargo, en conjunto del análisis filogenéticos parecen sustentar la ocurrencia de al menos dos grandes grupos genéticamente diferenciados de ballenas azules en las agregaciones mexicanas del Pacífico Nororiental: El clado II que contiene al 30% de los individuos en las agregaciones mexicanas, y el clado común, representando al resto de los individuos (ver Fig. 8).

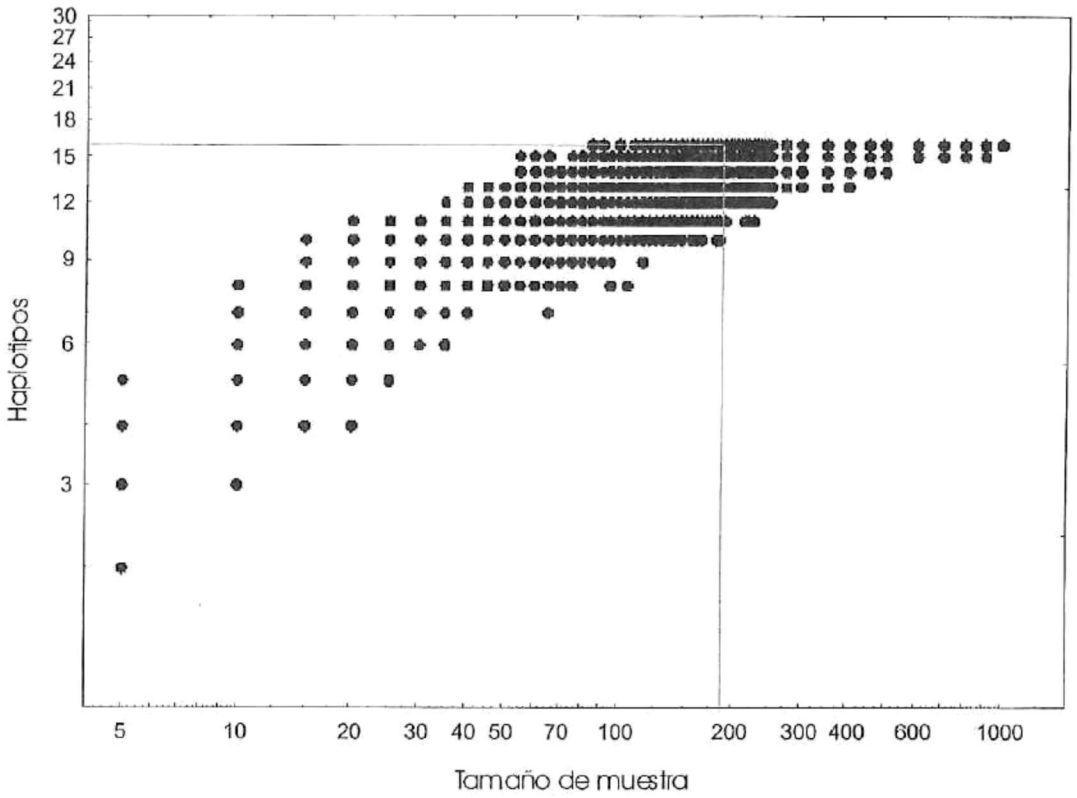


Figura 9. Simulación de un muestreo aleatorio con reemplazo en una población hipotética de 5000 individuos con 16 haplotipos maternos. Para cada tamaño de muestra se consideraron 100 réplicas.

Estructura genética en las agregaciones mexicanas de ballena azul

En la Tabla XVII se indica el número de individuos presentes en las agregaciones mexicanas por haplotipo y por años, así como los estimadores de diversidad nucleotídica y la proporción de sexos para cada periodo.

A lo largo de todo el período de estudio se observaron, sin un patrón temporal evidente, individuos de los distintos linajes maternos y de ambos clados filogenéticos. El número de individuos observados por linaje en cada año mostró un patrón consistente con la abundancia relativa de los linajes. Esto sugiere que la abundancia de ballenas azules en el área de estudio es reflejo de la presencia de ambos clados y que no existe segregación temporal de los linajes maternos. De igual forma, individuos de ambos clados fueron observados tanto en aguas oceánicas como en aguas costeras del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California, e incluso se detectaron recapturas entre ambas zonas (Tabla XVIII). Aunque el tamaño de la muestra para aguas oceánicas y la costa occidental de Baja California no permitió un análisis más detallado, no se observó evidencia de segregación espacial de los individuos asignados a cada clado.

La proporción de sexos obtenida del análisis molecular indicó un ligero sesgo hacia la ocurrencia de hembras en las agregaciones mexicanas (1.2:1) que no resultó significativamente diferente de la proporción esperada 1:1 (χ^2 = 0.629, p>0.05). Sin embargo, al integrar la información del historial de avistamientos de cada individuo, se observó que la proporción de sexos en las agregaciones presentó importantes variaciones interanuales a pesar de mantener el sesgo hacia las hembras. El número de hembras y de machos para cada temporada fue significativamente diferente del número esperado en función de la proporción global de sexos (χ^2= 58.814 y χ^2= 94.785, respectivamente; p<0.001 en ambos casos). Como puede apreciarse en la Tabla XVIII, estas diferencias responden a la ocurrencia temporal de un mayor número de hembras en las agregaciones mexicanas que sugiere un uso preferencial del área de estudio por parte de estas.

Tabla XVII. Diversidad genética y número de ballenas azules observadas por año y por haplotipo en las agregaciones mexicanas del Pacífico Nororiental.

Haplotipo	Clado	<1996	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	Total
NPBW01	Común	12	10	14	11	23	9	17	19	10	10	76
NPBW02	Común	3	6	6	3	7	3	7	4	8	4	22
NPBW03	Común	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
NPBW04	Común	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NPBW05	Común	0	2	3	1	1	0	1	3	1	2	8
NPBW06	II'	4	0	2	2	2	3	4	1	4	4	17
NPBW07	II'	1	0	0	0	0	4	1	1	3	0	8
NPBW08	II'	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	2
NPBW09	Común	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
NPBW10	II'	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
NPBW11	II'	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
NPBW13	II'	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2
NPBW14	II'	2	2	4	2	4	2	8	12	4	2	26
NPBW15	Común	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
NPBW16	?	2	0	0	2	2	3	5	1	3	1	11
NPBW17	Común	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
NPBW18	Común	0	0	1	2	1	2	2	4	2	2	9
Número de haplotipos		7	5	6	9	8	8	13	14	9	7	17
Diversidad haplotípica		0.743 (0.078)	0.704 (0.074)	0.733 (0.064)	0.793 (0.074)	0.656 (0.073)	0.849 (0.046)	0.835 (0.039)	0.809 (0.040)	0.854 (0.032)	0.800 (0.060)	0.794 (0.023)
Diversidad nucleotídica		0.0067 (0.0042)	0.0032 (0.0022)	0.0048 (0.0030)	0.0065 (0.0038)	0.0042 (0.0027)	0.0086 (0.0049)	0.0063 (0.0037)	0.0059 (0.0034)	0.0074 (0.0041)	0.0069 (0.0041)	0.0064 (0.0037)
Número de individuos		25	21	30	25	41	27	50	52	36	25	190
Número de hembras		15	17	18	18	24	20	27	39	18	15	102
Número de machos		10	4	12	8	17	7	23	19	18	10	87
Proporción de sexos		1.50	4.25	1.50	2.25	1.41	2.86	1.17	2.05	1.00	1.50	1.20
Esfuerzo (horas)		590	213	115	156	264	233	285	277	256	364	2,672

* La desviación estándar para los estimadores de diversidad genética se indica entre paréntesis.
* Los clados corresponden a los definidos en la Figura 8.
* El total no corresponde a la sumatoria de los años sino al total de la muestra genética mientras que el número de individuos en cada año corresponde a los registro en el historial de avistamientos para cada uno de los individuos a los que se asignó el haplotipo materno y se identifico el sexo. Es decir, un individuo observado en 1996 pudo haber sido observado también en 1997 y 1998, pero en el total se considerará como un solo individuo.

Tabla XVIII. Número de ballenas azules por haplotipo, zona y hábitat presentes en las agregaciones mexicanas del Pacífico Nororiental.

Haplotipo	Clado	Zona						Hábitat			
		Golfo de California		Ambas zonas (recapturas)		Costa Occidental Baja California		Costero		Oceánico	
		Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
NPBW01	Común	30	42	0	3	0	3	26	37	2	5
NPBW02	Común	7	12	1	3	1	3	6	11	1	1
NPBW03	Común	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
NPBW04	Común	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
NPBW05	Común	3	3	0	0	0	0	2	4	1	0
NPBW06	II'	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0
NPBW07	II'	15	8	2	1	0	0	12	8	2	0
NPBW08	II'	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
NPBW09	Común	3	7	0	0	0	0	3	7	0	0
NPBW10	II'	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
NPBW11	II'	3	6	0	0	0	0	3	5	0	0
NPBW13	II'	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
NPBW14	II'	7	8	1	2	1	2	5	7	0	0
NPBW15	Común	7	1	0	0	0	0	6	0	0	1
NPBW16	?	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
NPBW17	Común	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0
NPBW18	Común	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		80	93	5	9	3	8	68	85	6	7

Ahora bien, al considerar la presencia de individuos pertenecientes a los dos clados definidos en el análisis filogenético (ver Tabla XVII), se observó una importante diferencia en la proporción de sexos. El número de machos en el clado común fue menor al de las hembras (proporción 1.47:1), mientras que un patrón inverso se presentó en el clado II (proporción 0.68:1). Aunque estas diferencias pudieran representar un uso diferencial del área por parte de los clados, la diferencia en el tamaño de muestra no permitió el análisis estadístico de las variaciones interanuales asociadas al sexo en cada clado (Tabla XIX).

Se realizó además una revisión del historial de avistamientos de los individuos y se calculó el tiempo de residencia promedio durante las diferentes temporadas (número de meses que los individuos fueron observados cada año) y la tasa de retorno (número de años en que los individuos han sido observados en el Golfo). De acuerdo con los datos del historial de avistamientos (ver Gendron 2002), la presencia de las ballenas azules en las aguas costeras de la Península de Baja California es claramente temporal; los individuos se han observado entre noviembre y julio, agregados principalmente en la porción sudoccidental del Golfo de California durante el invierno, y en la costa occidental de la Península durante primavera. El análisis de los tiempos de residencia de los individuos sexados y haplotipados molecularmente en el presente trabajo indicó que, aunque los individuos de ambos clados ocuparon el área con un patrón temporal congruente con el de su movimiento migratorio anual, existe una marcada diferencia en la permanencia asociada con el sexo (hembras clado común 2.38 ± 2.09, hembras clado II 2.08 ± 1.56, machos clado común 1.65 ± 1.39 y machos clado II 1.47± 0.83). Los tiempos de residencia no fueron diferentes entre clados ($\chi^2 = 0.067$, $p>0.05$) pero las hembras de ambos clados permanecieron por periodos mayores que los machos de ambos clados ($\chi^2 = 5.9521$, $p<0.05$).

De forma similar, la frecuencia con la que los individuos ocuparon el área de estudio (número de años en que se ha observado cada individuo) no fue significativamente diferente entre clados ($\chi^2 = 0.774$, $p>0.05$), pero lo fue entre machos y hembras ($\chi^2 = 12.96$, $p<0.05$). El hecho de que las hembras se observaron con mayor frecuencia que los machos (hembras clado común 2.069 ± 1.883, hembras clado II 1.769 ± 1.589;

machos clado común 1.376 ± 1.112 y machos clado II 1.253 ± 0.5622), aportó más evidencia de que existen patrones de uso diferencial del área en función del sexo.

Al analizar la variación interanual de la diversidad haplotípica (ver Tabla XVII), no se encontraron diferencias significativas con respecto a la diversidad promedio de las agregaciones mexicanas ($\chi^2 = 0.05167$, $p>0.05$). De igual forma, el análisis de varianza molecular (AMOVA) entre años no resultó significativo ($\Phi_{ST} = 0.008$, $p> 0.05$). Ambos análisis sustentan los resultados anteriores apoyando la idea de que no existe segregación temporal de los linajes maternos en las agregaciones mexicanas. Este último par de pruebas estadísticas se efectuaron de nueva cuenta removiendo del análisis a las crías y los machos adultos, pero los resultados no se modificaron de manera importante.

Dada la co-ocurrencia espacial y temporal de ambos clados, parecería ilógico efectuar un AMOVA entre estos; obviamente al contener haplotipos diferentes el análisis indicaría una fuerte estructura dentro de las agregaciones. Sin embargo, el análisis se efectuó con el objeto de comparar los niveles de diferenciación genética. La diferenciación molecular entre los haplotipos maternos ($\Phi_{ST} = 0.4911$, $p<0.001$) explicó un mayor porcentaje de la variación entre los clados, en comparación con la que la frecuencia de haplotipos explicó por sí sola ($F_{ST} = 0.3391$, $p<0.001$).

En la Tabla XX se indican los valores de diversidad genética total para cada clado, así como para los machos y las hembras dentro de los clados. Puede apreciarse que los valores de diversidad son mayores para el clado II, aun cuando el clado común posee un mayor número de haplotipos. Las hembras presentaron niveles de diversidad ligeramente mayores, aunque no significativos, a los que se observaron en los machos. Lo anterior podría ser reflejo de la presencia de animales jóvenes, descendientes de los linajes maternos frecuentes en las agregaciones mexicanas, o bien de la marcada preferencia de las hembras por el área de estudio.

Tabla XIX. Número de ballenas azules por haplotipo, clase de edad y sexo, presentes en las agregaciones mexicanas del Pacífico Nororiental.

			Hembras					Crías			Proporción de sexos	
Haplotipo	Clado	Total	Total	Lactantes	No lactantes	Machos	Indeterminado	Total	Hembras	Machos	Adultos	Crías
NPBW01	Común	76	45	15	30	31	0	9	1	8	1.45	0.125
NPBW02	Común	22	14	4	10	8	0	3	2	1	1.75	2
NPBW03	Común	2	1	1	0	1	0	0	0	0	1.00	-
NPBW04	Común	1	0	0	0	1	0	0	0	0	-	-
NPBW05	Común	8	4	3	1	4	0	2	1	1	1.00	1
NPBW06	II'	17	9	2	5	8	0	1	0	1	1.13	-
NPBW07	II'	8	1	0	1	7	0	0	0	0	0.14	-
NPBW08	II'	2	1	0	1	1	0	0	0	0	1.00	-
NPBW09	Común	1	0	0	0	1	0	0	0	0	-	-
NPBW10	II'	2	2	0	2	0	0	0	0	0	-	-
NPBW11	II'	1	0	0	0	0	1	0	0	0	-	-
NPBW13	II'	2	0	0	0	2	0	0	0	0	-	-
NPBW14	II'	26	10	3	7	16	0	1	0	1	0.63	-
NPBW15	Común	1	1	0	1	0	0	0	0	0	-	-
NPBW16	?	11	7	2	5	4	0	0	2	0	1.75	-
NPBW17	Común	1	1	0	1	0	0	0	0	0	-	-
NPBW18	Común	9	6	3	3	3	0	1	2	1	2.00	2
Total		190	102	33	67	87	1	17	8	13	1.17	0.62

* Un mayor número de hembras lactantes y crías han sido observadas en el área de estudio (ver Gendron 2002), sin embargo en este trabajo solo reporto aquellas asignadas molecularmente a alguno de los linajes.

Tabla XX. Diversidad nucleotídica para los clado filogenético de las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental.

	Clado II'	Clado Común (I'y III')
Haplotipos	7	9
H	0.6298 (0.0414)	0.7024 (0.0403)
π_n	0.0041 (0.0026)	0.0068 (0.0039)
$\pi_{n_{hembras}}$	0.0041(0.0023)	0.0040 (0.0025)
$\pi_{n_{machos}}$	0.0021(0.0017)	0.0031 (0.0022)
ϕ_{st} **machos/hembras**	0.0013 (n.s.)	0.0021 (n.s.)

* La nomenclatura de los clados corresponde a la de la Figura 8. El haplotipo NPBW16 no fue incluido en función de que el análisis filogenético sugiere que no pertenece a ninguno de los dos clados que contienen a la mayoría de los linajes.

Finalmente, dada la aparente importancia del área de estudio para las hembras, realice una revisión del historial de los individuos identificados con el objeto de determinar si las hembras lactantes registradas pertenecían particularmente a alguno de los linajes o clados identificados (ver Tabla XIX). El número de hembras lactantes observadas para cada linaje o clado fue proporcional a la abundancia de individuos dentro de los clados. Aunque para muchos de los linajes de baja frecuencia no se observaron hembras lactantes o crías, resultó particularmente interesante que en ambos clados, e incluso para cada subdivisión del clado común (clados I' y III'), los haplotipos más comunes de cada clado se han observado al menos una vez en compañía de una cría en el área de estudio (Fig. 10 A). Aun más relevante fue el hecho de que el único haplotipo presente en las agregaciones mexicanas que no fue agrupado en alguno de los clados en el análisis filogenético con la adición de grupos externos (NPBW16), también incluyó hembras lactantes y crías (Fig. 10 B).

En resumen, a pesar del reducido número de muestras recolectadas en la zona costera occidental de Baja California, no se encontró evidencia que indique un uso diferencial del área de estudio por parte de los linajes de alguno de los clados. En conjunto, los resultados indican que ballenas azules, particularmente las hembras, de dos clados genéticamente divergentes ocurren actualmente en las agregaciones mexicanas con un patrón temporal simultáneo. La ocurrencia de hembras lactantes de los linajes más comunes y en ambos clados, resalta la importancia del Golfo de California para las actividades de crianza de la especie en el área de estudio.

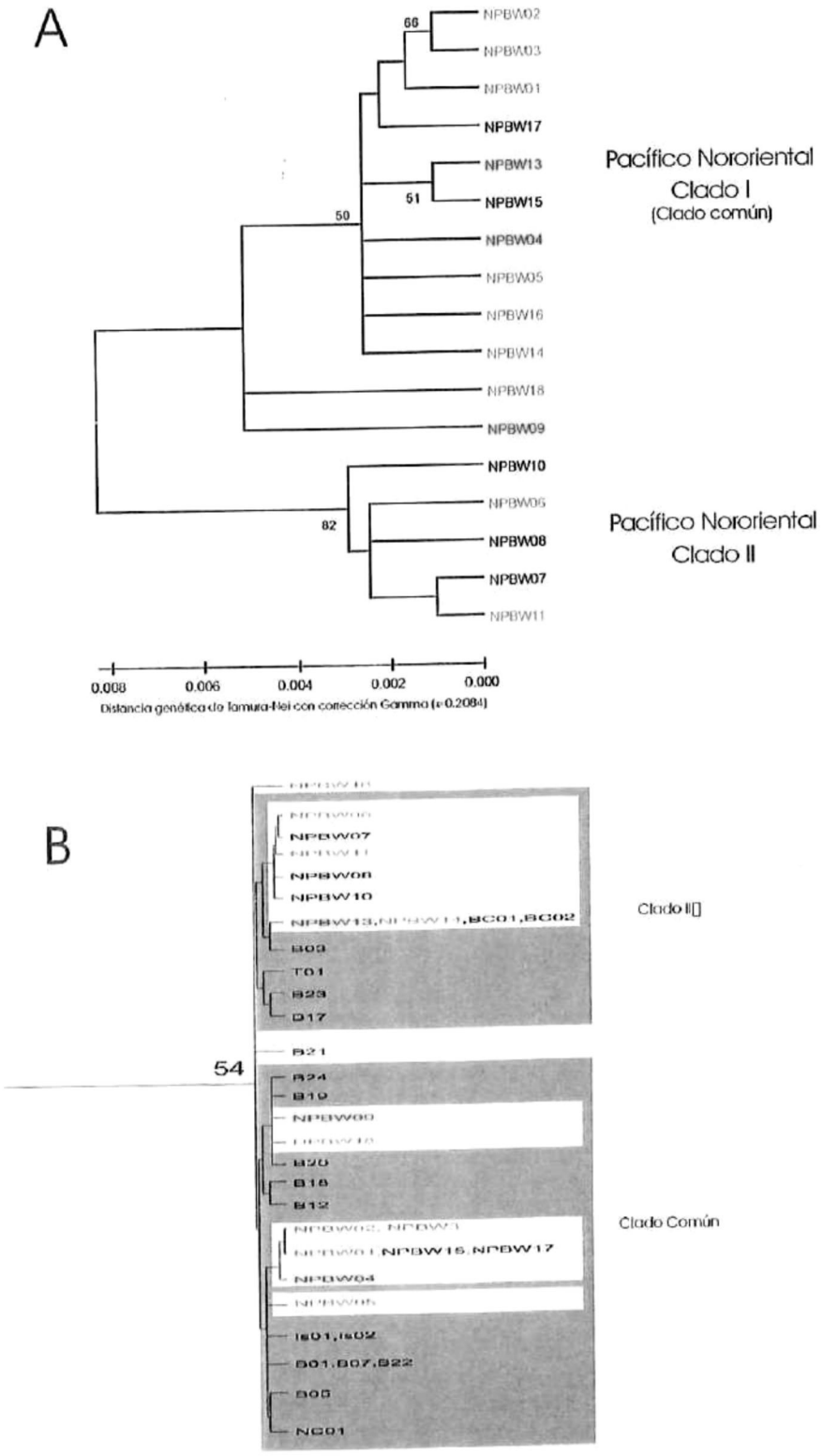


Figura 10. Relaciones filogenéticas entre linajes maternos de ballena azul en las agregaciones mexicanas para los que se han observado hembras lactantes (color verde) o crías, linajes representados exclusivamente por machos (color rojo) y en los que se desconoce el sexo del individuo (azul). Los linajes en color negro incluyen tanto machos como hembras. (A) Exclusivamente linajes de las agregaciones mexicanas. (B) Relación con los linajes de otras regiones geográficas.

DISCUSIÓN

Consideraciones metodológicas

Para el cálculo de las distancias genéticas se decidió emplear un modelo de sustitución nucleotídica que considera desigualdad en las tasas de sustitución. El uso de este modelo se justifica dada la elevada proporción de sitios invariables observados en las secuencias (480/500 para las agregaciones mexicanas; 262/301 al incluir las secuencias del GeneBank) y el claro sesgo hacia las transiciones C/T (65%). Varios de los modelos que incorporan correcciones por desigualdades en las tasas de sustitución y en la composición nucleotídica han mostrado ajustarse de mejor forma a los patrones de sustitución observados en diferentes estudios (p.e. Hasegawa *et al.* 1985; Tamura 1992; Tamura y Nei 1993; Yang 1994a, b; Buckley y Cunningham 2002). Sin embargo, opté particularmente por el uso del modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei 1993) ya que, en un análisis de secuencias homólogas a las empleadas en el presente trabajo, Palsbøll y sus colaboradores (2004) identificaron que el mejor ajuste para los datos de dos poblaciones de ballena de aleta fue el proporcionado por dicho modelo de sustitución (de entre otros 51 modelos evaluados). La ballena de aleta además de ser el misticeto filogenéticamente más cercano a la ballena azul (ver Arnason *et al.* 1993, 2000), presenta claras similitudes en su biología con ésta. Tomando en cuenta la estrecha relación que existe entre el tamaño corporal, la tasa metabólica y los tiempos generacionales con las tasas de sustitución nucleotídicas (Martin y Palumbi 1993), consideré que las diferencias en las tasas de sustitución entre ambas especies debían ser mínimas. En congruencia con lo anterior, el cálculo del parámetro α de la distribución Gamma obtenido en el presente trabajo (0.2084 para el análisis intraespecífico y 0.36 para el análisis interespecífico) fue muy cercano al obtenido por Palsbøll *et al.* (2004) para la ballena de aleta (0.31).

Ya que las distancias genéticas se calcularon a partir de un modelo particular de sustitución nucleotídica, decidí emplear en la reconstrucción filogenética el criterio de optimización por mínima evolución (Rzhetsky y Nei 1992). En términos generales este criterio es similar a la parsimonia, pero a diferencia de esta última la menor cantidad de cambios posibles es evaluada con base en la matriz de distancias calculadas a través de

un modelo evolutivo específico, Tamura–Nei en este caso. Finalmente, la estrategia de búsqueda seleccionada para encontrar la solución óptima fue el algoritmo de asociación entre vecinos (Neighbor-Joining) en función de que puede considerarse un método simplificado del de mínima evolución (Nei y Kumar 2000).

En este trabajo se emplearon dos métodos de alineamiento para las secuencias: MultAlin (Corpet 1988) y MCALIGN (Keightley y Johnson 2004). El primer método simplemente agrupa las secuencias por jerarquías en función a la similitud de las secuencias, mientras el segundo emplea un modelo evolutivo parametrizado en función de la distribución de frecuencias de eventos de inserción/deleción de diferentes longitudes y la tasa relativa de aparición de los mismos con respecto a las sustituciones nucleotídicas. Es importante resaltar que, independientemente del método de alineamiento, el patrón intraespecífico no sufrió ninguna modificación debido a que la presencia de deleciones fue mínima y localizada, al menos para el caso de las ballenas azules.

La reconstrucción filogenética interespecífica basada en el alineamiento con MCALIGN resultó en una topología concordante con las reportadas previamente por Arnason y Gullberg (1994) para citocromo b (cit b), Milinkovitch y colaboradores (1994) para las subunidades ribosomales 12S+16S, y Messenger y McGuire (1998) para 12S+16S+cit b en combinación con 207 caracteres morfológicos. En todas estas reconstrucciones la ballena gris queda topológicamente ubicada como un grupo independiente al formado por la ballena azul, ballena de aleta, ballena jorobada, ballena de Bryde y ballena sei. En contraste, Arnason y Gullberg (1994) presentan una reconstrucción filogenética basada en la región control mitocondrial que ubica a la ballena gris dentro del grupo arriba mencionado. Debe resaltarse que estos últimos autores excluyen de su análisis la mayor parte del dominio hipervariable I debido a la presencia de bloques de inserción/deleción. Como puede apreciarse en el Anexo E, la estabilidad intraespecífica de estos bloques provee una importante señal filogenética, por lo que al ser incluida en el presente análisis y al emplear el alineamiento con MCALIGN, se obtuvo una topología más congruente con las obtenidas para otros genes. Esta topología sugiere una mayor convergencia entre el grupo central de balenoptéridos al excluir a la ballena gris; una

topología aparentemente más adecuada considerando las diferencias morfológicas y conductuales de la ballena gris con respecto a los balenoptéridos (ver Gaskin 1983).

Además, todas las reconstrucciones filogenéticas para el grupo de los misticetos previas a este trabajo, consideran exclusivamente una secuencia de cada especie. En este trabajo se incluyeron secuencias de varios individuos de cada especie, asegurando con ello una mejor resolución en las ramas internas (intraespecíficas) y una reducción importante de la variabilidad interespecífica. La ocurrencia de un sitio variable en una secuencia pudiera representar un cambio único en un espécimen, por lo que al usar varias secuencias homólogas de cada especie, los cambios individuales que se presentan con baja frecuencia tendrían mucha menor influencia en la comparación pareada entre todas las secuencias.

Por lo anterior, considero que la reconstrucción filogenética obtenida en este trabajo refleja confiablemente las relaciones interespecíficas de las especies incluidas como grupos externos. Por ende, a pesar de que los valores de remuestreo que sustentan la topología fueron bajos, la probabilidad de que la topología interna (intraespecífica) sea resultado de un arreglo aleatorio de las secuencias debe ser mínima (ver Penny *et al.* 1992, Nei y Kumar 2000).

Identidad genética de las agregaciones mexicanas de ballena azul del Pacífico Nororiental

El análisis filogenético de las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental proporcionó evidencia de que en el área de estudio ocurren actualmente al menos dos, pero posiblemente más grupos genéticamente divergentes de linajes maternos (ver Fig. 6 y 8). El agrupamiento de los haplotipos más frecuentes de las agregaciones mexicanas con los haplotipos de Antártica, Atlántico Norte y Nueva Caledonia, contrasta con la idea de que las ballenas azules del hemisferio norte y las del hemisferio sur conforman poblaciones discretas, a las que incluso se les ha asignado el carácter de subespecies (ver Rice 1978).

En conjunto, la información filogenética obtenida del presente trabajo, plantea un escenario evolutivo de flujo génico recurrente para las agregaciones mexicanas de ballena azul. La topología del árbol filogenético sugiere el carácter ancestral de los linajes del clado común en las agregaciones mexicanas, y la subsecuente incorporación de linajes pertenecientes del clado II. Desafortunadamente, al no contar con un mayor número de secuencias de ballenas azules de otras agregaciones, esta hipótesis parecería difícil de corroborar.

No obstante, este patrón de flujo recurrente no parece exclusivo de la ballena azul. Un escenario de flujo recurrente muy similar al aquí planteado, puede ser inferido al inspeccionar los trabajos de Baker *et al.* (1993) y Bérubé *et al.* (1998, 2002) que representan, a la fecha, el conjunto de datos genéticos (secuencias homólogas a las del presente trabajo) más completos para ballena jorobada y ballena de aleta, respectivamente (Fig. 11). Bérubé y colaboradores (1998, 2002) estudiaron las relaciones filogenéticas entre 55 haplotipos maternos de ballena de aleta del Atlántico Norte, Mar Mediterráneo y Pacífico Nororiental (Fig. 11 A). Por su parte, Baker y colaboradores (1993, 1990) analizaron la estructura de las poblaciones de ballena jorobada a nivel mundial y establecen las relaciones filogenéticas entre 37 haplotipos maternos de ballenas jorobadas del Pacífico Central y Nororiental, Atlántico Norte y los mares del sur (Fig. 11 B). En ambas especies la posición basal en la topología filogenética esta representada por un clado conformado por haplotipos del Pacífico Norte, particularmente de la costa nororiental, hacia el que se presenta al menos un evento subsecuente de flujo genético desde alguno de los otros clados; patrón consistente al observado para el caso de la ballena azul (Fig. 11 C).

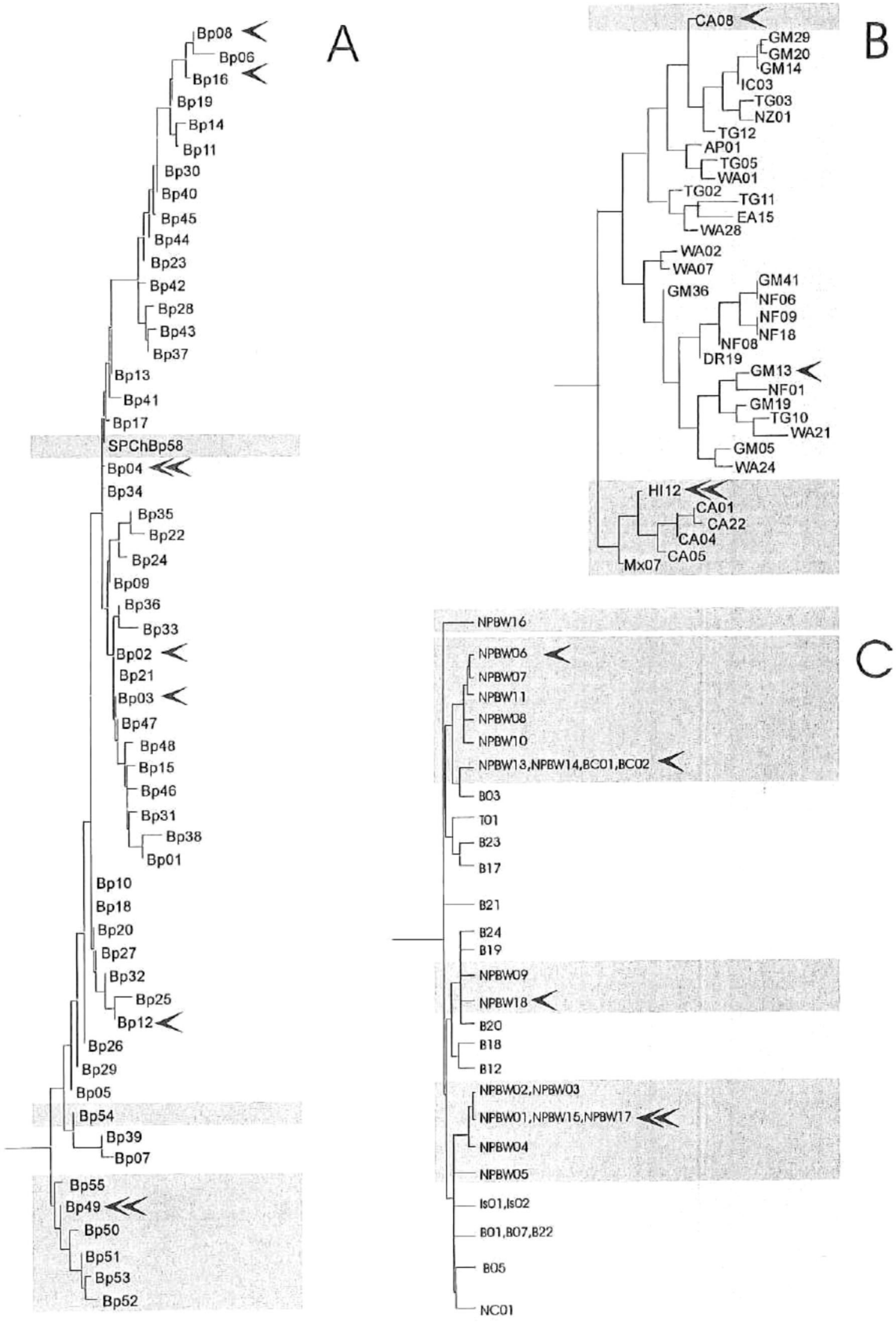
Aun cuando la topología sugiere la posición basal del grupo del Pacífico Nororiental, los valores de diversidad genética más altos, característicos de los centros de origen (ver Avise 2000), se han observado en los mares del sur tanto para ballena jorobada (DNAmt, Baker *et al.* 1993), como para la ballena azul (DNA nuclear, Conway *et al.* 2003). Es posible, sin embargo, que esos mayores niveles de diversidad se hayan adquirido de forma secundaria en función de los patrones de flujo recurrente sugeridos.

Figura 11. Reconstrucción filogenética basada en secuencias homólogas de la región control mitocondrial en tres especies de balenoptéridos:.(A) Ballena de aleta *Balaenoptera physalus*, tomada de Bérubé *et al.* (1998,2002) y modificada por la adición de un linaje de las costas de Chile no incluido en los datos originales; (B) Ballena jorobada *Megaptera novaeangliae*, tomada de Baker *et al.* (1993); y (C) Ballena azul *Balaenoptera musculus* (este trabajo). Los recuadros de color gris obscuro señalan los linajes presentes en las agregaciones del Pacífico Nororiental. Los recuadros de color gris claro señalan los clados comunes para linajes de los mares del sur y el Atlántico Norte. Con una flecha se indican los linajes más abundantes para cada clado y con dos flechas el linaje más abundante para cada especie. La nomenclatura para los linajes se describe brevemente a continuación:

(A) Ballena de aleta: Los códigos Bp01 a Bp48 representan linajes del Atlántico Norte, Bp49 a Bp51 representan linajes del Golfo de California, los linajes Bp52 a Bp55 representan linajes de la costa de California, y el linaje SPCHBp58 representa un linaje de la costa de Chile reportado en el GeneBank (ver Anexo D).

(B) Ballena jorobada: Los códigos representan las localidades de muestreo asignadas a los linajes. California (CA), Golfo de Maine (GM), Islandia (IC), Tonga (TG), Nueva Zelanda (NZ), Península Antártica (AP), Oeste de Australia (WA), Este de Australia (EA), Newfoundland (NF), República Dominicana (DR), Hawai (HI) y México (MX).

(C) Ballena azul: Los códigos de los linajes corresponden a los de las Tablas XI y XV.

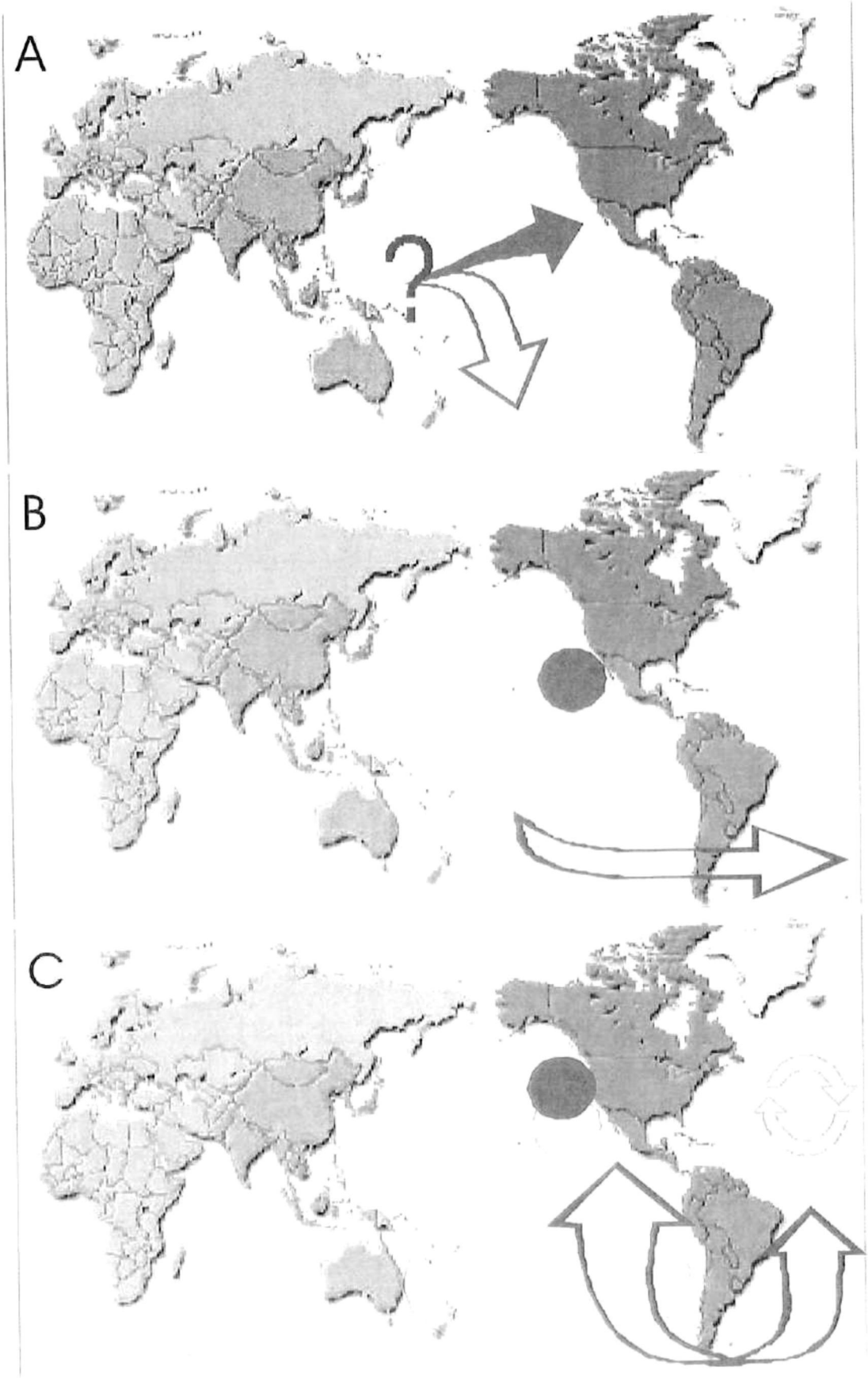

A
Bp08
Bp06
Bp16
Bp19
Bp14
Bp11
Bp30
Bp40
Bp45
Bp44
Bp23
Bp42
Bp28
Bp43
Bp37
Bp13
Bp41
Bp17
SPChBp58
Bp04
Bp34
Bp35
Bp22
Bp24
Bp09
Bp36
Bp33
Bp02
Bp21
Bp03
Bp47
Bp48
Bp15
Bp46
Bp31
Bp38
Bp01
Bp10
Bp18
Bp20
Bp27
Bp32
Bp25
Bp12
Bp26
Bp29
Bp05
Bp54
Bp39
Bp07
Bp55
Bp49
Bp50
Bp51
Bp53
Bp52
B
CA08
GM29
GM20
GM14
IC03
TG03
NZ01
TG12
AP01
TG05
WA01
TG02
TG11
EA15
WA28
WA02
WA07
GM36
GM41
NF06
NF09
NF18
NF08
DR19
GM13
NF01
GM19
TG10
WA21
GM05
WA24
HI12
CA01
CA22
CA04
CA05
Mx07
C
NPBW16
NPBW06
NPBW07
NPBW11
NPBW08
NPBW10
NPBW13,NPBW14,BC01,BC02
B03
T01
B23
B17
B21
B24
B19
NPBW09
NPBW18
B20
B18
B12
NPBW02,NPBW03
NPBW01,NPBW15,NPBW17
NPBW04
NPBW05
Is01,Is02
B01,B07,B22
B05
NC01

El patrón de flujo recurrente más claro ocurre en la ballena jorobada (ver Baker *et al.* 1993), en el que se aprecia una divergencia temprana del grupo de haplotipos del Pacífico Norte (California, Hawai y México), seguida de la separación de otros dos grupos: un grupo dominado por haplotipos del los mares del sur (Australia, Nueva Zelanda, Tonga y Península Antártica) y otro grupo dominado por haplotipos del Atlántico Norte (Islandia, Golfo de Maine, Newfoundland y República Dominicana). Los haplotipos basales de estos dos últimos grupos corresponden al grupo de los mares del sur y no al grupo del Pacífico Norte, como podría esperarse si grupo del Pacífico Norte fuera el ancestro común. El trabajo de Palsbøll y colaboradores (1995), en el que se incluyen un mayor número de individuos pero sólo para el Atlántico Norte, proporciona evidencia adicional que sustenta el origen de las poblaciones de ballena jorobada del Atlántico Norte a partir de los mares del sur; los haplotipos basales de los dos grandes grupos que definen estos autores son también característicos de los mares del sur.

Baker *et al.* (1993) plantean 6 eventos de migración para explicar la distribución geográfica de los haplotipos (Fig. 11 B): dos eventos desde los mares del sur hasta el Atlántico Norte, dos eventos en sentido contrario, y dos eventos de los mares del sur al Pacífico Norte. La ocurrencia de tales eventos migratorios es congruente con la hipótesis de flujo genético recurrente aquí sugerida y esquematizada en la Figura 12. Aunque el conjunto de datos de las tres especies parecen ajustarse bastante bien a esta hipótesis, el carácter local del muestreo para el caso de la ballena de aleta (Atlántico Norte) y de la ballena azul (Pacífico Nororiental) limita en gran medida un análisis más detallado y concluyente.

Es importante, sin embargo, considerar que la información generada a través de marcadores mitocondriales es reflejo de la historia filogeográfica en una escala de tiempo evolutivo (ver Avise 2000), y por lo tanto, el hecho de que actualmente ocurran en las agregaciones mexicanas linajes maternos genéticamente divergentes no implica necesariamente que las conexiones entre grupos ancestrales a partir de los que se originaron estos linajes se mantengan hoy en día.

Figura 12. Reconstrucción hipotética del escenario de flujo recurrente para explicar la distribución actual de linajes maternos en las agregaciones de ballena jorobada *Megaptera novaeangliae*, ballena de aleta *Balaenoptera physalus*, y ballena azul *Balaenoptera musculus*. (A) La hipótesis plantea la existencia de una agregación ancestral en el Pacífico Sudoccidental a partir de la cual se segregaron algunos linajes que ocuparon las recién formadas zonas de surgencia del Pacífico Oriental (agregaciones México/California). Aparentemente las zonas de surgencia en el Pacífico Oriental aparecen como consecuencia de la intensificación del gradiente de temperatura entre los polos y el ecuador promovida por el cierre del canal centroamericano de Panamá durante el Plioceno tardío, hace aproximadamente 3.2 millones de años (ver Marlow *et al.* 2000, Philander y Fedorov 2003). (B) Una vez establecidas las agregaciones del Pacífico Oriental, el grupo del Pacífico Sudoccidental podría haber expandido su distribución adquiriendo una distribución circumantártica. De esta forma los individuos alcanzaron el Atlántico Sur y paulatinamente se dispersaron hacia el Atlántico Norte. (C) Durante el Pleistoceno, los ciclos alternos de glaciación y deglaciación pudiesen haber favorecido que las agregaciones ya establecidas en cada hemisferio se pusieran nuevamente en contacto intercambiando algunos linajes vía Antártica. Este flujo recurrente hipotético podría explicar la co-ocurrencia actual de los dos grupos de linajes maternos tan divergentes en las agregaciones del Pacífico Nororiental, uno de los cuales se encuentra genéticamente asociado a linajes de otras regiones del mundo (Nueva Caledonia e Islandia). Este patrón de flujo recurrente es mucho más claro para el caso de la ballena jorobada debido a la amplia cobertura del muestreo genético y como consecuencia de los hábitos costeros de esta especie (ver Baker *et al.* 1993).


A
?
B
C

La variación genética nuclear, por su parte, refleja patrones filogeográficos más recientes. Dado que el tamaño efectivo de la población de genes nucleares es mucho mayor al de los genes mitocondriales, y a que siguen un patrón de herencia mendeliana, son menos susceptibles que estos últimos a los efectos de la deriva génica (ver Avise 2000). En un análisis reciente de la variación genética a nivel nuclear, Conway y colaboradores (2003) plantean la existencia de 4 grupos igualmente divergentes de ballenas azules a nivel mundial: Atlántico Noroccidental, Océano Índico, Mares del Sur y Pacífico Oriental.

Particularmente relevante resulta el hecho de que los datos de Conway y sus colaboradores (2003) indican continuidad genética entre el Pacífico Nororiental y el Pacífico Sudoriental (desde California hasta el norte de Chile; 10 migrantes por generación); contrastando de nueva cuenta con el concepto de poblaciones discretas entre el Hemisferio Norte y el Hemisferio Sur. A pesar de esta aparente discrepancia, los 4 grupos evolutivamente divergentes sugeridos por Conway y colaboradores (2003) resultan completamente congruentes con la subdivisión de las agregaciones mundiales evidenciada con datos bioacústicos (ver Cummings y Thompson 1971; Beamish y Mitchell 1971; Edds 1982; Thompson and Friedl 1982; Stafford 1995; Thompson *et al.* 1996; Rivers 1997; Stafford *et al.* 1999, 2001; Moore *et al.* 2002). Para el caso particular del Pacífico Oriental, Stafford *et al.* (1999, 2001) plantean la continuidad de las agregaciones entre Vancouver y el Pacífico Oriental Tropical con base en la ocurrencia de un único y distintivo tipo de vocalización que exhibe un patrón temporal congruente con el patrón de migración de la especie. Sin embargo, los datos acústicos más recientes han indicado la presencia de individuos que producen el típico sonido de las agregaciones de Antártica en zonas de baja latitud del Pacífico Oriental y del Océano Índico (Stafford *et al.* 2004).

La designación de las tres subespecies de ballena azul planteada por Rice (1978b) está fundamentada exclusivamente por las diferencias en la talla promedio de las capturas en relación con su distribución geográfica (ver Mackintosh y Wheeler 1929; Ichihara 1966, 1981; Omura 1955; Kato *et al.* 1995). Aunque en términos generales estas diferencias concuerdan con el patrón de distribución discreto sustentado por los datos genéticos de

Conway *et al.* (2003), en el Pacífico Oriental existen algunas evidencias de una aparente mezcla de la subespecie pigmea y de la subespecie del Pacífico Norte (ver Gilpatrick *et al.* 1996, 1999; Ortega-Ortíz 2004).

Con base en variables morfométricas obtenidas a través de fotografías aéreas, Gilpatrick y colaboradores (1995, 1999) señalan que las ballenas azules que ocurren en California, en las aguas oceánicas del Pacífico Mexicano y en el Domo de Costa Rica, presentan proporciones del pedúnculo caudal que se asemejan a las de la forma pigmea. Un análisis similar realizado por Ortega-Ortiz (2004) en las agregaciones mexicanas (Golfo de California y costa occidental de la Península de Baja California) indica que los individuos ahí presentes no son similares a la forma pigmea. De acuerdo con el patrón de migración estacional conocido para las agregaciones del Pacífico Nororiental (ver Calambokidis y Barlow 2004), existen movimientos de individuos desde California hasta el Domo de Costa Rica (Chandler *et al.* 1999, Mate *et al.* 1999) y entre el Golfo de California, la costa occidental de la Península de Baja California y California (Calambokidis *et al.* 1990, Gendron 2002). Si en realidad existen diferencias en las proporciones del pedúnculo caudal en los individuos del Pacífico Nororiental, esto plantearía la posibilidad de que al menos dos grupos de ballenas azules ocurriesen en la zona.

Aunque resultaría tentador asociar las posibles diferencias morfométricas arriba mencionadas con los dos grupos de linajes genéticamente divergentes resultantes del análisis filogenético evidenciado en el presente trabajo, existen algunas limitantes que deben tomarse en cuenta antes de considerar esta opción. En primera instancia, ell análisis filogenético de la región control mitocondrial permitió distinguir dos grupos de linajes, pero no se encontró evidencia alguna de estructura espacial o temporal entre ellos. En otras palabras, y como se mencionó anteriormente, ambos grupos coexisten en las aguas adyacentes a la Península de Baja California con el patrón temporal congruente con la migración estacional descrita para las agregaciones del Pacífico Nororiental. Por otro lado, y a pesar de que el tamaño de muestra para la costa occidental de Baja California no permitió establecer confiablemente si ambos grupos ocupan la costa occidental, la sutil evidencia aquí generada, aunada a los registros del

historial de avistamientos (ver Gendron 2002), sugiere que ambos grupos de linajes ocurren tanto en el Golfo como en la costa occidental. Resultaría entonces difícil de explicar la existencia de dos grupos morfológicamente diferentes, cuando toda la evidencia indica que las agregaciones de California y México forman parte de la misma población.

Una explicación tentativa sería que las ballenas azules que ocurren durante inverno/primavera en el Domo de Costa Rica estuvieran migrando desde el sur siguiendo rutas más oceánicas hacia California, o bien, que otro grupo con una distribución invernal más oceánica se estuviese incorporando a las agregaciones californianas en verano y otoño. Esto abre la posibilidad de que los animales fotografiados por Ortega-Ortíz (2004) en aguas adyacentes a Baja California fueran parte de un grupo que pasa el invierno en aguas del Golfo de California y que migra cerca de la costa hacia California.

Bajo este escenario, las estimaciones de abundancia más recientes para el Golfo de California (362 individuos; C.V.=0.45; Gendron 2002), la costa occidental de la Península de Baja California (576 individuos; C.V.=0.38; Gendron 2002) y para el Pacífico Oriental Tropical (1400 individuos; Wade y Gerrodete 1993), se ajustan bastante bien a las estimaciones realizadas para la costa de California (2,250 individuos; C.V.=0.38; Barlow 1995) y para todo el Pacífico Nororiental (2,994 individuos; C.V.=0.14; Calambokidis y Barlow 2004). Aunque este y otros aspectos referentes al tamaño de la población se discutirán más profundamente en el siguiente capítulo, es importante resaltar que si efectivamente existe un grupo de ballenas azules migrando fuera de la costa, las muestras genéticas analizadas en este trabajo representarían exclusivamente al componente poblacional costero. Por lo anterior, resulta evidente la necesidad de incluir en el análisis genético secuencias de las agregaciones de California y del Domo de Costa Rica para evaluar esta hipótesis.

Finalmente, y recapitulando los resultados del trabajo de Conway y colaboradores (2003), no existe evidencia genética que indique si en realidad existe segregación entre las distintas agregaciones de ballena azul del Pacífico Nororiental. Dada la mayor abundancia del grupo que aparentemente podría estar migrando usando rutas

oceánicas, el efecto del grupo costero (agregaciones mexicanas) pudiese estar siendo minimizado en las comparaciones con las otras agregaciones del Pacífico Oriental. Al considerar en su análisis a las agregaciones mexicanas y californianas como un solo grupo, Conway y sus colaboradores (*op cit.*) podrían estar enmascarando las posibles diferencias sugeridas por las diferencias en el tamaño de los individuos. De la misma forma, las diferencias en la abundancia entre los supuestos individuos costeros y oceánicos, pudiesen estar siendo pasadas por alto en los análisis morfológicos en las agregaciones de California al promediar las agregaciones mexicanas (362-576 individuos) con el resto de los individuos en las agregaciones de California (aprox. 2000-2500).

Diversidad genética en las agregaciones mexicanas de ballena azul

Ante la incertidumbre en la identidad de las agregaciones mexicanas, es necesario señalar en este punto que los valores de diversidad genética aquí reportados deben interpretarse con reserva, teniendo en mente que el muestreo estuvo restringido a un área que representa sólo una porción de la distribución invernal de la especie en el Pacífico Nororiental (ver Reilly y Thayer 1990, Stafford *et al.* 1999, Calambokidis y Barlow 2004), y muy probablemente sesgado hacia uno de los componentes de las agregaciones del Pacífico Oriental. No obstante, estos valores representan una primera aproximación y los únicos datos de diversidad genética mitocondrial para una especie hasta hace poco considerada en peligro de extinción (ver Klinowska 1991, Perry *et al.* 1999, Gerber *et al.* 2000).

La diversidad genética promedio para las agregaciones mexicanas de ballena azul estimada en el presente estudio resulta relativamente baja comparada con las observadas en otras especies de misticetos (Tabla XXI). Este valor de diversidad genética es incluso menor al observado en la población de ballena de aleta del Mar Mediterráneo (ver Bérubé *et al.* 1998); población para la que se ha estimado recientemente un tamaño poblacional similar al reportado para las agregaciones históricas de ballena azul del Pacífico Nororiental (ver Perry *et al.* 1999) pero en la que no existe evidencia de explotación comercial. Sin embargo, una comparación adecuada

sería aquella en la que se incuyan otras poblaciones de ballena azul; las diferencias en la tasa metabólica con respecto al tamaño corporal limitan en cierta medida las comparaciones entre especies (ver Martin y Palumbi 1993).

La diversidad nucleotídica estimada al incorporar los haplotipos de los especimenes disponibles en el GeneBank indica sin embargo que la diversidad es, o podría haber sido, históricamente mayor. Como se mencionó con anterioridad, tales valores de diversidad no representan estimaciones confiables debido a la carencia de información sobre la abundancia relativa de estos haplotupos. No obstante, uno de los aspectos más relevantes que pudo evidenciarse al incorporar estos haplotipos en el análisis filogenético, fue la convergencia de linajes históricos y actuales en ambos clados. No obstante, ninguno de ellos coincidió. En contraste, las secuencias obtenidas por Baker *et al.* (1996), coincidieron con uno de los haplotipos actuales y más frecuentes de las agregaciones mexicanas (BC01 y BC02; ver Fig. 6). Lo anterior podría ser reflejo de que las intensas capturas extirparon de las poblaciones algunos linajes, o bien, de la limitación espacial del muestreo y de una fuerte estructura de las poblaciones.

Tabla XXI. Índices de diversidad genética con relación a las recientes estimaciones de abundancia en algunas poblaciones de misticetos.

Especie (Población)	Abundancia [a]	n [b]	π [c]	π_n [d]	n_H [e]	H [f]
Balaena mysticetus (Bering/Chukchi/Beaufort)	6,900 - 9,200	98	7.384	0.016300	68	0.986
Megaptera novaeangliae (Pacífico Norte)	5,540 - 8,000	31	3.829	0.013530	7	0.750
Megaptera novaeangliae (Atlántico Norte)	6,500 - 10,600	34	5.759	0.020350	15	0.870
Megaptera novaeangliae (Antártico)	12,000 - 20,000	25	6.467	0.022850	16	0.950
Megaptera novaeangliae (Océano Atlántico)	18,500 - 30,600	136	7.488	0.026000	31	0.916
Balaenoptera acutorostrata (Atlántico Norte)	120,000 - 182,000	87	2.243	0.023100	25	0.860
Balaenoptera acutorostrata (Atlántico Norte)	120,000 - 182,000	306	2.925	0.025100	48	0.868
Balaenoptera bonaerensis (Antártica)	510,000 - 1,140,000	23	5.693	0.016500	23	1.000
Balaenoptera physalus (Atlántico Norte)	27,000 - 82,000	235	3.584	0.043000	48	0.896
Balaenoptera physalus (Mediterráneo)	2,130 - 6,027	69	1.526	0.005300	7	0.585
Balaenoptera physalus (Golfo de California)	250 - 380	56	0.202	0.000700	3	0.168
Balaenoptera physalus (California)	998 - 1,483	10	1.670	0.005800	5	0.756
Balaenoptera musculus (Pacífico Nororiental)	2,547 - 3,413	190	3.143	0.006285	17	0.794
Eschrichtius robustus (Pacífico Nororiental)	21,900 - 32,400	120	8.891	0.017000	33	0.950
Eschrichtius robustus (Pacífico Noroccidental)	100 - 200	45	8.368	0.016000	10	0.700
Eubalena australis (Hemisferio Sur)	1,500 - 3,000	99	2.680	0.009178	32	0.913
Eubalena glacialis (Atlántico Noroccidental)	870 - 1,700	269	0.600	0.002055	5	0.698
Eubalena japonica (Pacífico Norte)	350	12	2.100	0.007192	9	0.923

[a] Las estimaciones de abundancia (número de individuos) se obtuvieron de: NMFS (1994), Enríquez (1996), Forcada *et al.* (1996), Barlow (1997), Raftery y Zeh (1998), Chivers (1999), Gerber y DeMaster (1999) y Calmbokidis y Barlow (2004). Otras fuentes de información fueron las páginas electrónicas de la Comisión Ballenera Internacional [www.IWCoffice.org] y de la Fundación Mundial de Vida Salvaje [www.WWF.org]

[b,c,d,e,f] El número de individuos analizados molecularmente (n), el número de haplotipos detectados (n_H), así como la diversidad nucleotídica (n_n) y haplotípica (H) para cada especie y población se obtuvieron de: Baker *et al.* (1993,1998), Palsbøll *et al.* (1995), Bakke *et al.* (1996), Bérubé *et al.* (1998, 2002), Rosenbaum *et al.* (2000)Rooney *et al.* (2001), LeDuc *et al.* (2002), Andersen *et al.* (2003), Roman y Palumbi (2003).

Patrones de uso del hábitat en las agregaciones mexicanas

En conjunto, la ocurrencia simultánea de ballenas azules de ambos clados filogenéticos en las agregaciones mexicanas y la homogeneidad interanual de la diversidad genética sugieren que, a pesar de la divergencia genética entre los linajes que hacen uso del área de estudio durante la temporada invernal, no existe una estructura espacial o temporal que pueda ser asociada con el uso diferencial del hábitat. En la Figura 13 se contrasta la abundancia relativa de linajes maternos de cada clado filogenético, la diversidad nucleotídica, la proporción se sexos y uno de los principales indicadores de las condiciones oceanográficas del Pacífico Oriental Tropical (El Niño Oscilación Sureña, ENSO) a lo largo del periodo de estudio. No se observa ningún patrón que permita relacionar la ocurrencia o el incremento en la abundancia de alguno de los clados en el área de estudio. Sin embargo, es importante resaltar que la mayor abundancia relativa de linajes maternos registrados en el área de estudio se presentó durante la temporada invernal de 1998, durante el intenso ENSO 1997-1998. Sin embargo, los linajes observados en 1998 también se observaron en años durante los que no se presentaron eventos ENSO, y al no contar con información sobre los linajes presentes en otras agregaciones, no es posible concluir si los eventos ENSO pudiesen tener alguna influencia sobre la presencia de algunos linajes maternos.

Con base en la identificación molecular del sexo en algunos individuos Gendron (2002) encontró cierta evidencia de segregación espacial por sexos y sugiere que los machos ocupan aguas más oceánicas mientras que las hembras y los individuos jóvenes prefieren las aguas costeras. En el presente trabajo, aunque se incluyó un mayor número de individuos sexados molecularmente no se encontró ninguna evidencia que sustente una distribución más oceánica de los machos. Sin embargo, y en congruencia con las observaciones de Gendron y Zavala-Hernández (1995) y Gendron (2002), las aguas costeras de la Península de Baja California aparentemente son más intensamente usadas por las hembras de ballena azul. Los datos de captura de otras zonas del Pacífico (Tomilin 1967, Brueggeman *et al.* 1985, Fisheries Research Borrad of Canada 1992) y en Antártica (Brinkmann 1948) sugieren en contraste una proporción de sexos ligeramente sesgada hacia los machos para las zonas de alimentación en altas latitudes.

Con base en la frecuencia de reavistamiento de hembras lactantes e individuos jóvenes, así como a las altas tasas de retorno interanual, Gendron (2002) ha sugerido que el Golfo de California, particularmente en su porción sudoccidental es de gran importancia para la crianza de esta especie. Las marcadas diferencias interanuales en la proporción de sexos, así como los mayores tiempos de residencia y las mayores tasas de retorno para las hembras de ambos clados filogenéticos apoyan esta idea. Más aún, la presencia de madres con cría de los linajes más abundantes de ambos clados, e inclusive para el único linaje aparentemente independiente (NPBW16; ver Fig. 10), aporta mayor evidencia de la importancia del área de estudio para la crianza.

La ausencia de avistamientos frecuentes de parejas madre-cría en otras zonas del Pacífico Nororiental llevó a Gendron (2002) a plantear la posibilidad de que el Golfo de California sea también una zona importante para otras actividades reproductivas. La presencia de un linaje materno representado exclusivamente por un macho en cada uno de los clados filogenéticos podría indicar que machos de otros linajes maternos, distribuidos en otras áreas, visitan el Golfo de California con fines reproductivos. Sin embargo, la diversidad nucleotídica fue menor en los machos que en las hembras de ambos clados, reflejando probablemente la presencia de machos jóvenes y no de machos adultos. Para confirmar la ocurrencia de machos de otras agregaciones será necesaria una muestra de mayor tamaño y con mayor extensión geográfica.

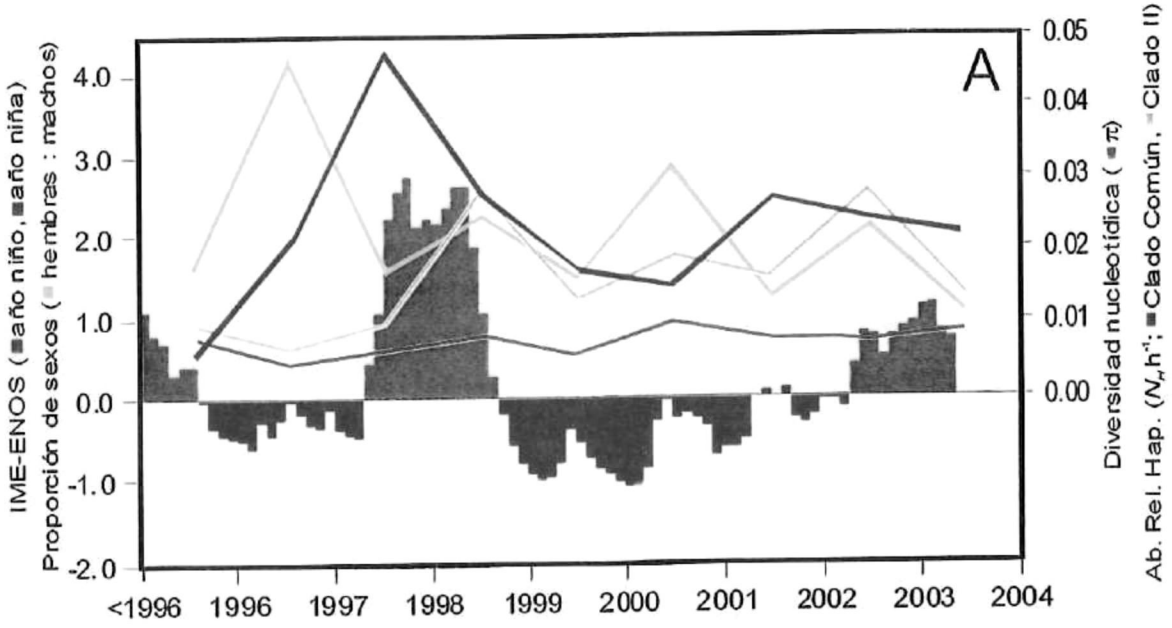


Figura 13. Abundancia relativa de haplotipos maternos en las agregaciones mexicanas ponderada por el esfuerzo de búsqueda en relación a los eventos El Niño Oscilación Sureña (ENOS). Se indican además la proporción de sexos y la diversidad nucleotídica para cada clado. Los valores del índice multivariado estandarizado (IME-ENOS) se tomaron de Wolter y Timlin (1998).

3 Tamaño histórico de las agregaciones de ballena azul del Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California inferida a partir de datos moleculares genéticos.

RESUMEN

A pesar de que la captura comercial de ballenas redujo severamente todas las poblaciones de grandes cetáceos, luego de casi 40 años de total protección por parte de la Comisión Ballenera Internacional, no existe una estimación confiable de los niveles de abundancia previos a la explotación que permitan evaluar los niveles de recuperación de estas especies. Recientes revisiones a los modelos de dinámica poblacional y de reconstrucción histórica de la demografía para los misticetos, han enfatizado el hecho de que los niveles de incertidumbre para ciertos parámetos clave de estos modelos proporcionan líneas de base extremadamente distintas para evaluar el estatus actual de las poblaciones. Lo anterior ha puesto en tela de juicio el valor de los datos genéticos para los planes de manejo sustentable. A través de una aproximación novedosa, que resultó congruente tanto con los niveles de abundancia actuales como con los inferidos para los stocks originales en varias especies de misticetos, en este capítulo se estimó del tamaño poblacional histórico de las ballenas azules en las agregaciones mexicanas del Pacífico Nororiental. A primera vista, el número de ballenas azules estimado para las agregaciones mexicanas y el stock del Pacífico Norte, parece más realista y congruente con los escenarios de explotación sugeridos por las estadísticas de captura y la escasa información sobre la dinámica poblacional en cetáceos. Sin embargo, la incertidumbre en mucha de esta información representó un impedimento para el establecimiento de los intervalos de confianza para las estimaciones, por lo que los resultados que aquí se presentan deben ser considerados como preliminares y de ninguna forma concluyentes. Con base en la estimación del tamaño histórico poblacional inferida a través de los datos moleculares generados en este trabajo, se simuló el crecimiento poblacional considerando los niveles de explotación comercial de la especie. Dicha simulación resultó congruente con los niveles de abundancia actual para la ballena azul del Pacífico Nororiental estimados mediante transecto lineal y marcado-recaptura. No obstante, la abundancia actual de esta especie en las agregaciones invernales mexicanas representa sólo una tercera parte del total estimado para el verano en las costas de California, lo que sustenta la idea de que existe al menos otra agregación invernal. Los individuos de esa agregación deben ser incluidos en futuros análisis para obtener una serie de datos tanto genéticos como demográficos que permitan estimar con mayor precisión el tamaño poblacional histórico, así como los niveles de abundancia actuales, con el objeto de establecer medidas adecuadas para el manejo y la recuperación de la especie.

3 Historical population size of blue whale aggregations from the Gulf of California and the west coast of the Baja California Peninsula inferred from molecular genetic data.

ABSTRACT

Commercial whaling is known to have severely reduced all large cetacean populations but, since reliable estimates of former stocks are not available, recovery levels after nearly 40 years of full protection by the International Whaling Commission remain not easy to recall. Recent reviews of whale population dynamics and historical reconstruction models had pointed out that uncertainty in key parameters in both demographic and genetic models provide huge different baselines of recovery status. Traditional genetic estimates of pre-whaling stocks differ by an order of magnitude from current abundance estimates and had lead to a controversial discussion on its value to management. In this chapter, a novel approach for the analysis of genetic neutral diversity, which proved to be in full concordance with both current and pre-exploitation estimates of abundance of most baleen whale populations, was used to asses the historical population size of blue whale Mexican aggregations at the Northeast Pacific. At a first sight, the number of blue whales estimated for the Mexican aggregations and the North Pacific stock, seems to be more realistic and compatible with exploitation scenarios available from whaling statistics, as well as with the scarce population dynamic parameters for whales. However, uncertainty at such parameters represented a handicap in setting confidence limits for historical population-size estimates and therefore, results must be considered preliminary and not conclusive. Gross simulations of post-whaling population growth, based on genetic estimates of historical population size of blue whales at the Mexican winter aggregations and at the Northeast Pacific stock were close to recent abundance estimates based on line-transect and mark-recapture for the Northeast Pacific blue whales. Nevertheless, current estimates for the Mexican winter aggregations represent only one third of the population size estimated for the summer aggregations in California waters, supporting the existence of at least another wintering ground in the Northeast Pacific. Individuals from such aggregation need to be included in future analysis in order to obtain more reliable data sets for both genetic and demographic estimates of historical, as well as current population sizes that can lead to an adequate management and recovery plans for the species.

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha planteado que la intensa explotación que sufrieron algunas poblaciones de misticetos, particularmente en el hemisferio sur, impactó de manera importante del ecosistema marino al remover uno de los niveles basales de la cadena trófica (ver Baker y Clapham 2004). Es por ello que la reconstrucción histórica de la dinámica poblacional de estas especies se considera crucial para el entendimiento de las medidas de restauración ecológica del ambiente marino y la planificación de la potencial reapertura de las capturas comerciales.

Luego de casi cuatro décadas de protección en todos los stocks de grandes cetáceos, se ha considerado que algunas poblaciones muestran ya algunos signos de recuperación (ver Perry *et al.* 1999). Sin embargo, este no parece haber sido el caso para poblaciones como la de ballena franca en el Atlántico Norte (WWF 2003), la de ballena gris en el Pacífico Noroccidental (WWF 2003), y las de ballena azul en los mares del sur (IWC 2000, 2001) y el Pacífico Noroccidental (ver Kato y Miyashita 2004). En el otro extremo, se sabe que poblaciones como la de ballena gris en el Atlántico Norte fueron abatidas por la explotación desde hace varios cientos de años (Kurlansky 2000). No obstante, independientemente de qué tan alentadoras o preocupantes puedan parecer las estimaciones de los niveles actuales de abundancia de estas poblaciones, es importante señalar que el parámetro clave para la evaluación de los niveles de recuperación de las mismas radica en una estimación fidedigna de los niveles de abundancia poblacional previos a la explotación comercial; parámetro que a la fecha se considera incierto y elusivo a los diferentes métodos empleados para su cálculo (ver Baker y Clapham 1993).

Los modelos de dinámica poblacional aplicados por la Comisión Ballenera Internacional (IWC) utilizan como base los registros históricos de las capturas, así como las estimaciones de la tasa neta de crecimiento poblacional y de abundancia actual para retro-calcular los niveles de abundancia previos a las capturas (ver Baker y Clapham 2004). A pesar de que los niveles de abundancia actual en las poblaciones de misticetos ha podido ser establecida con mayor precisión gracias a la implementación de métodos como la fotoidentificación (ver Hammond 1986, Hammond *et al.* 1990) y/o transectos

lineales (ver Buckland *et al.* 2001), existe una controversial discrepancia en cuanto a la validez de los datos de registro de capturas en las bitácoras de la flota comercial (ver Holt y Young 1991, Holt 2004).

Hace una década, se presentó evidencia de que las estadísticas oficiales resguardadas por la Comisión Ballenera Internacional, eran imprecisas debido a la falsificación sistemática de los registros de captura por parte de la flota ballenera rusa (Yablokov 1994). El número de animales arponeados pero perdidos durante las maniobras y las capturas ilegales (piratas) se han señalado como otras potenciales fuentes de sesgo en los registros (Holt y Young 1991, Roman y Palumbi 2003). Por lo anterior, resulta evidente que los parámetros clave para la aplicación de los modelos clásicos de dinámica poblacional y retro-cálculo demográfico presentan niveles de incertidumbre que dificultan la obtención de estimadores insesgados del número de individuos que conformaban las poblaciones antes de la caza comercial (ver Baker y Clapham 2004).

Con la incorporación del análisis de marcadores moleculares de DNA al campo de la ecología poblacional de los grandes cetáceos, se ha generado una importante cantidad de información acerca de los niveles de diversidad genética en sus poblaciones (ver Hoelzel 1991, Dizon *et al.* 1997). En teoría, la diversidad genética de un marcador genético neutral[28] refleja el tamaño de una población ya que esta diversidad varía a través del tiempo con una tasa de sustitución nucleotídica determinada en una población cerrada o semi-cerrada; las poblaciones numerosas y demográficamente estables acumulan más cambios en el tiempo evolutivo que aquellas poblaciones pequeñas y fluctuantes (ver Avise *et al.* 1988, Avise 2000).

Cuando una población decrece en abundancia pierde una fracción de su diversidad genética, pero esta pérdida no es tan acelerada como la reducción en la abundancia de los individuos. Por ende, sería posible estimar el número de individuos que explicarían

[28] La diversidad genética neutral refiere aquella variación asociada exclusivamente con los eventos de mutación. Bajo el concepto de la teoría de evolución molecular neutralista, una mutación permanece o desaparece del acervo genético de una población en respuesta a procesos estocásticos y no debido a su valor adaptativo mediado por la selección natural.

los niveles actuales de diversidad y contrastar dicho número con los niveles actuales de abundancia para evaluar el efecto de las capturas en las poblaciones.

Sin embargo, las estimaciones basadas en parámetros genéticos para algunas de las especies de grandes cetáceos (p.e. Rooney *et al.* 2001, Roman y Palumbi 2003) sobrepasan las estimaciones de abundancia, actuales y previas a la captura comercial, hasta por un orden de magnitud. De acuerdo con Lubick (2003) y Holt (2004) las estimaciones basadas en datos genéticos resultan incoherentemente elevadas, por lo que las discrepancias con las tendencias poblacionales actuales e históricas difícilmente podrían ser atribuidas a una subestimación sistemática de las capturas comerciales. Por su parte, Roman y Palumbi (2003) señalan que una de las principales fuentes de incertidumbre en la estimación del tamaño efectivo histórico a través de datos genéticos esta asociado con el cálculo de la tasa de sustitución nucleotídica (p.e. calibración del reloj molecular; ver Avise *et al.* 1988, Nei y Takahata 1993, Nee *et al.* 1995, Beerli y Felsenstein 1999). Sin duda, la relativamente escasa información sobre las tasas de flujo genético entre las poblaciones de muchas especies, y por ende de los límites de las mismas (ver Baker y Palumbi 1997), es también otro factor que introduce incertidumbre en la estimaciones.

Ante la evidente discrepancia e incertidumbre de las distintas aproximaciones que hasta ahora han sido empleadas para estimar la abundancia histórica de las poblaciones de misticetos, resulta crucial la búsqueda de alternativas más apropiadas que permitan establecer una línea de base confiable para evaluar el nivel de recuperación de estas especies. Las implicaciones que una incorrecta estimación de la abundancia histórica traería para el manejo futuro de estas especies son particularmente serias. Al subestimar la abundancia previa a las capturas comerciales se estaría sobre-estimando la tasa de recuperación, lo que alentaría prematuramente a la reapertura de las capturas (ver Baker y Clapham 2004). Consecuentemente, nuestra habilidad para evaluar la respuesta de las poblaciones a los cambios ecológicos a gran escala estaría siendo enmascarada por el efecto de un nuevo, y seguramente más tecnificado y eficiente, periodo de explotación comercial. Por el contrario, al sobre-estimar los niveles de abundancia históricos estaríamos lejos de poder considerar la remoción de individuos y

el aprovechamiento sustentable de las poblaciones de los grandes cetáceos, principal objetivo del plan de manejo (NMP; New Management Procedure) de la Comisión Ballenera Internacional (ver Holt y Young 1991).

El presente capítulo presenta una estimación del tamaño de las agregaciones mexicanas de ballena azul en aguas adyacentes a la Península de Baja California con base en los niveles de diversidad genética, pero a través de una aproximación que incorpora información referente a la historia demográfica de los linajes de cada agregación.

Antecedentes

Se ha especulado que la población mundial de ballenas azules alcanzó alguna vez cerca de 275,000 individuos[29]: 14,000 *B. m. musculus* en el Pacífico Norte (Oshumi y Wada 1974), 12,000 *B. m. musculus* en el Atlántico Norte, 240,000 *B. m. intermedia* y 10,000 *B. m. brevicauda* en los mares del sur (ver Gambell 1976, Perry *et al.* 1999, WWF 2003, IWC 2000, 2001). Cuando en 1864 se introdujeron el arpón explosivo y las embarcaciones impulsadas a vapor a las operaciones de captura comercial, el tamaño y la velocidad de esta especie, que hasta entonces la habían mantenido al margen de las capturas comerciales, dejaron de ser una limitante para la flota ballenera. Debido al mayor rendimiento en aceite y carne que podía obtenerse al cazar al animal más grande que existe en el planeta, pero también a la reducción en la captura por unidad de esfuerzo de otras especies por la sobreexplotación, las ballenas azules se convirtieron en el blanco principal de la industria ballenera y sus poblaciones declinaron severa y aceleradamente a nivel mundial.

Hasta 1967, fecha en la que la Comisión Ballenera Internacional (IWC) declaró la prohibición de las capturas de esta especie en todas sus poblaciones, el número de ballenas azules capturadas fue de alrededor de 342,640 (5,761 en el Pacífico Norte;

[29] Con base en las tallas de los especímenes de ballena azul y la distribución geográfica de los mismos, Rice (1978) reconoce tres subespecies de ballena azul. Sin embargo, recientes estudios morfométricos (Gilpatrick *et al.* 1999) y genéticos (Conway *et al.* 2003) sugieren que esta supuesta separación geográfica no es completa. Aunado a esto, existe una clara dificultad para identificar la forma pigmea en el campo. *B.m.musculus* = ballena azul del Hemisferio Norte. *B.m.intermedia* = ballena azul del Hemisferio Sur. *Bmb* = *Balenoptera musculus brevicauda*, ballena azul pigmea del Hemisferio Sur.

6,200 en el Atlántico Norte; 330,680 en los mares del sur) y las estimaciones más recientes indican que actualmente existen a lo mucho entre 7,960 y 8,750 individuos en todo el mundo (ver Perry *et al.* 1999), razón por la que la mayoría de sus poblaciones se consideran amenazadas o en peligro de extinción (ver Mace y Lande 1991, IUCN 1996).

Durante el periodo más intenso de operación de la flota ballenera en el Pacífico Norte (1917-1939), los japoneses, rusos, norteamericanos, y noruegos concentraron sus capturas en la porción más norteña de la distribución histórica de esta especie (ver Tilman 1975, Perry *et al.* 1999), entre Kamchatka y el Golfo Este de Alaska; zonas para las que durante las últimas y recientes exploraciones no se han registrado avistamientos de la especie (ver Forney *et al.* 1995b, Kato y Miyashita 2004). De hecho, la única evidencia de la ocurrencia actual de ballenas azules de esas subpoblaciones es el conjunto de datos bioacústicos que indican la presencia de un número desconocido de ballenas azules a lo largo de todo el año (Stafford *et al.* 2001, Moore *et al.* 2002). Lo anterior sugiere que la explotación comercial en esas áreas fue particularmente severa.

La especie también fue cazada intensamente a lo largo de la costa oeste de Norteamérica, donde varias estaciones costeras canadienses y norteamericanas operaron entre 1918-1939 (ver Kellogg 1931, IWC 1942, Brueggeman *et al.* 1985). Adicionalmente, bajo concesión del gobierno mexicano, la flota noruega operó en la costa occidental de la Península de Baja California entre 1924 y 1929, particularmente frente a Bahía Magdalena, (ver Tønnessen y Johnsen 1982). Aunque no existen estadísticas precisas sobre las operaciones de captura en estas áreas, Tønnessen y Johnsen (*op cit.*) reportan un total de 1,994 ballenas azules cazadas entre 1910 y 1934 para la costa oeste de Norteamérica, 43% de las cuales fueron capturadas frente en la costa occidental de la Península de Baja California.

A pesar de que la reducción en el número de ballenas azules era cada vez más evidente en los datos de captura por unidad de esfuerzo, tanto en las agregaciones costeras del Pacífico Norte como en otras regiones del mundo (ver Tønnessen y Johnsen 1982, Holt y Young 1991), la flotas soviética y japonesa continuaron con las operaciones pelágicas sobre esta especie hasta que fue declarada bajo protección y la Comisión Ballenera

Internacional prohibió completamente su captura en 1965 (IWC 1966). Algunos autores han sugerido que para finales de la década de los 70's el remanente poblacional de esta especie en el Pacífico Norte no sobrepasaba los 1,500 individuos (ver Gambell 1976, Yochem y Leatherwood 1985, Perry *et al.* 1999).

La abundancia de ballenas azules fue estimada por transecto lineal en el Pacífico Oriental Tropical para las temporada verano/otoño 1986-1990 (Wade y Gerrodete 1993) y en la costa de California para verano/otoño de 1991 (Barlow 1995). Dichas estimaciones arrojaron un total de 1,400 (C.V.=0.24) y 2,250 (C.V.=0.41) individuos respectivamente. Sin embargo, la estimación por transecto lineal más reciente (ver Calambokidis y Barlow 2004), en la que se incluyen las ballenas azules que se distribuyen a lo largo de la Península de Baja California durante otoño, y no sólo aquellas que ocupan la costa de California, indica cerca de 3,000 individuos (C.V. = 0.14). Paralelamente, Calambokidis y Barlow (2004) estimaron el tamaño de la población mediante fotomarcado y recaptura, obteniendo un total aproximado de entre 1,167 y 2,357 individuos.

Gendron (2002) estimó también por transecto lineal que el número de ballenas azules que ocupan el Golfo de California durante el invierno, así como la costa occidental de la Península de Baja California durante la primavera fue de 362 (C.V. = 0.45) y 576 (C.V.= 0.38) respectivamente. Resulta obvio entonces que el número de ballenas azules estimado para las agregaciones mexicanas representa tan sólo una porción del total estimado para aguas de California, lo que sugiere que deben existir otra u otras zonas de agregación en las que pasan el invierno el resto de los individuos que se congregan durante el verano en las costas de California (ver Introducción, Capitulo 2).

En una revisión sobre el estado actual de algunas especies de grandes cetáceos, Perry y colaboradores (1999) consideran que debido a que las agregaciones de ballena azul del Pacífico Nororiental han mostrado signos de recuperación, este stock podría ser candidato para ser retirado de la lista de especies amenazadas. Las tendencias de incremento en la abundancia de este stock reportadas por Calambokidis y Barlow (2004) sustentarían dicha acción. Sin embargo, para poder establecer confiablemente los

niveles de recuperación se requeriría de información detallada sobre la abundancia histórica y los limites del stock, así como de estudios sobre los requerimientos de hábitat. Como se ha mencionado anteriormente, toda esa información resulta aún escasa y no concluyente.

Las mayor parte de las evidencias bioacústicas apuntan hacia la existencia de al menos dos subpoblaciones discretas en el Pacífico Norte: las agregaciones del Pacífico Noroccidental y las del Pacífico Nororiental (ver Stafford *et al.* 2001, Moore *et al.* 2002, Stafford 2003). No obstante, la relación que existe o que pudiese haber existido entre las agregaciones del Pacífico Nororiental (Golfo de Alaska, British Columbia, Washington, Oregon, California, Hawai, Baja California y el Domo de Costa Rica) es aún incierta (ver Capítulo 2).

El panorama se complica aún más al considerar que las agregaciones de las Islas Galápagos, Ecuador, Perú y el norte de Chile, en conjunto con las del Pacífico Nororiental, muy probablemente conforman una subpoblación discreta para la que se ha considerado la designación de "grupo del Pacífico Oriental" (ver Capítulo 2, Conway *et al.* 2003). Aunque la información sobre la abundancia histórica y actual de las ballenas azules del Pacífico Oriental al sur del ecuador es escasa, existe evidencia de que las operaciones de captura también fueron intensas en las costas de Perú, Ecuador y las Islas Galápagos, al menos entre 1924 y 1935 (ver IWC 1942, Tønnessen y Johnsen 1982).

Al desconocer los límites de las agregaciones resulta prácticamente imposible estimar con precisión la abundancia en cada una de ellas. A la vez, si efectivamente las agregaciones representan una sola unidad poblacional, las estimaciones de abundancia actuales podrían estar reflejando un número de individuos mucho mayor al que en realidad existe.

Por todo lo anterior, suponiendo que existe una continuidad en las agregaciones del Pacífico Oriental y que el Golfo de California representa el hábitat invernal de una parte importante de dicho stock, la estimación del tamaño efectivo histórico de la población

basada en los datos genéticos debería corresponder a un número cercano a la estimación actual para el stock México/California si efectivamente la población se ha recuperado. Por otro lado, y suponiendo que las agregaciones mexicanas y las agregaciones del Pacífico Oriental Tropical conforman parte de la misma población, el número total estimado para la agregación de las costas de California, debería representar la suma de las estimaciones realizadas en las agregaciones mexicanas y aquellas del Pacífico Oriental Tropical a menos de que existan componentes poblacionales en otras zonas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parámetros demográficos de las agregaciones: Pruebas de neutralidad selectiva y distribución de las diferencias pareadas entre secuencias.

Ya que la abundancia y la divergencia genética de los linajes presentes en una población es reflejo directo de su historia demográfica (ver Avise *et al.* 1984), se analizó la neutralidad selectiva y la distribución de las diferencias nucleotídicas entre todos los linajes para poder evaluar posteriormente su relación con el tamaño histórico de las agregaciones y los niveles actuales de abundancia. Para ello se aplicó una prueba de neutralidad selectiva usando el estadístico *D* (Tajima 1993) que compara dos estimadores de variabilidad génica; uno basado en el número de sitios variables entre haplotipos y el otro basado en la diversidad nucleotídica (π_n). La prueba supone que ambos estimadores deben generar un valor igual o muy cercano cuando los sitios variables (mutados) tienen una distribución homogénea a lo largo de secuencia de DNA; implicando que la aparición y permanencia de nuevos haplotipos en la población no es selectiva.

Paralelamente, se analizó la distribución de frecuencia del número observado de diferencias pareadas (mismatch distribution) entre todos lo pares de haplotipos y se calculó el índice de irregularidad (raggedness) de Harpending (1994) que toma valores altos para distribuciones multimodales y valores bajos para distribuciones unimodales o suavizadas (Aris-Brosou y Excoffier 1996, Rogers y Harpending 1992).

Se graficó también la distribución por clases de frecuencia de los haplotipos como un posible indicador de eventos históricos en la demografía de las agregaciones. De acuerdo con Liukart y colaboradores (1998) los eventos de cuello de botella causan una distorsión transitoria característica en la distribución de frecuencia de las clases de alelos presentes en una población, haciendo que los alelos presentes en frecuencias bajas sean aún menos frecuentes.

Tamaño efectivo histórico en las agregaciones mexicanas de ballena azul

Para los linajes maternos mitocondriales la relación entre la diversidad genética *(θ)* y el tamaño efectivo de la población (N_e) esta dada por $\theta = 2N_e\mu$; donde μ es la tasa de sustitución (mutación) por generación (ver Beerli y Felsenstein 2001).

Desde mi punto de vista, las aproximaciones al tamaño efectivo de las poblaciones realizadas tradicionalmente a través de la relación arriba mencionada, han pasado por alto un factor importante al no considerar la variación total contenida en la población. Ya que las estimaciones que realicé en este trabajo incorporan este factor, a continuación describo paso por paso el procedimiento y la lógica que seguí para calcular N_e:

1. El índice de diversidad genética θ puede estimarse a través de diferentes aproximaciones (p.e. Ewens 1972, Zouros 1979, Chakraborty y Weiss 1991, Felsenstein 1992, Fu 1994). Sin embargo, si puede suponerse un modelo de sustitución infinito con mutaciones neutrales (infinite site model) y existe un equilibrio entre la mutación y la deriva génica (tamaño constante de la población) entonces el promedio teórico E(π)= θ (Kimura 1968, Watterson 1975, Tajima 1983). Adicionalmente π es mucho menos sensible a los cambios en el tamaño de población (que fluctua extensamente en el tiempo evolutivo), así como al tamaño de la muestra (ver Nei y Kumar 2000).

2. La tasa de sustitución nucleotídica promedio por sitio (nucleótido) por año *(λ)* se calculó como el promedio de la divergencia intraespecífica de los linajes a través de la relación $\lambda = \theta/T$; donde θ es la diversidad genética promedio entre todos linajes y T corresponde al tiempo de divergencia estimado entre los linajes. El tiempo de divergencia se estimó directamente a partir de la reconstrucción filogenética (ver Capítulo 2), empleando como base los tiempos estimados a partir del registro fósil (ver Arnason *et al.* 2000). Para ello se utilizó la herramienta gráfica para calibrar los tiempos de divergencia del programa Mega v3.0 (Kumar *et al.* 2004). Con fines comparativos, se calculó también el tamaño histórico de las agregaciones empleando valores de las

tasas de sustitución nucleotídica reportados en estudios previos para misticetos (p.e. López *et al.* 1997, Pesole *et al.* 1999, Roman y Palumbi 2003).

3. La tasa de sustitución nucleotídica promedio por sitio por generación *(μ)* se obtuvo simplemente como el producto de λ y T_G ; donde T_G se estimó como dos veces la edad promedio de las hembras preñadas en los datos de captura comercial o dos veces la edad estimada de madurez sexual (p.e. si una hembra madura sexualmente a los 10 años, su primera cría tardará 10 años en madurar y tener su propia cría; es decir 20 años de tiempo generacional).

4. La tasa de sustitución nucleotídica promedio por linaje *(v)* se calculó como la sumatoria de μ a través de todos los sitios que representan cada linaje (Nei y KUmar 2000). Es decir, si cada sitio tiene una tasa de sustitución promedio, y cada linaje esta representado por m sitios, entonces $v = \mu m$; donde m es la longitud de la secuencia analizada (número de nucleótidos).

5. Ahora bien, si θ es la diversidad nucleotídica promedio entre linajes, entonces θ proporciona información sobre la variación contenida en cada linaje de la población. Ya que la fuente de variación es cada haplotipo y en cada uno de ellos puede ocurrir un evento de sustitución de forma independiente, la variación total contenida en la población corresponderá entonces a la sumatoria de la variación promedio de todos los linajes presentes en la población. Así, la diversidad nucleotídica poblacional (θ_P) será entonces $\theta_P = \theta N_H$; donde N_H es el número de linajes.

6. Finalmente la relación $\theta = 2N_e\mu$ se puede expresar ahora como $\theta_P = 2N_e v$. De esta forma se obtiene un estimador que puede interpretarse de la siguiente manera: Si existe una variación o diversidad promedio en cada linaje materno, adquirida a través del tiempo evolutivo, el número de hembras reproductivamente activas que explicarían el patrón de polimorfismo o diversidad genética contenido actualmente en la población correspondería a N_e.

Extrapolación al tamaño total de las agregaciones

La información disponible referente a la estructura social y a la biología reproductiva en los misticetos es particularmente escasa y fragmentaria, razón por la que no se conocen con precisión las frecuencias relativas por clases de edad y sexo en sus poblaciones. Debido a que gran parte de los datos biológicos provienen de las operaciones de captura comercial posteriores al decline de las poblaciones de ballena azul, la información reportada para esta especie es particularmente limitada (ver Brinkmann 1948, Tomilin 1967, Ichihara 1966, Brueggeman *et al.* 1985, Yochem y Leatherwood 1985). Por lo anterior, los datos reportados para la ballena de aleta (Mackintosh 1942; Brinkmann 1948; Lockyer 1981, 1984) fueron considerados como la mejor alternativa para delimitar parámetros reproductivos y poblacionales de la ballena azul.

Con base en los datos reportados por Brinkmann (1948) para Antártica, y por Brueggeman y colaboradores (1985) para el Pacífico Norte, el número promedio de hembras preñadas o reproductivamente activas (N_e) se consideró como el 35% del total de las hembras adultas (N_{HA}). El número de machos adultos (N_{MA}) se calculó entonces como el número de hembras adultas corregido por la proporción de sexos (P_s), que en el caso de la ballena azul está ligeramente sesgada hacia las hembras. El número de individuos inmaduros o jóvenes (N_{Im}) se consideró cercano al 22% del total de la población. Por lo tanto, el número total de individuos se calculó por medio de la siguiente aproximación:

$$N_T = N_{HA} + N_{MA} + N_{Im} = N_e/0.35 + P_s(N_e/0.35) + 0.22[N_e/0.35 + P_s(N_e/0.35)]$$

Donde N_T es el número total de individuos; N_{HA} es el total de hembras adultas; N_{MA} es el número de machos adultos; N_{Im} el número de individuos inmaduros; N_e el tamaño efectivo de la población (número de hembras reproductivamente activas); y P_s es la razón machos/hembras estimada a partir de la asignación molecular del sexo. Esta aproximación es muy similar a la que emplearon Roman y Palumbi (2003) para extrapolar el número total de individuos en otras poblaciones de misticetos.

Se estimó el tamaño histórico de las agregaciones mexicanas de ballena azul a través del modelo tradicional ($\theta = 2N_e\mu$) y del modelo sugerido en este trabajo ($\theta = 2N_e\gamma$). Ambas estimaciones se contrastaron con los niveles de abundancia actuales y los niveles de abundancia históricos basados en los datos de captura.

Adicionalmente, considerando que las modificaciones incorporadas al modelo tradicional representan una aproximación novedosa, se estimó el tamaño histórico en otras poblaciones y especies de misticetos con base en los niveles de diversidad genéticos disponibles en la literatura con el fin de evaluar los números generados por el modelo.

En particular, decidí estimar el tamaño histórico en las poblaciones de ballena jorobada y ballena de aleta del Atlántico Norte usando el mismo juego de datos que emplearon Roman y Palumbi (2003, support on line), así como la población de ballena jorobada del Pacífico Norte y las poblaciones de ballena de aleta del mar Mediterráneo y el Golfo de California. Estas dos últimas poblaciones aparentemente cumplen con gran parte de los supuestos que el modelo de coalescencia exige (población cerrada y de tamaño constante) pues ambas se consideran residentes, con escaso o nulo flujo génico con otras poblaciones vecinas y en ninguna de ellas existe evidencia documentada de explotación comercial (ver IWC 1942).

Intervalos de confianza del estimador de tamaño poblacional histórico

Debido a que muchos de los parámetros empleados en la estimación del tamaño histórico poblacional (p.e. tiempo generacional, estructura de edades, proporción de sexos) y otros están representados por distribuciones con amplios recorridos (rangos), empleé un esquema de remuestreo Monte Carlo usando el programa Crystal Ball 7.0® (Decisioneering, Inc.). Se muestrearon aleatoriamente a lo largo de su recorrido: la diversidad nucleotídica, el tiempo de divergencia, el tiempo generacional, la proporción adultos reproductores: adultos totales, la proporción de sexos y la proporción de jóvenes:adultos. Se efectuaron 25,000 réplicas para estimar la media y los intervalos de confianza para el tamaño poblacional histórico.

Simulación de las tendencias demográficas

Con el objeto de evaluar que tan plausibles podrían ser las estimaciones de abundancia históricas corregidas, se realizó un ejercicio de simulación de crecimiento poblacional a través del modelo demográfico generalizado que la IWC usa como base para el retro-cálculo demográfico (modelo logístico discreto, ver IWC 1999, Breiwick y York 2002) simplificado:

$$P_{t+1} = P_t + r_{max} P_t (1-(P_t/K)^z) - C_t$$

Donde P_t es el tamaño de la población durante el año t; r_{max} es la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (máxima tasa neta de reproducción); K es la capacidad de carga, que se supone igual a la abundancia previa a la explotación; z es el nivel máximo de captura sustentable, es decir, el tamaño de la población en relación con la capacidad de carga; y C es la captura total en número de individuos durante el año t.

La trayectoria demográfica se calculó para el periodo 1909-2005 considerando tasas de crecimiento intrínseco poblacional por debajo y por arriba del valor teórico reportado como máximo (4% anual; ver Anónimo 1994, Barlow *et al.* 1995) y usando el valor medio del tamaño poblacional histórico generado de la simulación de Monte Carlo.

RESULTADOS

La prueba de neutralidad selectiva de Tajima resultó no significativa para el conjunto de todos los linajes en las agregaciones mexicanas de ballena azul (D= – 0.2248; p>0.05). Congruentemente, se obtuvo una distribución de frecuencias multimodal para el número de diferencias en las comparaciones pareadas entre las secuencias de todos los individuos (Fig. 14 A); patrón que sugiere que ninguno de los haplotipos ha sido selectivamente favorecido. Por otro lado, el índice de irregularidad de Harpending (I_H= 0.036; p>0.05) y la prueba de bondad de ajuste bajo la hipótesis de expansión demográfica (χ^2 = 16.224; p>0.05) resultaron no significativos, lo que sugiere que las agregaciones mexicanas de ballena azul se encuentran muy probablemente en una fase de expansión poblacional. En conjunto, estos resultados indican que los linajes que componen las agregaciones mexicanas no han pasado recientemente por un evento severo de cuello de botella y que aunque el número de linajes podría haberse mantenido estable, o bien aumentado paulatinamente, al menos no parece haber disminuido en forma drástica.

Ahora bien, de acuerdo con los resultados del capítulo anterior, las agregaciones mexicanas de ballena azul estan conformadas por dos grupos genéticamente divergentes que podrían ser reflejo de dos eventos de colonización independiente en el Pacífico Nororiental (Clado II y Clado Común; ver Fig. 4, 5, 6 y Tabla XX, Capítulo 2). Al efectuar las pruebas de neutralidad selectiva y analizar la distribución de las diferencias pareadas entre los linajes de cada clado se observaron diferencias importantes entre ellos (Tabla XXII, Fig. 14 B y C). En congruencia con las evidencias presentadas en el capítulo anterior, la distribución de las diferencias pareadas entre linajes del clado II resultó significativamente diferente a la distribución esperada bajo la hipótesis de expansión y exhibió un valor más alto, aunque no significativo, para el índice de irregularidad de Harpending.

Para el clado II se observó una mayor dispersión en el número de diferencias pareadas entre sus linajes, así como una frecuencia similar para sus linajes más divergentes y menos divergentes (Fig. 14 B). En contraste, el clado común presentó una distribución

de diferencias pareadas con menor dispersión (sesgada hacia valores ligeramente menores que los observados en el clado II) y exhibió una marcada diferencia en la frecuencia de sus linajes más divergentes con respecto a los menos divergentes (Fig. 14 C).

Por oto lado, la distribución de las clases de frecuencia para todos los haplotipos detectados en las agregaciones mexicanas presentó la característica forma de "L" de una población que no ha pasado por un evento de cuello de botella recientemente (Fig. 15 A). Sin embargo, y en congruencia con el análisis de las diferencias pareadas entre secuencias, al analizar la forma de la distribución por clases de frecuencia para cada clado resulta evidente que, a diferencia del clado común, el clado II exhibió una menor frecuencia para las clases de haplotipos poco comunes (Fig. 15 B y C). Lo anterior sugiere la posible ocurrencia de un evento de cuello de botella para el clado II.

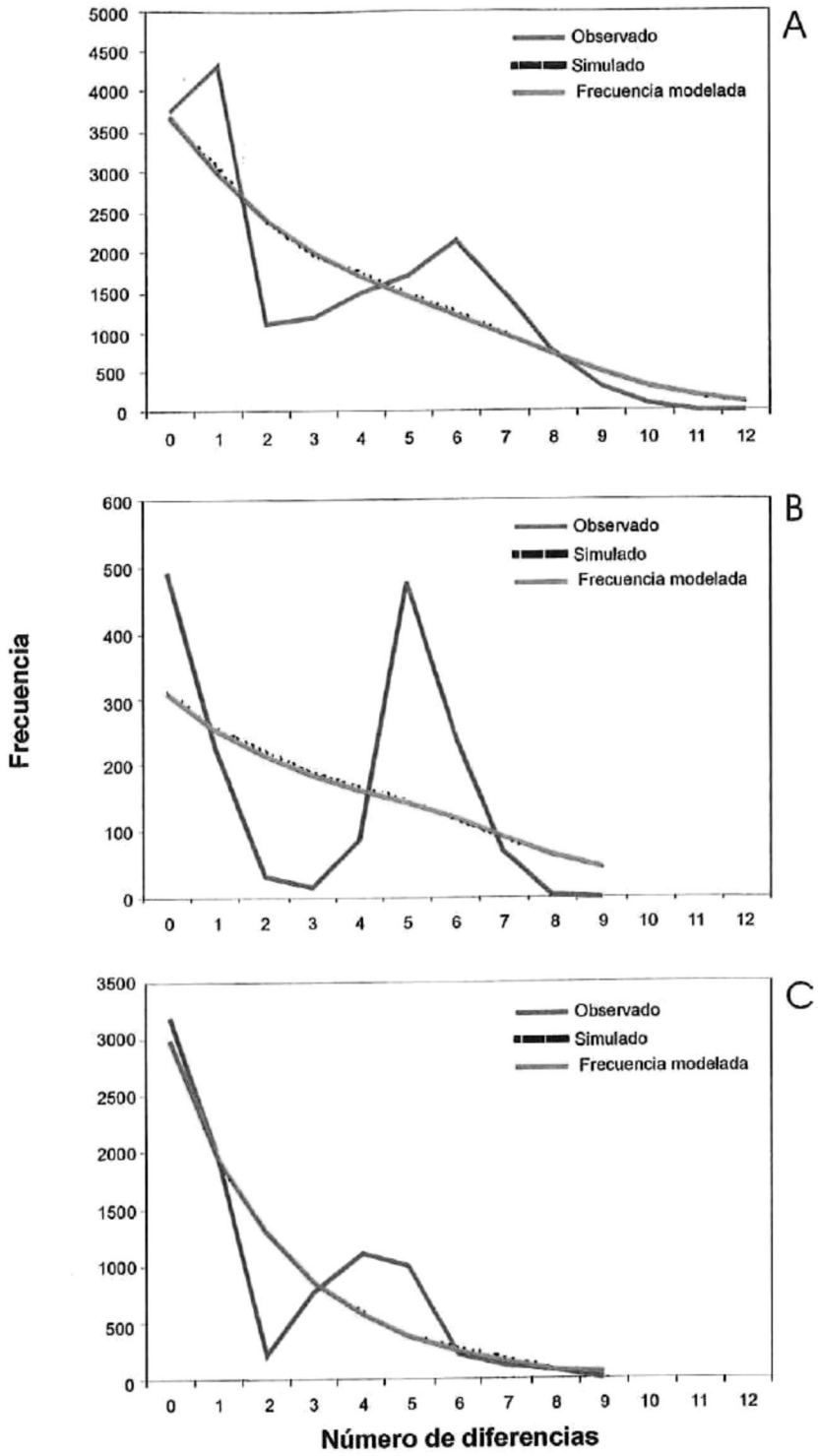


Figura 14. Distribución de frecuencia del número de diferencias en las comparaciones pareadas de los linajes maternos en las agregaciones mexicanas de ballena azul. La curva simulada se obtuvo a partir de 1000 remuestreos por bootstrap, mientras que la modelada corresponde al estimador analítico de la prueba. (A) Para todos los linajes de las agregaciones mexicanas. (B) Para los linajes correspondientes al clado II. (C) Para los linajes correspondientes al clado común. Las designaciones de los clados corresponden a la señalada en la Figura 6 y la Tabla XX.

Tabla XXII. Diversidad haplotípica (*H*), nucleotídica (π) y pruebas para los descriptores demográficos para los clados filogenéticos de las agregaciones mexicanas de ballena azul.

	Clado II'	Clado Común
Haplotipos	7	9
dH	0.702 (0.040)	0.629 (0.041)
π (d.e.)	3.426 (1.777)	2.068 (1.065)
πn (d.e.)	0.0068 (0.0039)	0.0041 (0.0025)
D Tajima (p)	1.561 (0.068)	-0.905 (0.192)
χ 2 (*p*)	0.084 (0.049)	0.025 (0.619)
***IH* (*p*)**	0.013 (0.014)	0.075 (0.192)

(d.e.) = desviación estándar
(p) = significancia estadística
IH = Índice de Harpending

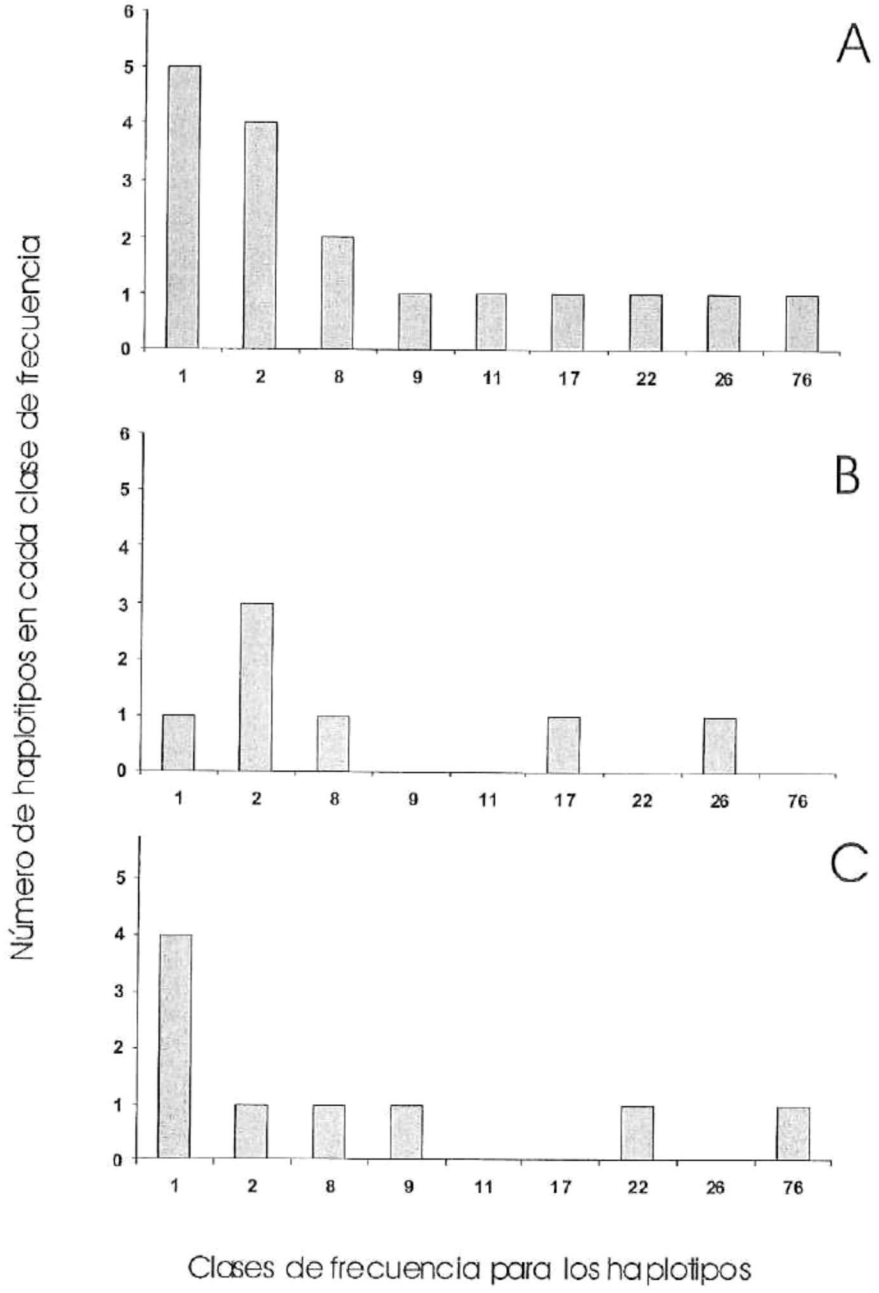


Figura 15. Distribución de haplotipos por clases de frecuencia. (A) Para todos los linajes de las agregaciones mexicanas. (B) Para los linajes correspondientes al clado II. (C) Para los linajes correspondientes al clado común. Las designaciones de los clados corresponden a la señalada en la Figura 6 y la Tabla XX.

Tiempos de divergencia

El cálculo del tiempo de divergencia se realizó de forma gráfica con base en el árbol filogenético linearizado de los linajes maternos para todas las especies de misticetos (ver Fig. 8; Capítulo 2). En la Figura 16 se presenta el mismo árbol con la correspondiente escala en distancia genética y tiempo de divergencia suponiendo una tasa de sustitución nucleotídica constante y homogénea para todos los linajes. La línea de base empleada para fijar el tiempo de divergencia en el árbol filogenético fue de 6.7 millones de años (Arnason *et al.* 2000); fecha estimada en el registro fósil para la separación de los linajes de ballena azul y ballena de aleta.

Al fijar el tiempo de divergencia sobre el nodo del clado central de balenoptéridos (ballena azul, ballena jorobada, ballena de aleta, ballena sei y ballena de Bryde; ver Fig. 16), la tasa de mutación (tasa evolutiva o de sustitución nucleotídica) calculada para el grupo de los misticetos fue de 2.35×10^{-8} sustituciones por sitio por año; valor cercano al promedio aceptado de $1.0 - 2.0 \times 10^{-8}$ para la región control del genoma mitocondrial para misticetos (ver Baker *et al.* 1993, Pesole *et al.* 1999, Roman y Palumbi 2003).

El tiempo de divergencia, estimado directamente de la topología del árbol filogenético, para todos los linajes de ballena azul fue de 790,000 años. Cabe señalar que la fecha calculada por Arnason *et al.* (2000) correspondería al ancestro común para la ballena azul y la ballena de aleta (6.7 millones de años), mientras que el tiempo de divergencia aquí inferido corresponde al ancestro común de todos los linajes de ballena azul incluidos en el análisis.

El tiempo de divergencia estimado para los linajes actuales del clado II fue de 490,744 años, mientras que para los linajes del clado común fue de 622,901 años. Este resultado parece sugerir que el clado II apareció en las agregaciones mexicanas mucho depués que el clado común. Sin embargo, es posible también que los representantes del clado común hubiesen arrivado posteriormente, pero al provenir del grupo ancestral de Antártica sus tiempos de divergencia resultaran mayores.

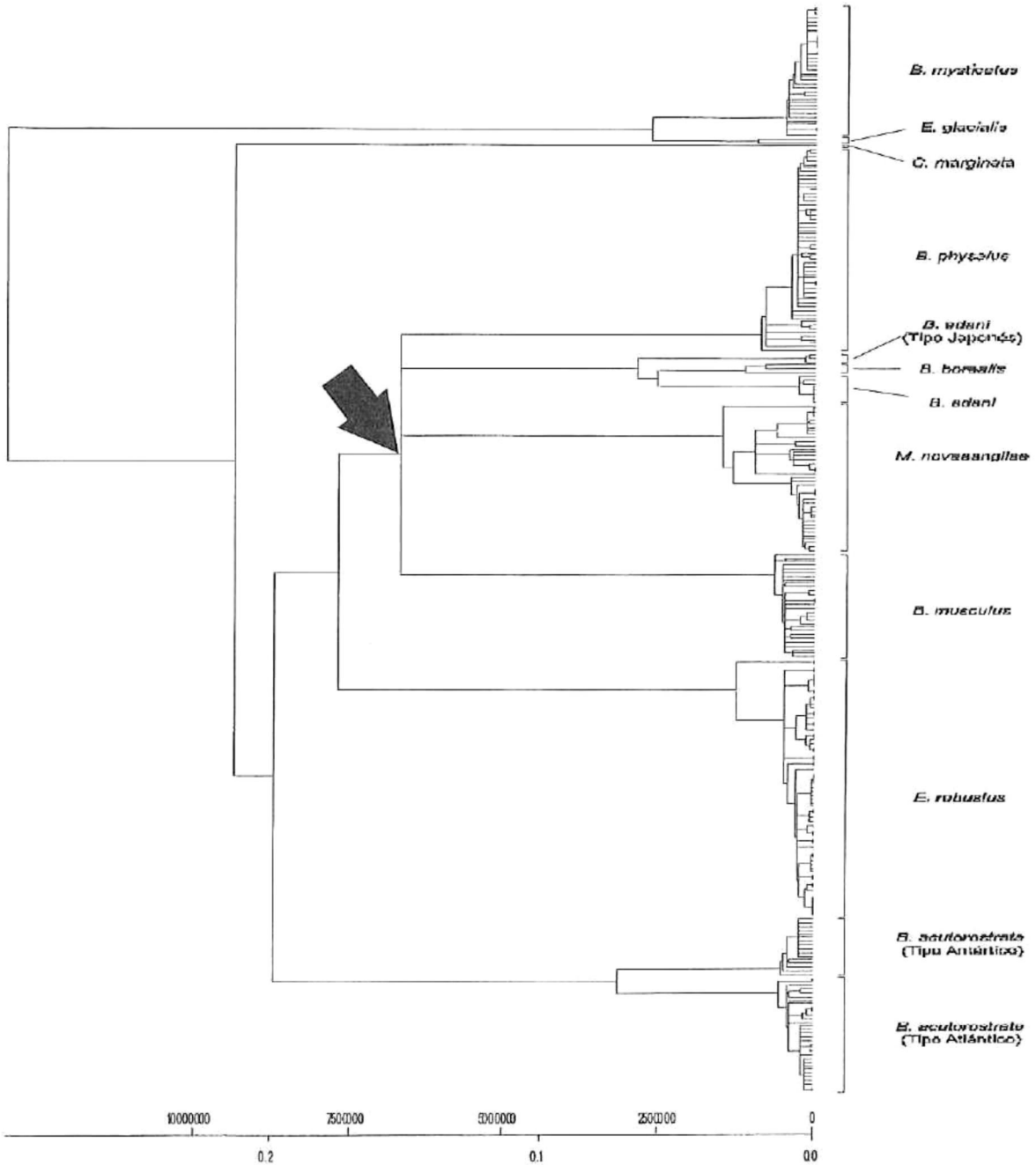


Figura 16. Reconstrucción filogenético por mínima evolución (ME) para 219 haplotipos maternos de misticetos. Árbol linearizado de consenso estricto (10,000 remuestreos por bootstrap). Los valores sobre la escala representan el tiempo de divergencia en años y los valores por debajo de la escala corresponden a la distancia genética de Tamura-Nei ($\alpha = 0.36$). La flecha negra indica en nodo en el que se fijo el tiempo de divergencia basado en el registro fósil para la separación entre ballena azul y ballena de aleta (6.7 millones de años; ver Arnason *et al.* 2000).

Cálculo del tamaño poblacional histórico

En función de las diferencias observadas entre el clado II y el clado común, la estimación del tamaño poblacional histórico se realizó no sólo considerando todos los linajes de las agregaciones mexicanas, sino también efectuando una estimación independiente para cada clado.

La tasa de sustitución nucleotídica calculada a partir del estimador de diversidad nucleotídica intraespecífica y los tiempos de divergencia obtenidos de la reconstrucción filogenética, los valores obtenidos fueron congruentes con aquellos reportados para regiones homólogas en mamíferos (ver Pesole *et al.* 1999). Así mismo, la diferencia en las tasa de sustitución nucleotídica estimada independientemente para cada clado (ver Tabla XXIII) fue congruente con la historia demográfica inferida para cada uno de ellos en el capítulo anterior (ver Fig. 5, Capítulo 2).

La Tabla XXIII detalla los valores de cada uno de los parámetros empleados en el cálculo del tamaño poblacional histórico, así como la estimación del mismo a través del modelo tradicional y con la corrección planteada en el presente trabajo. Sin duda, lo más relevante al analizar esta tabla es la magnitud de la diferencia entre los estimadores de ambas aproximaciones. El tamaño poblacional histórico estimado por el modelo tradicional resultó entre 14 y 19 veces mayor al estimado con el modelo corregido cuando se utilizó el valor de diversidad nucleotídica de las agregaciones mexicanas, y hasta 60 veces mayor al considerar estimaciones independientes para cada uno de los clados. El número histórico de ballenas azules en las agregaciones mexicanas se estimó en un total de 63,145 individuos a través del modelo tradicional y en 4,191 individuos empleando el modelo corregido. Al estimar independientemente el tamaño histórico de las agregaciones se obtuvieron valores de 183,135 y 1,949 individuos para el clado común, mientras que en el clado II el número de individuos resultó de 122,471 y 1,194 para el modelo tradicional y el modelo corregido, respectivamente (ver Tabla XXIII).

La estimación del tamaño histórico de las agregaciones de ballena azul se modificó de forma importante al considerar valores de la tasa mutacional reportados en otros estudios de misticetos para la región control mitocondrial. Sin embargo, en función del

tamaño de muestra empleado para estimar la divergencia entre los linajes al reconstruir la genealogía (ver Fig. 16, Anexo D), consideré más adecuado trabajar con la tasa de sustitución nucleotídica obtenida en el presente estudio.

La media, los intervalos de confianza al 95% y los descriptores de los parámetros empleados en la simulación Monte Carlo para ambos clados de las agregaciones mexicanas de ballena azul se detallan en la Tabla XXIV. Como puede apreciarse en dicha tabla, al introducir cierto grado de incertidumbre a la estimación el número total de ballenas azules fue de 4,812 individuos (I.C. 95%; 2,854 – 7,237); valor cercano al generado con el cálculo determinístico (4,191; ver Tabla XIII). Lo anterior indicaría que los niveles de abundancia actuales en la población del Pacífico Nororiental representan entre el 62% y el 70% del stock original.

Tabla XXIII. Parámetros empleados para la estimación del tamaño histórico con base en datos genéticos para las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental.

	Abundancia	n	θ_x	T_D	μ	m	N_H	T_G	λ	ν	θ_P	N_e (1)	N_{HA}(1)	P_S (1)	N_{MA} (1)	N_{Im}(1)	N_T (1)	N_T (2)
							Tasa de mutación calculada a partir de la reconstrucción filogenética											
Agregaciones mexicanas	2,574 - 3,413	190	0.006400	709,000	9.03E-09	500	17	20	1.81E-07	9.03E-05	0.1088	603	1,722	0.83	1,429	1,040	4,191	130,753
Clado común	199 - 794	121	0.004136	622,901	6.64E-09	500	9	20	1.33E-07	6.64E-05	0.0372	280	801	0.83	665	484	1,949	118,349
Clado II*	199 - 794	58	0.006852	490,744	1.40E-08	500	7	20	2.79E-07	1.40E-04	0.0480	172	491	0.83	407	296	1,194	92,991
							Valor inferior de la tasa de mutación promedio para la región control en mamíferos											
Agregaciones mexicanas	2,574 - 3,413	190	0.006400	709,000	1.00E-08	500	17	20	2.00E-07	1.00E-04	0.1088	544	1,554	0.83	1,290	939	3,783	121,600
Clado común	199 - 794	121	0.004136	622,901	1.00E-08	500	9	20	2.00E-07	1.00E-04	0.0372	186	532	0.83	441	321	1,294	78,584
Clado II*	199 - 794	58	0.006852	490,744	1.00E-08	500	7	20	2.00E-07	1.00E-04	0.0480	240	665	0.83	569	414	1,668	130,188
							Tasa de mutación promedio para la región control en mamíferos											
Agregaciones mexicanas	2,574 - 3,413	190	0.006400	709,000	1.50E-08	500	17	20	3.00E-07	1.50E-04	0.1088	363	1,036	0.83	860	626	2,522	81,067
Clado común	199 - 794	121	0.004136	622,901	1.50E-08	500	9	20	3.00E-07	1.50E-04	0.0372	124	355	0.83	294	214	863	52,369
Clado II*	199 - 794	58	0.006852	490,744	1.50E-08	500	7	20	3.00E-07	1.50E-04	0.0480	160	457	0.83	379	276	1,112	86,792
							Valor superior de la tasa de mutación promedio para la región control en mamíferos											
Agregaciones mexicanas	2,574 - 3,413	190	0.006400	709,000	2.00E-08	500	17	20	4.00E-07	2.00E-04	0.1088	272	777	0.83	645	469	1,891	60,800
Clado común	199 - 794	121	0.004136	622,901	2.00E-08	500	9	20	4.00E-07	2.00E-04	0.0372	93	266	0.83	221	161	647	39,292
Clado II*	199 - 794	58	0.006852	490,744	2.00E-08	500	7	20	4.00E-07	2.00E-04	0.0480	120	343	0.83	284	207	834	65,094

(1) Corresponde a la estimación empleando el modelo corregido ($\theta_P = 2N_e\nu$).
(2) Corresponde a la estimación empleando el modelo tradicional ($\theta = 2N_e\mu$).
n = número de individuos analizados.
θ_n = diversidad nucleotídica promedio entre linajes.
T_D= Tiempo de divergencia en años.
λ = tasa de sustitución por sitio por año.
m = tamaño de la secuencia, número de nucleótidos que componen el haplotipo.
N_H= Número de haplotipos.
T_G= Tiempo generacional en años.
μ = tasa de sustitución por sitio por generación
ν = tasa de sustitución por linaje.
θ_P= diversidad nucleotídica poblacional.
N_e= Tamaño efectivo histórico de la población.
N_{HA}= Número de hembras adultas
P_S =proporción de sexos (machos : hembras).
N_{MA}= Número de machos adultos.
N_{Im}= Número de individuos jóvenes o inmaduros
N_T= Tamaño histórico de la población.
* La estimación de abundancia actual para las agregaciones mexicanas se tomó de Calambokidis y Baker (2004) suponiendo que las agregaciones mexicanas representan la zona de distribución invernal de todos los individuos que migran hacia California. Por su parte, la estimación de abundancia actual para los clados se tomó de Gendron (2002) considerando exclusivamente a las agregaciones mexicanas.

Tabla XXIV. Parámetros empleados en la simulación Monte Carlo (25,000 remuestreos) para la estimación del tamaño histórico con base en datos genéticos para las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental.

Variables	Distribución parametrizada	Parámetros de la distribución
Diversidad genética (θ)	Normal	0.0064±0.0037
Tiempo de divergencia (años)	Normal	709,000±130,269
Tiempo generacional (años)	Normal	22±3
Porcentaje de adultos	Triangular	0.35±0.04
Proporción de sexos	Triangular	0.92±0.07
Porcentaje de jóvenes	Normal	0.18±0.02
Número de haplotipos	Ninguna	17
		Ne = 659 (I.C. 95%; 356 –
		N = 4,812 (I.C. 95%; 2,854 –

[a] Las distribuciones de las variables fueron parametrizadas con base en los datos de las bitácoras de captura reportados en Tomilin (1967), Brinkmann (1948), Brueggeman *et al.* (1985), Fisheries Research Board of Canada (1992) y Gregr *et al.* (2000). Los tiempos de divergencia fueron calibrados con los datos presentados por Arnason et al. (2000).

Simulación de las tendencias demográficas: Comparación de los estimadores de abundancia histórica

Como se mencionó anteriormente, al no contar con una estimación confiable de los niveles de abundancia previos a la explotación comercial, se ha especulado que el número de ballenas azules que habitaban el Pacífico Norte era de entre 5,000 y 6,000 (Rice 1974, Gambell 1976). Por su parte se ha estimado que un total de 5,761 ballenas azules fueron capturadas en dicha zona; aproximadamente 2,271 individuos para el Pacífico Nororiental (IWC 1942, Perry *et al.* 1999). Debe tomarse en cuenta que al trazar las tendencia demográfica de la población de ballena azul en el Pacífico Norte decidí emplear exclusivamente los registros de captura correspondientes al Pacífico Nororiental (ver Anexo F). Lo anterior debido a que los datos genéticos empleados en la estimación del tamaño histórico poblacional corresponden solo a las agregaciones mexicanas (suponiendo la ocurrencia de dos stock discretos en el Pacífico Norte; ver Stafford *et al.* 2001, Moore *et al.* 2002).

Debido a la discrepancia en los niveles de abundancia histórica reportados para la ballena azul, decidí considerar en la simulación de las tendencias demográficas varios escenarios. Con ello traté de representar los niveles de incertidumbre en las tasas netas anuales de crecimiento poblacional. En la Tabla XXIV se presentan los niveles de abundancia actual e histórica, así como los escenarios empleados en la reconstrucción de las tendencias demográficas.

Al considerar la información disponible para el Pacífico Nororiental (México/California), varios de los escenarios resultaron congruentes con los niveles de abundancia actual. El primero de ellos es el asociado con el estimador genético a través del modelo sin corrección (Roman y Palumbi 2003), suponiendo que se hubieran reportado solamente el 4% de las capturas y una tasa de crecimiento poblacional anual del 0%. Sin embargo, como puede apreciarse en la Tabla XXV, este último escenario implicaría que cerca de 59,000 ballenas azules debieron haber sido capturadas en el Pacífico Nororiental; razón de sobra para descartarlo. Los otros escenarios permiten inferir que aun con una falsificación de hasta el 60% de las capturas, una tasa de crecimiento poblacional del 8% anual podría explicar los niveles actuales de abundancia. Finalmente, si los registros de captura son precisos y la estimación del tamaño histórico de las agregaciones puede validarse, una tasa neta de crecimiento poblacional ligeramente menor al 2% arrojaría una abundancia actual de poco más de 4,000 ballenas azules.

Tabla XXV. Tendencias demográficas del stock de ballena azul del Pacífico Nororiental con base en la estimación genética del tamaño histórico poblacional y diferentes tasas de crecimiento neto anual de la población (r_{max}).

Modelo genético	Abundancia actual [a]	Stock original en 1909 [b]	Capturas [c]	r_{max} [d]	Población en 1965	Población en 2005
Roman y Palumbi (2003)	2,574 – 3,413	60,800	59,000	0%	3,158 (5%)	3,158
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	2,271	0%	1,973 (47%)	1,973
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	2,271	2%	3,172 (75%)	3,849
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	2,271	4%	3,681 (88%)	4,160
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	2,271	8%	3,927 (94%)	4,190
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	4,542	0%	Extinta (0%)	Extinta
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	4,542	2%	1,131 (27%)	2,320
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	4,542	4%	2,775 (66%)	4,076
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	4,542	8%	3,632 (86%)	4,188
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	6,813	0%	Extinta (0%)	Extinta
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	6,813	2%	Extinta (0%)	Extinta
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	6,813	4%	Extinta (0%)	Extinta
Este trabajo	2,574 – 3,413	4,190	6,813	8%	3,063 (0%)	4,186

[a] La estimación de abundancia actual corresponde a los intervalos de confianza reportados por Calambokidis y Barlow (2003).
[b] Tamaño histórico poblacional estimado a partir de los niveles de diversidad nucleotídica con y el modelo tradicional (se uso la estimación más baja de la Tabla XXIII) y el modelo corregido (se uso la estimación de la Tabla XXIII).
[c] Las capturas reportadas corresponden para la zona del Pacífico Nororiental indican 2,271 individuos aproximadamente (Perry *et al.* 1999). Los otros valores corresponden a 26 veces la captura (59,000), 2 veces la captura (4,542) y tres veces la captura (6,813). Se usaron estos números para representar la incertidumbre en la confiabilidad de las bitácoras de captura (ver Yablokov 1994).
[d] Los parámetros demográficos empleados intentan representar valores de la tasa neta máxima de incremento poblacional del 4% para cetáceos (ver Anónimo 1994, Barlow *et al.* 1995).

Estimación del tamaño poblacional histórico en otras poblaciones de misticetos: Evaluación del modelo corregido

Como se sugiere en el capítulo anterior, el muestreo realizado en este trabajo podría estar sesgado hacia ciertos componentes del stock de ballenas azules del Pacífico Nororiental. Por esta razón, se calculó el tamaño histórico poblacional en un conjunto de poblaciones de varias especies de misticetos para las que existen datos sólidos sobre sus niveles de abundancia y diversidad genética (Tabla XXVI). En primera instancia resaltó el hecho de que, el modelo corregido generó valores mucho más cercanos a la estimación de abundancia previa a las capturas en comparación con el modelo tradicional.

Los niveles de diversidad genética parecen estar en estrecha relación con el tamaño de las poblaciones, tanto el histórico como el actual. Lo anterior podría ser reflejo de que la captura comercial, a pesar de haber sido intensa, disminuyó considerablemente el número de individuos en las poblaciones pero no impactó significativamente los niveles de diversidad genética, al menos para las poblaciones y las especies aquí analizadas. Es importante destacar también que los niveles de diversidad genética más bajos estuvieron asociados con poblaciones que pueden considerarse relativamente pequeñas y aisladas (p.e. ballena de aleta del Golfo de California y del Mar Mediterráneo). Para el caso de estas dos últimas poblaciones, la baja diversidad genética podría estar reflejando una estabilidad poblacional producto de la capacidad de carga del ecosistema ya que no existe evidencia reciente de algun cuello de botella asociado con la captura comercial o algún evento oceanográfico de gran escala.

Tabla XXVI. Estimación del tamaño histórico en algunas poblaciones de misticetos

Especie/Población[a]	Abundancia[b]		Muestreo[c]		Parámetros del estimador para *N(1)*							Estimador del tamaño poblacional[f]	
	Histórica	Actual	n	% Población	$\theta\pi$	*T*	*m*	*H*	*TG*	$N_e(1)$[d]	*Ps*[e]	Modelo corregido (1)	Modelo tradicional (2)
*Bmy (BCB)****	15,000	6,900 - 9,200	98	1.1 - 1.4	0.0163	0.470	453	68	35	1008	1.5	8,779	108,180
Mn (NP)	10,000 - 15,000	5540 - 8000	95	1.2 - 1.7	0.0140	1.330	283	7	15	1097	1.3	9,584	236,444
Mn (NA)	20,000	6500 - 10600	90	0.8 - 1.4	0.0200	1.330	283	15	15	2350	1.3	20,537	337,778
Bp (NA)	40,000	27,000 - 82,000	237	0.3 - 0.9	0.0113	0.815	288	48	18	3774	1.3	32,985	345,800
*Bp (Med)***	-	2,130 - 6,027	72	1.2 - 3.3	0.0053	0.815	288	7	18	550	1.1	4,434	74,593
*Bp (GC)***	-	250 - 380	75	19.7 - 30.0	0.0007	0.125	288	3	18	36	1.3	317	9,852
Bp (CC)	-	988 - 1,483	12	0.6 - 0.8	0.0058	0.224	288	5	18	108	1.3	943	81,630
*Er (PNO)****	20,000	21,900 - 32,400	120	0.4 - 0.5	0.0170	1.240	523	33	15	2608	1.0	19,821	239,259
*Er (PNOcc)**	-	100 - 200	45	22.5 - 45.0	0.0160	1.240	523	10	15	790	1.5	7,506	225,185

[a] Las especies y poblaciones corresponden a aquellas detalladas en la Tabla XXI en el capítulo 2.
[b] Las estimaciones de abundancia históricas provienen de diversas fuentes aunque no existe información confiable sobre los niveles de abundancia previos a las capturas comerciales (ver Gambell 1976, Yochem y Leatherwood 1985, Perry *et al.* 1999).
[c] Los tamaños de muestra corresponden a las reportadas por los autores citados en la Tabla XXI (capítulo 2) como fuentes de los valores de diversidad genética.
[d] Tamaño efectivo de la población empleado en la estimación del tamaño poblacional histórico para el modelo corregido.
[e] Proporción de sexos expresada como la razón machos/hembras obtenido de las fuentes citadas en la Tabla XXI (capítulo 2).
[f] (1) Estimación con el modelo corregido; (2) Estimación con el modelo tradicional empleando como tasa de sustitución 1.5×10^{-8} sitios año^{-1} y una proporción de sexos de 1:1
* Poblaciones consideradas como severamente disminuidas.
** Poblaciones consideradas residentes y aisladas (cerradas y denso-dependientes).
*** Poblaciones consideradas como recuperadas y cercanas a los niveles de capacidad de carga máximos.

DISCUSIÓN

Consideraciones metodológicas

En este trabajo se propone un modelo corregido para la estimación del tamaño histórico de las poblaciones con base en los niveles de diversidad genética neutral. La innovación a este modelo con respecto al modelo tradicional es que considera información referente a la historia demográfica de las poblaciones. Al usar los tiempos de divergencia intraespecíficos (o intrapoblacionales cuando existe una fuerte estructura filogeográfica) en el cálculo de las tasas de sustitución o mutación, el modelo ajusta los tiempos de coalescencia al ancestro común de los miembros de una especie o una población, y no a los tiempos de coalescencia entre diferentes especies. Las tasas de sustitución nucleotídica están en estrecha asociación con el metabolismo, los tiempos generacionales y la demografía histórica de cada especie y, por lo tanto, parece más adecuado emplear tasas intraespecíficas basadas en la reconstrucción filogenética de los haplotipos que conforman las poblaciones. Cada especie y cada una de sus poblaciones se establecieron en un tiempo y espacio particulares, por lo que en función del número y la variedad de linajes presentes, cada población acumulará variación genética neutral a diferentes tasas.

En la Figura 17 se esquematiza la forma en la que el nuevo modelo para estimar el tamaño efectivo histórico de las poblaciones introduce dos elementos críticos que reflejan la historia demográfica: 1) la diferencia entre la tasa de mutación intraespecífica con respecto a la tasa de mutación interespecífica del marcador genético, y 2) el número de haplotipos contenidos en cada población. En términos generales, los índices de diversidad genética basados en el número de diferencias pareadas o los sitios de segregación minimizan la filogenia de los linajes (ver Felsenstein 1992). Al ponderar las diferencias entre linajes por las frecuencias relativas de los mismos, se estan despreciando a aquellos haplotipos poco comunes que son, sin duda, reflejo de la historia demográfica y por ende del tamaño de la población.

Una población grande acumulará variación genética mucho más rápido que una población pequeña y fluctuante, por lo que: aunque la tasa de mutación promedio del

marcador se mantenga constante, la probabilidad de que ocurra cambios en las secuencia dependerá del número de fuentes de variación, es decir, del número de individuos "disponibles" en la población, independientemente del linaje al que pertenezca.

Ahora bien, para el cálculo del tamaño histórico poblacional, el modelo tradicional considera los niveles promedio de diversidad genética entre los linajes *(θ)*. Sin embargo, al usar θ el modelo tradicional desprecia el número de linajes a partir de los que se estima el promedio. Si bien es cierto que para obtener θ se ponderan las diferencias en las frecuencias y el número de los haplotipos presentes en una población, lo que se está estimando es simplemente la proporción de la diversidad genética poblacional explicada por cada haplotipo o linaje. El modelo aquí propuesto considera la suma de todas esas proporciones en el cálculo del tamaño efectivo de la población tratando de reflejar el potencial evolutivo de la población y no sólo el de un haplotipo.

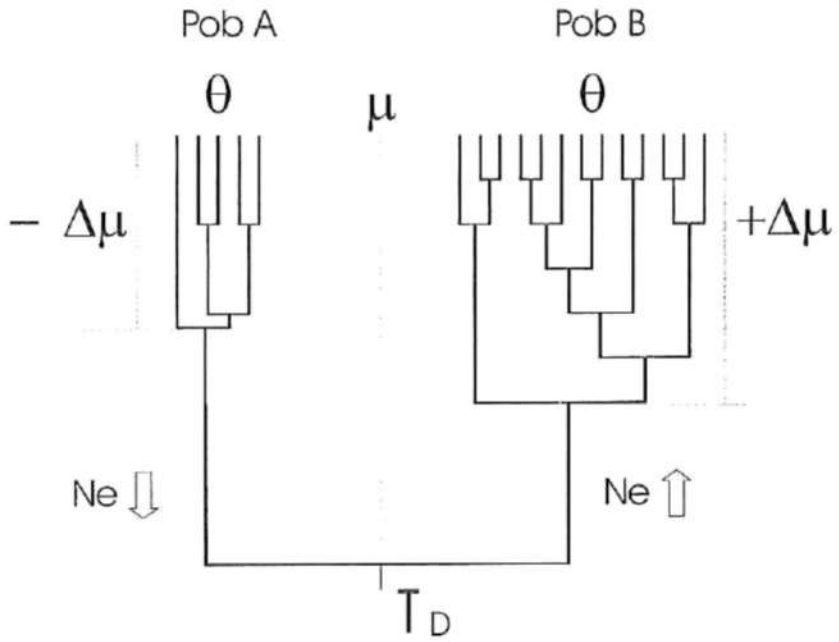


Figura 17. Innovaciones del modelo para estimar el tamaño efectivo histórico. Las diferencias en la tasa de mutación y el número de haplotipos contenidos en las poblaciones hipotéticas Pob A y Pob B. El número de individuos reproductivamente activos que explicarían tales diferencias sería claramente diferente, aun cuando los valores de diversidad genética promedio sean similares.

Como puede apreciarse en las Tablas XXIII y XXVI la estimación del tamaño poblacional histórico a través de las correcciones arriba mencionadas generó valores mucho más congruentes que el modelo tradicional. Sin embargo, resultó particularmente relevante el caso de poblaciones que efectivamente pueden considerarse cerradas o semi-cerradas (p.e. ballena de aleta del Golfo de California; ver Enríquez 1996, Bérubé *et al.* 2002). El modelo corregido se ajustó perfectamente a la estimación de abundancia actual para esa población (250 - 380 individuos), indicando que el número de linajes no ha cambiado significativamente desde que la población se fundó. Considerando que no existe evidencia de que el Golfo de California haya sido una zona explotada por la flota comercial ballenera, lo anterior indicaría una estabilidad demográfica que podría ser explicada en términos denso-dependientes en función de la capacidad de carga del sistema. En cambio, el modelo tradicional sugiere que podrían haber existido más de 9,000 ballenas de aleta en el Golfo de California. A pesar de los altos niveles de productividad primaria y secundaria que pudieran presentarse en el Golfo, resulta difícil de imaginar tal número de individuos conformando una población residente en un área relativamente pequeña.

En función de los retro-cálculos demográficos basados en los datos de captura, se ha estimado que el número de ballenas jorobadas y ballenas de aleta en el Atlántico Norte debió haber sido aproximadamente de 20,000 y 40,000 individuos, respectivamente. Por su parte, Roman y Palumbi (2003) estimaron, con base en datos genéticos, cerca de 240,000 ballenas jorobadas y 360,000 ballenas de aleta. En contraste, el presente modelo al considerar la historia demográfica de las poblaciones indicó que cerca de 18,000 jorobadas y 32,000 ballenas de aleta. Aun más, al considerar que la población de ballena de aleta del Atlántico Norte se encuentra estructurada en al menos dos subpoblaciones (ver Bérubé *et al.* 1998), el total de individuos se incrementó a 38,000. Sin embargo, aunque el número de individuos estimado a través del modelo corregido aparentemente ofrece una mejor aproximación al tamaño histórico de las poblaciones de misticetos y reconcilia bastante bien los cálculos demográficos con los estimadores genéticos, es importante considerar las limitaciones del mismo.

El cálculo de los tiempos de divergencia, de las tasas de sustitución nucleotídica y de la proporción de los componentes poblacionales por clases de edad y sexo están fundamentados en información escasa y con elevados niveles de incertidumbre. La incertidumbre producto de las tasas de mutación podría ser solventada al emplear otros genes y evaluar los resultados generados por la nueva aproximación para estimar el tamaño histórico poblacional. Por su parte, la información referente a la estructura de edades y otros parámetros reproductivos de los misticetos requerirá de estudios observacionales a largo plazo. Alternativamente podría usarse como especie modelo a la ballena Minke, especie sujeta a captura científica y para la que debe de contarse con suficiente información para reducir la incertidumbre en muchos de los parámentros indispensables para el cálculo del tamaño histórico poblacional.

Otra limitante para el modelo propuesto, al igual que para los otros modelos demográficos o genéticos, resulta de la dificultad para establecer los límites de las poblaciones. Tanto el modelo genético tradicional como el sugerido en el presente trabajo suponen que en la población, los efectos de la inmigración y la dispersión son mínimos y por lo tanto pueden ser despreciados (población cerrada). El establecer el límite de las poblaciones en especies con capacidades elevadas de movilidad y en las que aparentemente han ocurrido varios eventos de contacto secundario resulta particularmente difícil. Aunque el modelo aquí sugerido seguramente podría ser implementado con los novedosos métodos que permiten la estimación simultánea de la diversidad genética y de las tasas de migración en múltiples poblaciones (ver Beerli y Felsenstein 2001, Roman y Palumbi 2003), considero que no existe sustituto para los datos generados a través de los programas de seguimiento por fotoidentificación y censado. Los datos genéticos generados con base en marcadores neutrales proporcionan información valiosa, pero irremediablemente limitada si no se cuenta con un cuerpo sólido de datos que reflejen la distribución y los movimientos actuales de los individuos que portan esos marcadores. Como se mencionó anteriormente, el hecho de que históricamente existiera intercambio de linajes entre distintas poblaciones no implica que dichas conexiones se mantengan hoy en día.

La mayor limitante al modelo propuesto es sin duda la representatividad de la muestra genética. Un tamaño de muestra limitado fallaría en la detección del número real de haplotipos o linajes que conforman la población. Factores de corrección tales como la tasa de encuentro de haplotipos nuevos con respecto al tamaño de muestra podrían sin embargo aportar información sobre las deficiencias de cobertura del muestreo. Lamentablemente, el modelo no podría aportar información confiable en aquellas poblaciones en las que el efecto de las capturas haya tenido un severo impacto en la diversidad genética. Un claro ejemplo es la población de ballena azul en Antártica, para la que se estima que la población fue reducida de 205,000 individuos a tan sólo 600 (ver Perry *et al.* 1999).

Aunque el modelo aquí presentado arrojó valores muy cercanos a las estimaciones demográficas del tamaño histórico de las poblaciones mejor estudiadas a la fecha, es importante reconocer las implicaciones que esto conlleva. De acuerdo con el número estimado de individuos a través del nuevo modelo, varias de las poblaciones analizadas se encuentran por arriba del 60% de su tamaño original. Esto indicaría que, bajo las presmisas del primer plan de manejo sustentable propuesto por la Comisión Ballenera Internacional (ver Holt y Young 1991), algunas de estas poblaciones podrían sopotar capturas moderadas. Sin embargo, para llegar a considerar la reapertura de la caza comercial debe tomarse en cuenta que las capturas tendrían que ser reguladas cuidadosamente ya que, con la avanzada tecnología de navegación con la se cuenta hoy en día, sin duda los stocks podrían ser arrasados en tan solo algunos años.

Historia demográfica de las agregaciones mexicanas de ballena azul

En el capítulo anterior se presentaron algunas evidencias que sugieren que las agregaciones mexicanas de ballena azul se encuentran conformadas por dos grupos de linajes, entre los que existe un elevado índice de diferenciación genética. A estas evidencias se suman las generadas en el presente capítulo a través de las pruebas de neutralidad selectiva, las distribuciones de diferencias pareadas y la distribución por clases de frecuencia de los linajes.

Los resultados indican que el caldo II podría tener un carácter ancestral y que exhibe huellas de una historia demográfica fluctuante. La posible ocurrencia de un evento de cuello de botella en dicho clado es congruente con la menor abundancia y con la baja frecuencia de haplotipos poco comunes en los individuos de este clado. Por el contrario, la historia demográfica del clado común se ajustó mejor a la de una población en expansión. Probablemente esta expansión demográfica podría explicar por sí misma la incorporación de linajes de este clado hacia las agregaciones mexicanas una vez que los linajes del clado II ya estaban establecidos en el Pacífico Nororiental.

Si efectivamente el Golfo de California es utilizado por la especie como un área en la que se realizan actividades relacionadas no solo con la crianza, sino también con el apareamiento, al no existir evidencia de una estructura espacial o temporal de sus linajes durante su estancia en las aguas adyacentes a la Península de Baja California, entonces, a pesar de las diferencias en la historia demográfica de ambos clados, podría considerarse que en la actualidad estos operan como una unidad poblacional.

El tamaño histórico de las agregaciones mexicanas de ballena azul, estimado a través del modelo corregido para datos genéticos, resultó completamente congruente con la proporción de individuos en cada clado (ver Tabla XII y Tabla XXIII). Aunque no se encontró evidencia de que el muestreo pudiera estar sesgado a un grupo particular de individuos dentro del área de estudio (ver capítulo 1) o de que el tamaño de muestra fuera poco representativa para las agregaciones mexicanas (ver Fig. 9), en el capitulo anterior se discutió la posibilidad de que el muestreo pudiera estar excluyendo al componente poblacional que sigue rutas de migración más oceánicas. De ser así, la estimación del tamaño histórico estaría representando sólo a aquellos individuos asociados a la región costera de la Península de Baja California. Por el contrario, si no existe tal componente oceánico, la estimación representaría al total de la población que se mueve desde las agregaciones mexicanas, donde ocurren entre invierno y primavera, hasta las costas de California donde la mayoría de las ballenas azules permanecen durante verano y otoño.

De acuerdo con la estimación del tamaño histórico poblacional y a la simulación de las tendencias demográficas (ver Tabla XXIII y XXV), aun considerando capturas comerciales mayores a las reportadas, el remanente poblacional podría haberse recuperado hasta alcanzar los niveles de abundancia actuales (ver Calambokidis y Barlow 2004). Este escenario implicaría sin embargo tasas netas de incremento poblacional anual superiores al 4%. Una tasa neta de incremento poblacional anual de tal magnitud parecería poco probable con base en algunos modelos teóricos de la biología reproductiva de los cetáceos (Anónimo 1994, Barlow *et al.* 1995).

Particularmente para el caso de las agregaciones mexicanas de ballena azul en el Pacífico Nororiental, Gendron (2002) reporta tasas de reproducción de hasta 19% y 21% anual para el Golfo de California y la costa occidental de la Península de Baja California, respectivamente. Valores similares a los mencionados han sido reportados en esta y otras especies de misticetos (ver Brueggeman *et al.* 1985, Steiger y Calambokidis 2000). Debe considerarse sin embargo, que estas tasas están calculadas como la razón entre el número de hembras fotoidentificadas en compañía de una cría y el total de hembras fotoidentificadas, y no entre el total de individuos fotoidentificados. Esta última autora señala además, que tasas tan altas como las que ella reporta podrían estar sesgadas debido a las marcadas preferencias de las hembras por las aguas costeras del Golfo y la costa occidental.

Con base en los registros de captura comercial de las ballenas azules en el Pacífico Nororiental puede inferirse que las hembras adultas representaron aproximadamente el 30% del total de las capturas. A su vez, en promedio, cerca del 30% del total de hembras adultas capturadas se encontraban preñadas (ver revisión por Brueggeman *et al.* 1985) Tales números sugieren tasas de incremento neto poblacional cercanas al 12%; valor tres veces mayor al máximo teórico mencionado anteriormente. Debe tomarse en cuenta, sin embargo, que las operaciones de captura comercial fueron altamente selectivas (Holt y Young 1991), por lo que muy probablemente la proporción de individuos adultos pudiera estar siendo sobrestimada, al igual que las tasas de reproducción

Si bien se ha considerado al Golfo de California como la única zona invernal de crianza, y muy probablemente de importancia para la reproducción de esta especie (Gendron 2002), el número de individuos ahí presentes representa menos del 30% del total estimado para las agregaciones de verano en California y las aguas oceánicas frente a la Península de Baja California (ver Gendron 2002, Calambokidis y Barlow 2004). Entre 1993 y 1999 Gendron (2002) reporta 68 hembras sexualmente maduras (observadas en compañía de una cría al menos en un año) en las agregaciones mexicanas, lo que se traduciría en un promedio de cerca de 10 crías por año. La tendencia al incremento en la abundancia de ballenas azules observado en aguas de California entre 1979 y 1996 (de 704 a 2,994 individuos; ver Barlow 1994, Calambokidis y Barlow 2004) no podría ser explicado por una tasa de incremento neto poblacional menor al 5% anual (aproximadamente ente 50 y 70 crías por año).

Ante tal panorama resulta obvio que deben existir otras zonas agregación invernal, importantes para la crianza, que aún no han sido detectadas. Aunque existe una clara asociación entre las agregaciones de ballena azul del Pacífico Oriental Tropical, particularmente las de la zona del Domo de Costa Rica, con aquellas de California y la costa occidental de la Península de Baja California (ver Chandler *et al.* 1999, Mate *et al.* 1999, Stafford *et al.* 2001), un número importante de ballenas azules permanecen durante todo el año en aguas tropicales (ver Reilly y Thayer 1990, Stafford *et al.* 1999).

Wade y Gerrodete (1993) estimaron que 1,400 individuos ocurren en aguas del Pacífico Oriental Tropical durante el verano y el otoño; periodo de mayor abundancia en las agregaciones de California. Sin embargo, a pesar de que Chandler *et al.* (1999) observaron durante el verano, en aguas de California, algunos individuos previamente identificados en el Domo de Costa Rica durante invierno y primavera, no se han encontrado recapturas para las ballenas azules fotoidentificadas en el Pacífico Oriental Tropical durante el verano (ver Calambokidis y Barlow 2004). Si parte importante de las agregaciones del Pacífico Oriental Tropical no migran hacia California en el verano, y si la presencia de madres con cría en esas zonas no es tan frecuente, resulta entonces poco probable que el movimiento y el reclutamiento de individuos desde esta zona pudiera explicar el incremento en abundancia para las agregaciones de California.

Existe la posibilidad de que el aparente incremento en la abundancia sea más bien producto de un cambio en la distribución de otros componentes poblacionales del Pacífico Nororiental, lo que se refleja en un uso más intenso de las costas de California por parte de las ballenas azules durante los últimos años. Los movimientos y la abundancia de esta especie esta estrechamente asociada con la abundancia de su alimento y existe suficiente evidencia de que ciertas zonas del Pacífico Oriental, frecuentadas histórica y actualmente por las ballenas azules (ver Rice 1966, Berzin 1978, Tønnessen y Johnsen 1982, Brueggeman *et al.* 1985, Sears 1987, Fiedler *et al.* 1998, Reilly y Thayer 1990, Palacios 1999, Croll *et al.* 2000, Gendron 2002, Fiedler 2002), están caracterizadas por altos niveles de productividad primaria (p.e. Golfo de Alaska y las aguas al sur de las Islas Aleutianas, costa de California y la costa occidental de la Península de Baja California, Domo de Costa Rica, Islas Galápagos y las costas de Perú).

La mayoría de las zonas arriba mencionadas han permanecido relativamente estables desde que aparecieron durante la transición Plioceno-Pleistoceno (ver Marlow *et al.* 2000, Philander y Fedorov 2003). Una clara excepción es la zona del Golfo de Alaska y el sur de las Islas Aleutianas debido a sus fluctuaciones históricas asociadas con el avance y el retroceso de los hielos durante los periodos glaciales del Pleistoceno, así como a los cambios en la ubicación del centro de baja presión atmosférica de las Aleutianas conocidos como la Oscilación Decadal del Pacífico (PDO; Pacific Decadal Oscillation; Trenberth y Hurrell 1994). Los ecosistemas marinos de la región más norteña del Pacífico Oriental están sujetos a severas fluctuaciones asociadas con los cambios de fase de la PDO (Miller *et al.* 1994; Trenberth y Hurrell 1994; Minobe 1997, 1999). Aunque los efectos de la PDO pueden compararse con los de la Oscilación Sureña El Niño (ENSO), este último se genera en el ecuador y se propaga hacia el norte persistiendo entre 6 y 18 meses. Por su parte, la PDO se origina en el norte y se propaga hacia el sur persistiendo por periodos de hasta 20 y 30 años (ver Mantua 1999).

Durante la fase cálida de la PDO, se ha evidenciado que la productividad primaria se inhibe en las zonas costeras del noroeste de Norteamérica (Golfo de Alaska, British Columbia, Vancouver, Washington y Oregon), incrementándose en la porción más

norteña del Pacífico Occidental (sur de las Islas Aleutianas, Kamchatka, Japón); el patrón inverso ocurre durante la fase fría de la PDO. Las fases frías de la PDO prevalecieron en los periodos de 1890-1924 y 1947-1977, mientras que las fases cálidas para 1925-1946 y 1978-1999 (Bond y Harrison 2000). El impacto negativo de la fase cálida de la PDO sobre la abundancia de peces, aves y pinnípedos, ha sido reportado por diversos autores para la porción más norteña del Pacífico Oriental (p.e. Hare y Francis 1995; Springer *et al.* 1986; Mantua *et al.* 1997; Francis *et al.* 1998, Springer 1998, Hare *et al.* 1999).

De acuerdo con las tendencias demográficas basadas en el estimador del tamaño histórico de las agregaciones mexicanas de ballena azul, el número de individuos en el Pacífico Nororiental nunca fue menor a 3,000 (ver Anexo F). El incremento en la abundancia de ballenas azules en aguas de California durante las últimas dos décadas podría ser explicado alternativamente por la periodicidad y persistencia de la PDO. Entre 1979-1980 y 1986-1990 Barlow (1994) reportó 704 y 1,872 individuos, respectivamente. Posteriormente, para 1991, Barlow (1995) estimó cerca de 2,250 individuos. La estimación más reciente para las agregaciones de California fue de 1,982 individuos para el periodo entre 1993 y 1997 (Calambokidis y Barlow 2004). De estas estimaciones se desprende una clara tendencia de incremento poblacional que sugiere que el número de ballenas se triplicó en menos de 20 años.

Larkman y Veit (1998) discuten que no encuentran evidencia de que las agregaciones de ballena azul en las costas de California incrementaran sus números entre 1987-1995 y sin embargo, su hallazgo podría explicarse al hipotetizar que el cambio en la distribución de la especie debió ocurrir a finales de los 70's, promovido por el efecto de la PDO sobre las zonas de alimentación en la porción norteña de la distribución de las ballenas azules en el Pacífico Oriental (p.e. Golfo de Alaska y sur de las islas Aleutianas). Una vez incorporados esos individuos a las agregaciones de California, el tamaño y el patrón de distribución de las mismas parecen haberse mantenido relativamente constantes (ver Calambokidis y Barlow 2004), quizá en respuesta a la prolongada permanencia de la fase cálida de la PDO.

Esta explicación, permitiría descartar la ocurrencia de tasas netas de incremento poblacional por arriba del 4% anual y estaría sustentada por el hecho de que durante las últimas prospecciones en aguas de Alaska y las islas Aleutianas (Forney *et al.* 1995b), así como para las costas de Washington y Oregon (ver revisión por Calambokidis y Barlow 2004), no se han observado ballenas azules.

Se ha reportado que las detecciones acústicas de ballenas azules en el noreste y el noroeste del Pacífico exhiben un patrón estacional consistente (Watkins *et al.* 2000) y que la marcada diferencia en el tipo de vocalización entre ambas regiones sugiere la ocurrencia de poblaciones separadas (Stafford *et al.* 2001). Sin embargo, recientemente se han detectado vocalizaciones características de las agregaciones del Pacífico Noroccidental en el Golfo de Alaska, lo que ha planteado la posibilidad de que la separación entre estas regiones no sea completa (Stafford 2003).

Durante 1996-2000 la distribución de ballenas azules del stock del Pacífico Noroccidental, inferida a través de localización bioacústica indicó que un número considerable pero desconocido de individuos se concentraron en la porción sudoccidental de las Islas Aleutianas y el sur de la Península de Kamchatka (Moore *et al.* 2002). De acuerdo con Moore y sus colaboradores (*op cit.*), durante el periodo en el que realizaron su estudio, el número de detecciones asociadas con individuos del grupo del Pacífico Noroccidental superó hasta por 2 o 3 veces las de otras regiones del Pacífico Norte. Sin embargo, por el tipo y la persistencia de las vocalizaciones detectadas en dicha zona, puede inferirse que los individuos no corresponderían a los de las agregaciones del Pacífico Nororiental (ver Watkins *et al.* 2000, Stafford *et al.* 2001).

No obstabte, existen recientes y limitadas evidencias que indican que que las ballenas azules que históricamente ocurrían en el Golfo de Alaska podrían haberse desplazado hacia la porción noroeste del Pacífico. De acuerdo con lo anterior, y aun en congruencia con la hipótesis de un cambio en la distribución en las agregaciones del Pacífico Nororiental, la hipótesis plantearía entonces la posibilidad de que el llamado stock del Pacífico Nororiental se extienda no sólo tan al sur como Perú y las costas Norte de Chile

(ver Conway *et al.* 2003), sino hasta el Golfo de Alaska hacia el norte (ver Stafford *et al.* 2001); al menos durante las fases frías de la PDO.

Aunque aparentemente esta hipótesis podría explicar el incremento en la abundancia en aguas de California durante las últimas dos décadas, quedarían aún aspectos importantes por reconciliar:

(1) Si efectivamente se han incorporado a las agregaciones de California otros componentes poblacionales, diferentes a los que migran hacia el Golfo de California y el Domo de Costa Rica durante el invierno, es necesario establecer la identidad genética de dichos componentes y sus destinos migratorios. Sólo delimitando la extensión de las agregaciones y sus niveles de divergencia genética se podrá obtener una estimación confiable del tamaño histórico de las mismas y evaluar sus niveles de recuperación.

(2) Las diferencias en las proporciones morfométricas de las ballenas azules de las agregaciones de California y del Domo de Costa Rica (Gilpatrick *et al.* 1995, 1999) con respecto aquellas de las agregaciones mexicanas (Ortega-Ortíz 2004), podrían ser explicadas considerando las evidencias de que las agregaciones mexicanas representan solamente parte de los individuos presentes en las agregaciones de California. Si en verdad existen estas diferencias morfológicas, muy probablemente cada grupo ocupe distintos destinos migratorios invernales, lo que estaría favoreciendo la segregación de los componentes reproductivos y por ende las diferencias morfométricas. El análisis genético de las agregaciones de California es crítico también para resolver esta interrogante.

(3) Las evidencias genéticas que aporta el trabajo de Conway *et al.* (2003) sugieren que las agregaciones de Pacífico Nororiental conforman un stock continuo que podría abarcar hasta las costas norte de Chile. La identidad de esas agregaciones debe ser analizada para poder establecer si los niveles de divergencia entre ellas justifican sus categorías de subespecie

del Hemisferio Norte *Balaenoptera musculus musculus* y de subespecie pigmea *Balaenoptera musculus brevicauda*, o si bien como lo sugieren Conway *et al.* (*op cit.*) las agregaciones del Pacífico Oriental conforman un grupo evolutivamente divergente, independiente de las otras agregaciones de ballena azul en el Pacífico.

SUMARIO Y CONCLUSIONES GENERALES

Buscando integrar y resaltar la información más relevante generada en este trabajo, se concluye de forma general que a diferencia de lo que se ha observado en otras especies, la ballena azul descama casi exclusivamente láminas de queratina en las que es poco frecuente encontrar células del tejido subyacente. Por lo tanto, la cantidad y la calidad del DNA obtenido de este tipo de muestras no resultan siempre suficientes para el análisis de marcadores genéticos.

Es importante considerar que aunque el muestreo no invasivo resulte una alternativa atractiva para reducir al mínimo la interacción con los individuos durante el muestreo, evitando así alterar el comportamiento de estos, los resultados del análisis comparativo global de las muestras de piel descamada en la detección de marcadores moleculares indica claramente su reducida eficiencia. Esto, aunado al mayor costo y tiempo de análisis requeridos para asegurar la obtención de resultados confiables, hace de la piel descamada la opción menos adecuada para el estudio de marcadores moleculares en la ballena azul. Finalmente, y en función del mayor potencial como fuente de DNA y de otras moléculas, las biopsias deben ser consideradas como la estrategia primaria de muestreo en estudios de ecología molecular para esta especie.

La eficiencia en la asignación de las muestras de piel descamada a los individuos fotoidentificados resultó, sin embargo, mayor en la ballena azul que en otras especies con hábitos más gregarios e interacciones sociales más activas. Así mismo, no se encontró evidencia de que la recolecta de este tipo de muestras estuviese sesgado hacia un grupo particular de individuos, o al menos a un grupo diferente al representado en las biopsias. En conclusión, aunque el análisis de la mayoría de las muestras de piel descamada resultó problemático, no se detectó ninguna razón por la que dichas muestras pudieran considerarse no representativas del grupo de ballenas azules que ocurren en las agregaciones mexicanas y por lo tanto, contribuyeron de manera importante en la obtención de los datos moleculares de las agregaciones mexicanas de ballena azul del Pacífico Norte.

La estimación de la diversidad nucleotídica, el número de haplotipos y la diversidad haplotípica en las agregaciones mexicanas de ballena azul resultaron en valores de 0.0064±0.0037, 17 y 0.7943 ± 0.0232, respectivamente. Aunque estos valores son moderadamente menores a los de otras especies de misticetos, tales niveles de diversidad genética permiten sugerir, más no concluir, que a pesar de las intensas capturas que sufrió la población a principios del siglo pasado, la reducción en el número de individuos no fue tan severa. Lo anterior concuerda con los resultados de la simulación demográfica basada en el estimador genético del tamaño histórico de la población. El número de ballenas azules que conformaban el stock original del Pacífico Nororiental, suponiendo la continuidad del stock desde México hasta Alaska, se estimó en (4,812 individuos; I.C. 95%; 2,854 – 7,237).

Aunque el número de linajes maternos de ballenas azules de otras regiones del mundo que pudieron incorporarse al análisis filogenético fue limitado, la topología no plantea la separación entre los grupos evolutivamente divergentes sugeridos por Conway *et al.* (2003) con base en marcadores nucleares. La ocurrencia simultánea de dos grupos de linajes maternos divergentes en las agregaciones mexicanas, para los que no se detectó un patrón diferencial de uso del área, plantea la posibilidad de que dos grupos de ballenas azules hayan alcanzado el Pacífico Norte en diferente momento. La similitud en la topología filogenética de los linajes maternos de la ballena jorobada (ver Baker *et al.* 1993) y de la ballena de aleta (ver Bérubé *et al.* 1998) con la inferida para la ballena azul en este trabajo, permite plantear una hipótesis de flujo recurrente que explicaría la presencia de dos grupos divergentes ocupando la misma área como zona de crianza. El análisis futuro de marcadores nucleares en las agregaciones mexicanas permitirá establecer si los grupos divergentes de linajes maternos operan como una unidad poblacional o no.

La presencia de madres con cría en ambos grupos de linajes, en combinación con los niveles de abundancia reconstruidos bajo distintos escenarios de captura y tasa neta de crecimiento poblacional, sustentan la idea de que el Golfo de California es un hábitat crítico para la crianza y posiblemente para otras actividades relacionadas con la reproducción (ver Gendron 2002). Aunque el número de ballenas azules estimadas para

las agregaciones mexicanas por transecto lineal representa apenas poco más de la tercera parte del total estimado en aguas de California y la costa occidental de Baja California (Gendron 2002, Calambokidis y Barlow 2003), no se han detectado otras áreas de concentración de crías.

Considerando la estimación del tamaño histórico poblacional, las tendencias demográficas para la época de las capturas y las estimaciones actuales de abundancia, es evidente que el número de madres con cría presentes cada año en el Golfo de California no podría explicar el incremento en la abundancia que se ha planteado para aguas de California durante las últimas décadas. En función de las evidencias demográficas históricas y genéticas basadas en los datos moleculares, se plantea alternativamente que tal incremento se debe más a un cambio en la distribución de la especie, asociada muy probablemente con las fluctuaciones en la productividad primaria en altas latitudes del Pacífico Norte (PDO); regiones en donde históricamente la especie era abundante.

Las modificaciones al modelo para la estimación del tamaño efectivo histórico de la población que se plantean en este trabajo, incorporan dos factores críticos que operan como huellas demográficas de las poblaciones. Los índices tradicionales de diversidad genética desprecian en gran medida a aquellos haplotipos poco representados en las poblaciones. La aproximación que aquí se sugiere incorpora información filogenética al considerar las tasas de mutación y los tiempos de divergencia intraespecíficos y no minimiza el efecto de los haplotipos raros que, en gran medida representan de mejor forma la historia demográfica de la población.

Las limitaciones más claras al modelo corregido son: 1) el tamaño de muestra, que permitirá o no tener representados al mayor número de linajes maternos presentes en la población; y 2) la incertidumbre en la delimitación de las poblaciones, que al no conocerse con precisión estaría subestimando el número de individuos.

La distribución espacial de los linajes maternos, particularmente en especies con altas capacidades migratorias, podría estar reflejando exclusivamente el pasado evolutivo de

las poblaciones. El hecho de que durante su historia evolutiva haya existido un importante flujo de linajes maternos, la ocurrencia actual de linajes comunes o filogenéticamente cercanos no implica necesariamente que esas conexiones entre las poblaciones se conserven hoy en día. De nueva cuenta, con la incorporación de marcadores moleculares nucleares se podría establecer la historia demográfica reciente de las poblaciones y así obtener estimaciones más confiables del tamaño histórico de las mismas.

A reserva de que el modelo empleado pueda ser validado, este ofrece números más congruentes y reconcilia plenamente las estimaciones efectuadas por retrocálculo demográfico con las estimaciones basadas en datos moleculares, contrastando con las controversiales estimaciones de Roman y Palumbi (2003).

LITERATURA CITADA

Allen, M., A.S. Engstrom, S. Meyers, O. Handt, T. Saldeen, A. von Haeseler, S. Paabo y U. Gyllensten. 1998. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. Journal of Forensic Science 43(3): 453-464.

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.

Amos, W. 1997. Marine mammal tissue sample collection and preservation for genetic analysis. p 107-113. En: A.E., Dizon, S.J. Chivers y W.F. Perrin (eds.). Molecular genetics of marine mammals. The Society of Marine Mammalogy. Special Publication Number 3.

Amos, W. y A.R. Hoelzel. 1991. Long-term preservation of whale skin for DNA analysis. Report to the International Whaling Commission. Special Issue 13: 99-103.

Amos, W., H. Whitehead, M.J. Ferrari, R. Payne y J. Gordon. 1992. Restrictable DNA from sloughed cetacean skin; its potential for use in population analysis. Marine Mammal Science 8(3): 275-283.

Andersen, L., E.W. Born, R. Dietz, T. Haug, N. □ien y C. Bendixen. 2003. Genetic population structure of minke whales *Balenoptera acutorostrata* from Greenland, the North East Atlantic and the North Sea probably reflect different ecological regions. Marine Ecology Progress Series 247: 263-280.

Anónimo. 1994. Report of the PBR (Potential Biological Removal) workshop. June 27-29, 1994. NOAA, NMFS.

Aris-Brosou, S. y L. Excoffier. 1996. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. Molecular Biology and Evolution 13: 494-504.

Arnason, U. y A. Gullberg. 1993. Comparison between the complete mtDNA sequences of the blue and the fin whale, two species that can hybridize in nature. Journal of Molecular Evolution 37 (4): 312-322.

Arnason, U. y A. Gullberg. 1994. Relationships of baleen whales established by cytochrome b gene sequence comparison. Nature 367: 726-728.

Arnason, U., A. Gullberg, S. Gretarsdottir, B. Ursing y A. Janke. 2000. The mitochondrial genome of sperm whale and a new molecular reference to estimating Eutherian divergence dates. Journal of Molecular Evolution 50: 569-578.

Avise, J.C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press. Cambridge.

Avise, J.C., J.E. Niegel y J. Arnold. 1984. Demographic influences of mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. Journal of Molecular Evolution 20:99-105.

Avise, J.C., R.M. Ball y J. Arnold. 1988. Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: A comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory of neutral mutations. Molecular Biology and Evolution 5: 331-344.

Baker, C.S., A. Perry, J.L. Bannister, M.T. Weinrich, R.B. Abernethy, J. Calambokidis, J. Lien, R.H. Lambersten, J. Urban-Ramirez, O. Vasquez, P.J. Clapham, A. Alling, S.J. O'Brien y S.R. Palumbi. 1993. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 90: 8239-8243.

Baker, C.S., F. Cipriano y S.R. Palumbi. 1996. Molecular identification of whale and dolphin products commercial markets in Korea and Japan. Molecular Ecology 5: 671-685.

Baker, C.S. y P.J. Clapham. 2004. Modelling the past and future of whales and whaling. Trends in Ecology and Evolution 19(7): 365-371.

Baker, C.S. y S.R. Palumbi. 1997. The genetic structure of whale population: Implications for management. p 117-146. En: A.E., Dizon, S.J. Chivers y W.F. Perrin (eds.). Molecular genetics of marine mammals. The Society of Marine Mammalogy. Special Publication Number 3.

Baker, C.S., S.R. Palumbi, R.H. Lambertsen, M.T. Weinrich, J. Calambokidis, y S.J. O'Brien. 1990. Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. Nature 344: 238-240.

Baker, C.S., L. Medrano-Gonzalez, J. Calambokidis, A. Perry, F. Pichler, H. Rosenbaum, J. M. Straley, J. Urban-Ramirez, M. Yamaguchi y O. Von Ziegesar. 1998. Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among humpback whales in the North Pacific. Molecular Ecology 7:695-707.

Bakke, I., S. Johansen, Ø. Bakke y M.R. El-Gewely. 1996. Lack of population subdivision among minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) from Icelandic and Norwegian waters based on mitochondrial DNA sequences. Marine Biology 125:1-9.

Bancroft, J.D. y A. Stevens. 1977. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone. Edimburg.

Barber, R.T. y R.L. Smith. 1981. Coastal upwelling ecosystems. p. 31-68. En: A. Longhurst (ed.). Analysis of marine ecosystems. Academic Press, New York.

Barlow, J. 1994. Abundance of large whales in California coastal waters: a comparison of ship surveys in 1979/80 and in 1991. Reports of the International Whaling Commission 44: 399-406.

Barlow, J. 1995. The abundance of cetaceans in California waters. Part I: Ship surveys in summer and fall of 1991. Fishery Bulletin 93: 1-14.

Barlow, J. 1997. Preliminary estimates of cetacean abundance off California, Oregon and Washington based on a 1996 ship survey and comparisons of passing and closing modes. Administrative Report LJ-97-11, Southwest Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, P.O. Box 271, La Jolla, CA 92038.

Barlow, J., K.A. Forney, P.S. Hill, R.L. Brownell, J.V. Caretta, D.P. De Master, F. Julian, M. Lowry, T. Regan y R.R. Reeves. 1997. U.S. Pacific marine mammals stock assessements: 1996. NOAA Technical memorandum NMFS-TM-SWFSC-248.

Barlow, J., R.L. Brownell, D.P. DeMaster, K.A. Forney, M.S. Lowry, S. Osmek, T.L. Ragen, R.R. Reeves y R.J. Small. 1995. U.S. Pacific marine mammal stock assessment. NOAA Technical Report.

Barlow, J. y T. Gerrodette. 1996. Abundance of cetaceans in California waters based on 1991 and 1993 ship surveys. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFS-SWFSC-233.

Beamish, P. y E. Mitchell. 1973. Short pulse length audio frequency sounds recorded in the presence of a minke whale *Balaenoptera acutorostrata*. Deep-Sea Research Oceanography Abstracts. 20: 375–386.

Beerli, P y J. Felsenstein. 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. Genetics 152: 763-773.

Bérubé, M. y P.J. Palsbøll. 1996. Identification of sex in Cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. Molecular Ecology 5(2): 283-288.

Bérubé, M., A. Aguilar, D. Dendanto, F. Larsen, G. Notarbartolo di Sciara, R. Sears, J. Sigurjónsson, J. Urban-R. y P.J. Palsbøll. 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., J. Urbán, A.E. Dizon, R. Brownell y P. Palsbøll. 1998. Genetic identification of a small and highly isolated population of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Sea of Cortez, Mexico. Conservation Genetics 3: 183-190.

Breiwick, J.M. y A.E. York. 2002. Stock assessment. p. 1185-1189. En: W.F. Perrin (ed). Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press.

Berzin, A.A. 1978. Whale distribution in Tropical Eastern Pacific waters. Report to the International Whaling Commission 28: 173-177.

Bond, N.A. y D.E. Harrison. 2000. The Pacific Decadal Oscillation, air-sea interaction and central north Pacific winter atmospheric regimes. Geophysical Research Letters 27(5): 731-734.

Brinkmann, A. 1948. Studies on female fin and blue whales. Report on investigations carried out in the Antarctic during the season 1939-1940. I Komimsjon hos Jacob Dybwad. Oslo.

Brown, J.H. y A.C. Gibson. 1983. Biogeography. The C. V. Mosby Company, St. Louis Mosby. St. Louis.

Brown, M.W., S.D. Kraus, D.E. Gaskin. 1991. Reaction of north Atlantic right whales (*Eubalena glacialis*) to skin biopsy sampling for genetic and pollutant analysis. Report to the International Whaling Commission. Special Issue 13: 81-90.

Brueggeman, J.J., T.C. Newby y R.A. Grotefendt. 1985. Seasonal abundance, distribution and population characteristics of blue whales reported in the 1917 to 1939 catch records of two Alaska whaling stations. Report to the International Whaling Commission 35: 405-411.

Buckland, S.T., D.R. Anderson, K.P. Burnham y J.L. Laake. 2001. Distance sampling: Estimating abundance of biological populations. Chapman and Hall. London.

Buckley, T.R. y C.W. Cunningham. 2002. The effect of nucleotide substitution model assumptions on estimates of nonparametric bootstrap support. Molecular Biology and Evolution 19: 1659-1671.

Calambokidis, J. y J. Barlow. 2004. Abundance of blue whale and humpback whales in the Eastern North Pacific estimated by capture-recapture and line-transect methods. Marine Mammal Science 20(1): 63-85.

Calambokidis, J., y G.H. Steiger. 1994. Population assessment of humpback and blue whales using photoidentification from 1993 surveys off California. Final Contract Report to Southwest Fisheries Science Center, P.O. Box 271, La Jolla, CA 92038.

Calambokidis, J., G.H. Steiger, J.C. Cubbage y K.C. Balcomb. 1989. Biology of blue whales in the Gulf o the Farallones and adjacent areas of California. Report to Gulf of the Farallones National Marine Sanctuary, San Francisco.

Calambokidis, J., G.H. Steiger, J.C. Cubbage, K.C. Balcom, C. Ewald, S. Kruse, R. Wells y R. Sears. 1990. Sightings and movements of blue whales off central California 1986-88 from photo-identification. p 343-348. En: Individual recognition of cetaceans. Report to the International Whaling Commission. Special Issue 12.

Calambokidis, J., R. Sears, G.H. Steiger, y J. Evenson. 1995. Movement and stock structure of blue whales in the eastern North Pacific. En: Abstracts 11th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Orlando, Florida, 14-18 December 1995. Society for Marine Mammalogy, Lawrence, KA.

Chakrabarti, R. y C.E. Schutt. 2001. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. Nucleic Acids Research 29(11): 2377-2381.

Chakraborty, R. y K.M. Weiss. 1991. Genetic variation of the mitochondrial DNA genome in American Indians is at mutation-drift equilibrium. American Journal of Human Genetics 86:497-506.

Chandler, T.E., J. Calambokidis y K. Rasmussen. 1999. Population identity of blue whales on the Costa Rica Dome. En: 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Maui, Dec. 1999. Society for Marine Mammalogy, Lawrence, KA.

Chivers, C.J. 1999. Encountering whales. Wildlife Conservation (June Volume).

Clapham, P.J., P.J. Palsbøll y D.K. Mattila. 1993. High energy behaviors in humpback whales as a source of sloughed skin for molecular analysis. Marine Mammal Science 9(2): 214-220.

Conway, C., L. Lyons, R. Sears, J. Calambokidis, P. Gill y B. May. 2003. Population structure of the blue whale (*Balaenoptera musculus*) based on nuclear genetic variation. En: Abstracts 14th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Vacouver, Canada.

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Research 16(22): 10881-10890.

Croizat, L., G. Nelson y D.E. Rosen. 1974. Centres of origin and related concepts. Systematic Zoology. 23: 265-287.

Croll, D.A., B. Marinovic, S. Benson, F.P. Chavez, N. Black, R. Ternullo y B.R. Tershy. 2000. From wind to whales: Trophic links in a coastal upwelling system. Monterey Bay National Marine Sanctuary Research Program Technical Report.

Croll, D.A., B.R. Tershy, R.P. Hewitt, D.A. Demer, P.C. Fiedler, S.E. Smith, W. Armstrong, J.M. Popp, T. Kiekhefer, V.R. Lopez, J. Urban y D. Gendron. 1998. An integrated approach to the foraging ecology of marine birds and mammals. Deep-Sea Research. 2(45): 1353-1371.

Cummings, W.C. y P.O. Thompson. 1971. Underwater sounds from the blue whale, *Balaenoptera musculus*. Journal of the Acoustics Society of America 50(4): 1193-1198.

Dizon, A.E., S.J. Chivers y W.F. Perrin. 1997. Molecular genetics of marine mammals. The Society of Marine Mammalogy. Special Publication Number 3.

Donovan, G.P. 1991. A review of IWC stock boundaries. p 39-68 p. In: A.R. Hoelzel (ed.). Genetic ecology of whales and dolphins. Report to the International Whaling Commission. Special Issue 13.

Dover, G.A. 1991. Understanding whales with molecular probes. Final report to the International Whaling Commission. p 29-35. En: A.R. Hoelzel (ed.). Genetic ecology of whales and dolphins. Report to the International Whaling Commission. Special Issue 13.

Edds, P.L. 1982. Vocalizations of the blue whale, *Balaenoptera musculus*, in the St. Lawrence River. Journal of Mammalogy 63: 345-347.

Forney, K.A., J. Barlow y J.V. Carretta. 1995a. The abundance of cetaceans in California waters. Part II: Aerial surveys in winter and spring of 1991 and 1992. Fishery Bulletin 93: 15-26.

Forney, K.A., R.L. Brownell Jr., y P.C. Fiedler. 1995b. The distribution of marine mammals along the Aleutian Islands - Where have all the blue whales gone? En: Abstracts 11th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Orlando, Florida, 14-18 December 1995. Society for Marine Mammalogy, Lawrence, KA.

Frackman, S., G. Kobs, D. Simpson y D. Storts. 1998. Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR. Promega Notes 65: 27.

Fu, Y.X. 1994. A phylogenetic estimator of effective population size or mutation rate. Genetics 136:685-692.

Gagneux, P., C. Boesch y D.S. Woodruff. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. Molecular Ecology 6(9): 861-868.

Gambell, R. 1976. World whale stocks. Mammal Review 6: 41-53

Gaskin, D.E. 1983. The ecology of whales and dolphins. Hienemman Editors. London.

Gauthier, J. y R. Sears. 1999. Behavioral response of four species of Balaenopterid whales to biopsy sampling. Marine Mammal Science 15: 85–101.

Gendron, D. 2002. Ecología poblacional de la ballena azul, *Balaenoptera musculus*, de la Península de Baja California. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México.

Gendron, D. y S.L. Mesnick. 2001. Sloughed skin: a method for the systematic collection of tissue samples from Baja California blue whales. Journal of Cetacean Research and Management 1(1): 3-24

Gendron, D. y V. Zavala-Hernández. 1995. Blue whales of Baja California: a summary of their distribution and preliminary reproductive data based on photoidentification. En: Abstracts 11th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Orlando, Florida, 14-18 December 1995. Society for Marine Mammalogy, Lawrence, KA.

George, J.C., J. Bada, J. Zeh, L. Scott, S.E. Brown, T. O'Hara y R. Suydam. 1999. Age and growth estimates of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) via aspartic acid racemization. Canadian Journal of Zoology 77(4): 571-580.

Gerber, L.R. y D.P. DeMaster. 1999. A quantitative approach to endangered species act classification of long-lived vertebrates: application to the North Pacific humpback whale. Conservation Biology 13.

Gerber, L.R., D.P. DeMaster y S.Perry. 2000. Measuring success in conservation. American Scientist 88: 316-324.

Gilpatrick, J.W. y W.L. Perryman. 1999. Aerial photogrammetry of Eastern Tropical Pacific blue whales, *Balaenoptera musculus*. En: Abstracts 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Vacouver, Canada.

Gilpatrick, J.W., W.L. Perryman y M.S. Lynn. 1995. Aerial photogrammetry and photo-identification of blue whales (*Balaenoptera musculus*) in the California Channel Islands - 1994. En: Abstracts 11th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Orlando, Florida, 14-18 December 1995. Society for Marine Mammalogy, Lawrence, KA.

Gilpatrick, J.W., W.L. Perryman, M.S. Lynn y M.L DeAngelis. 1996. Geographic population of blue whales (*Balaenoptera musculus*) in the North Pacific investigated from whaling records and aerial photogrammetry. Paper SC/47/NP4. Presented in the International Whaling Commission.

Gilpatrick, J.W., W.L. Perryman, M.S. Lynn, M.L. DeAngelis y R.L. Brownell Jr. 1999. Geographic variation in external morphology of North Pacific and Southern hemisphere blue whale (*Balaenoptera musculus*). U.S. National Marine Fisheries Service (SWFSC). Report to the International Whaling Commission. (No publicado)

Goerlitz, D.S., J. Urbán, L. Rojas-Bracho, M. Belson y C.M. Schaeff. 2003. Mitochondrial DNA variation among Eastern North Pacific gray whales (*Eschrichtius robustus*) on winter breeding grounds in Baja California. Canadian Journal of Zoology 81(12): 1965-1972.

Gregr, E.J., L. Nichol, J.K.B. Ford, G. Ellis y A.W. Trites. 2000. Migration patterns and population structure of northeastern Pacific whales off coastal Brithish Columbia: An analysis of commercial whaling records from 1908-1967. Marine Mammal Science 15(4): 699-727.

Gu, X. y J. Zhang. 1997. A simple method for estimating the parameter of substitution rate variation among sites. Molecular Biology and Evolution 14: 1106-1113.

Haig, S. M. 1998. Molecular contributions to the conservation. Ecology 79(2): 413-425.

Hammond, P.S. 1986. Estimating the size of naturally marked whale populations using capture-recapture techniques. Report to the International Whaling Commission. Special Issue 8: 253-282.

Hammond, P.S., S.A. Mizroch y G.P. Donovan. 1990. Individual recognition of cetaceans: use of photoidentification and other techniques to estimate population parameters. Report to the International Whaling Commission. Special Issue 12:141-142.

Hare, S.R, N.J. Mantua y R.C. Francis, 1999. Inverse Production Regimes: Alaska and West Coast pacific salmon. Fisheries 24: 6-14.

Hare, S.R. y R.C. Francis. 1995. Climate change and salmon production in the Northeast Pacific Ocean. p 357-372. En: R.J. Beamish (ed.). Ocean climate and northern fish populations. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Science.

Harpending, R.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Human Biology 66: 591-600.

Hasegawa, M., H. Kishino y T. Yano. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution 22: 160-174.

Herman, J.S. 1992. Cetacean specimens in the National Museum of Scotland. National Museums of Scotland Information Series No. 13.

Hoelzel, A.R. 1991. Genetic ecology of whales and dolphins. International Whaling Commission. Special Issue 13. Cambridge

Hoelzel, A.R. 1992. Molecular genetic analysis of populations: A practical approach. Oxford University Press, New York.

Hoelzel, A.R., J.M. Hancock y G.A. Dover. 1991. Evolution of the cetacean mirochondrial D-Loop region. Molecular Biology and Evolution 8(3): 475-493.

Holt, S.J. 2004. Counting whales in the North Atlantic. Science 303: 39-40.

Holt, S.J. y N.M. Young. 1991. Guide to review of the management of whaling. Center for Marine Conservation. Washington.

Ichihara, T. 1966. The pygmy blue whale, *Balaenoptera musculus brevicauda*, a new subspecies from the Antarctic. p 79-113. En: K.S. Norris (ed.). Whales, dolphins and porpoises. University of California Press, Berkeley.

IUCN. 1996. 1996 IUCN Red List of threatened animals. International Union for the Conservation of Nature. Gland, Switzerland.

IWC. 1942. International Whaling Commission. The Committee for Whaling Staistics. Grøndahl & Søn, Oslo.

IWC. 1966. International Whaling Commission. Schedule to the International Whaling Convention, 1946, revides to include the amendments that came into operation after the Seventeenth Meeting in London.

IWC. 1999. The Revised Management Procedure (RMP) for baleen whales. Journal of Cetacean Research and Management . 1:251-258.

IWC. 2000. International Whaling Commission. Report to the Scientific Committee on Other Great Whales (Annex G). Journal of Cetacean Research and Management 2: 172-174.

IWC. 2001. International Whaling Commission. IWC Whale Population Estimates. [Disponible en http://iwcoffice.org/Estimate.htlm]

IWC. 2002. International Whaling Commission. Report to the Scientific Committee on Other Great Whales (Annex G). Journal of Cetacean Research and Management 4: 205-207.

Kastelle, C. R., K.E.W. Shelden y D.K. Kimura. 2003. Age determination on mysticete whale using $^{210}Pb/^{226}Ra$ disequilibria. Canadian Journal of Zoology 81: 21-32.

Kato, H. y T. Miyashita. 2004. Japan Progress Report on Cetacean Research. National Research Institute of Far Seas Fisheries SC/56/ProgRep. Japan.

Kato, H., T. Miyashita y H. Shimada. 1995. Segregation of two sub-species of the blue whale in the Southern Hemisphere. Report to the International Whaling Commission 45: 273-283.

Keightley, P. y T. Johnson. 2004. MCALINGN: Stochastic alignment of noncoding DNA sequences based on an evolutionary model of sequence evolution. Genome Research 14: 442-450.

Kellog, R. 1929. What is known of the migration of some of the whalebone whales. Annual Report of Smithsonian Institute. 1928: 467-494.

Kellog, R. 1931. Whaling statistics for the Pacific coast of North America. Journal of Mammalogy 12: 73-77.

Kemf, E., y C. Phillips. 1994. Whales in the Wild. World Wildlife Fund Rep. Gland, Switzerland.

Kimura, M. 1968. Evolutionary rates at the molecular level. Nature. 217:624-626.

Klinowska, M. 1991. Dolphins, porpoises and whales of the world. The IUCN Red Data Book. IUNC, Cambridge.

Kumar, S., K. Tamura, y M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:2.

Kurlansky, M. 2000. "*Eschrichtius robustus*" (On-line), Animal Diversity Web. [http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Eschrichtius_robustus.html.]

Lambersten, R.H. 1987. A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. Journal of Mammalogy 68: 443-445.

Lambert, D.M. y C.D. Millar. 1995. DNA science and conservation. Pacific Conservation Biology 2: 21-38.

Larkman, V.E. y R.R. Veit. 1998. Seasonality and abundance of blue whale off Southern California. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports 39: 236-239.

LeDuc, R.G., D.W. Weller, J. Hyde, A.M. Burden, P.E. Rosel, R.L. Brownell Jr., B. Würsig y A.E. Dizon. 2002. Genetic differences between western and eastern gray whales (*Eschrichtius robustus*). Journal of Cetacean Research Management 4(1): 1-5.

Liukart, G., F.W. Allendorf, J.M. Cornuet y W.B. Sherwin. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent populations bottlenecks. Journal of Heredity 89(3): 238-247.

Lockyer, C. 1981. Growth and energy budgets of large baleen whales from the Southern hemisphere. Food and Agriculture Organization Fisheries Series 5: 379-487.

Lockyer, C. 1984. Review of baleen whale (Mysticeti) reproduction and implications for management. Report to the International Whaling Commission Special Issue 6: 27-50.

Lockyer, C. y S.G. Brown. 1981. The migration of whales. p 105-137. En: D.J. Aidley (ed.). Animal migration. Society for Experimental Biology. Seminar Series 13, Cambridge University Press. Cambridge.

Lopez, J.V., M. Culver, J.C. Stephens, W.E. Johnson y S.J. O´Brien. 1997. Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. Molecular Biology and Evolution 14(3): 277-286.

Lubick, N. 2003. New count of old whales adds up big debate. Science 301:451.

Mace, G.M. y R. Lande. 1991. Assessing ectinction tretas: toward reevaluation of IUCN threatened species categories. Coservation Biology 5:148-157.

Mackintosh, N.A. 1942. The southern stocks of whalebone whales. Discovery Report 22: 197-300.

Mackintosh, N.A. y J.F.G. Wheeler. 1929. Southern blue and fin whales. Discovery Report 1: 257-540.

Maddison, D.R. 1994. Phylogenetic methods for inferring the evolutionary history and processes of change in discretely valued characters. Annual Review of Entomology 39: 267–292.

Mangels, K.F. y T. Gerrodette. 1994. Report of cetacean sightings during a marine mammal survey in eastern Pacific ocean and the Gulf of California aboard the NOAA ships McArthur and David Starr Jordan, July 28 – November 6, 1993. Tech. Rep. NOAA-TM-NMFS-SWFSC-211.

Mantua, N.J. 1999. The Pacific Decadal Oscillation. A brief overview for non-specialists (to appear in the Encyclopedia of Environmental Change). [Disponible en http://tao.atmos.washington.edu/pdo]

Mantua, N.J., S.R. Hare, Y. Zhang, J.M. Wallace y R.C. Francis. 1997. A Pacific decadal climate oscillation with impacts on salmon. Bulletin of the American Meteorological Society 78: 1069-1079.

Marlow, J.R., C.B. Lange, G. Wefer y A. Rosell-Mele. 2000. Upwelling interaction as part of the Pliocene-Pleistocene climate transition. Science 290: 2288-2291.

Martin, A.P. y S. R. Palumbi. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and molecular clock. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 90:4087-4091.

Mate, B.R., B.A. Lagerquist y J. Calambokidis. 1999. Movements of north pacific blue whales during the feeding season off Southern California and their southern fall migration. Marine Mammal Science 15(4): 1246-1257

Medway, W. 1983. Evaluation of the safety and usefulness of techniques and equipment used to obtain biopsies from free-swimming cetacean. NTIS Publication No. PB83-263269

Messenger, S.L. y J.A. McGuire. 1998. Morphology, molecules and the phylogenetics of cetaceans. Systematic Biology 47(1): 90-124.

Milinkovitch, M.C., A. Meyer y J.R. Powell. 1994. Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochindrial genes. Molecular Biology and Evolution 11(6): 939-948.

Miller, A.J., D.R. Cayan, T.P. Barnett, N.E. Graham y J.M. Oberhuber, 1994. The 1976-77 climate shift of the Pacific Ocean. Oceanography 7: 21-26.

Minobe, S. 1997. A 50-70 year climatic oscillation over the North Pacific and North America. Geophysical Research Letter 24: 683-686.

Minobe, S. 1999. Resonance in bidecadal and pentadecadal climate oscillations over the North Pacific: Role in climatic regime shifts. Geophysical Research Letter 26: 855-858

Moore, S.E., W.A. Watkins, M.A. Daher, J.R. Davies y M.E. Dahlheim. 2002. Blue whale habitat associations in the Northwest Pacific: analysis of remotely-sensed data using a Geographic Information System. Oceanography 15(3): 20-25.

Mullis, K.B. y F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 155: 335-350.

Nee, S., E.C. Holmes, A. Rambaut y P. Harvey. 1995. Inferring population history from molecular phylogenies. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 349: 25-31.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

Nei, M. y N. Takahata. 1993. Effective population size, genetic diversity, and colescence time in subdivided populations. Journal of Molecular Evolution 37: 240-244.

Nei, M. y S. Kumar. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Nishida, S., L. Pastene, M. Goto y H. Koike. 2003. SRY gene structure and phylogeny in cetacean species. Mammal Study 28: 57-66.

NMFS. 1994. National Marine Fisheries Service. Marine Mammal Protection Act of 1972 - Annual Report, 1/1/92 - 12/31/93.

Northrop, J., W.C. Cummings y M.F. Morrison. 1971. Underwater 20-Hz signals recorded near Midway Island. Journal of the Acoustics Society of America 49: 1909-1910.

Ohsumi, S. y S. Wada. 1972. Stock assessment of blue whales in the North Pacific. Report of the Scientific Committee of the 24th International Whaling Commission.

Ohsumi, S. y S. Wada. 1974. status of whale stocks in the North Pacific, 1972. Report to the International Whaling Commission 24:114-126.

Omura, H. 1955. Whales in the north part of the North Pacific. Norsk Hvalfangst-Tid 6: 323-345.

Ortega-Ortíz, C.D. 2004. Morfometría de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) de Baja California mediante fotografías aéreas. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, Baja California Sur, México.

Palacios, D.M. 1999. Blue whale (*Balaenoptera musculus*) occurrence off the Galapagos Islands, 1978-1995. Journal of Cetacean Research Management 1: 41-51

Palsbøll, P.J., A. Vader, I. Bakke y M.R. El-Gewely. 1992. Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction. Canadian Journal of Zoology 70: 2166-2170.

Palsbøll, P.J., F. Larsen, y E.S. Hansen. 1991. Sampling of skin biopsies from free-ranging large cetaceans in West Greenland: development of new biopsy tips and bolt designs. Report of the International Whaling Commission. Special Issue 13: 71-79.

Palsbøll, P.J., M. Berube, A. Aguilar, G. Notarbartolo di Sciara y R. Nielsen. 2004. Discerning between recurrent gene flow and recent divergence under a finite-site mutation model applied to north Atlantic and Mediterranean sea fin whale (*Blanaenoptera physalus*) population. Evolution 58(3): 670-675.

Palsbøll, P.J., P.J. Clapham, D.K. Matilla, F. Larsen, R. Sears, H.R. Siegismund, J. Sigurjonsson, O. Vazquez y P. Arcantader. 1995. Distribution of the mtDNA haplotypes in the North Atlantic humpback whales: the influence of behavior on population structure. Marine Ecology Progress Series 116: 1-10

Parker, P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. Ecology 79(2): 361-382.

Parsons, K.M., J.F. Dallas, D.E. Claridge, J.W. Durban, K.C. Balcom III, P.M. Thompsons y L.R. Noble. 1999. Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. Molecular Ecology 8: 1753-1768.

Penny, D., D. Hendy y M.A. Steel. 1992. Progress with methods for constructing evolutionary tress. Trends in Ecology and Evolution 7: 73-79.

Perry, S.L., D.P. DeMaster y G. Silber. 1999. The great whales: history and status of six species listed as endangered under the U.S. Endangered Species Act of 1973. Marine Fisheries Review Special Issue 61(1): 1-74

Pesole. G., C. Gissi, A. De Chirico y C. Saccone. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. Journal of Molecular Evolution 48: 427-434.

Philander, S.G. y A.V. Fedorov. 2003. Role of tropics in changing the response to Milankovich forcing some three million years ago. Paleoceanography 18(2): 1045-1056.

Raferty, A.E., y J.E. Zeh. 1998. Estimating bowhead whale population size and rate of increase from the 1993 census. Journal of the American Statistical Association 93: 451-463.

Ravindra, K.A., T.L. Magnanti y J.B. Orlin. 1993. Network flows, theory, algorithms, and applications. Prentice Hall. New Jersey.

Redenbach, Z. y E.B. Taylor. 1999. Zoogeographical implications of variation in mitochondrial DNA of antartic grayling (*Thymallus arcticus*). Molecular Ecology 8: 23-35.

Reeves, R.R., P.J. Clapham, R.L. Brownell, Jr. y G.K. Silber. 1998. Recovery plan for the blue whale (*Balaenoptera musculus*) for the National Marine Fisheries Service. National Marine Fisheries Service. Silver Spring.

Reilly, S.B., y V.G. Thayer. 1990. Blue whale (*Balaenoptera musculus*) distribution in the Eastern Tropical Pacific. Marine Mammal Science 6: 265-277.

Rice, D.W. 1966. Blue whales in the waters of Baja California. Report to the International Whaling Commission (No publicado).

Rice, D.W. 1974. Whales and whale research in the eastern North Pacific. p. 170-195. En: W.E. Schevill (ed.). The whale problem: a status report. Harvard Press, Cambridge.

Rice, D.W. 1978. Blue whale. p. 30-55. En: D. Haley (ed.). Marine mammals of Eastern Pacific and Arctic waters. Pacific Search Press, Seattle.

Rice, D.W. 1986. Blue whale. p 4-45. En: D. Haley (ed.). Marine mammals of eastern North Pacific and Artic water. Second Edition Pacific Search Press, Seattle.

Richard, K.R., H. Whitehead y J.M. Wright. 1996. Polymorphic microsatellites from sperm whales and their use in the genetic identification of individuals from naturally sloughed pieces of skin. Molecular Ecology 5: 313-315.

Rivers, J.A. 1997. Blue whale, *Balaenoptera musculus*, vocalization from the waters off Central California. Marine Mammal Science 13(2): 186-195.

Rogers, A.R. y H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology and Evolution 9: 552-569.

Roman, J. y R. Palumbi. 2003. Whales before whaling in the North Atlantic. Science 301: 508-510.

Rooney, A.P., R.L. Honeycutt y J.N. Derr. 2001. Historical population size change in bowhead whales inferred from DNA sequence polymorphism data. Evolution 55:1678-1685.

Rosenbaum, H.C., R.L. Brownell Jr., M.W. Browns, C. Schaeff, V. Portway, B.N. White, S. Malik, L.A. Pastene, N.J. Patenaude, C.S. Baker, M. Goto, P.B. Best, P.J. Clapham, P. Hamilton, M. Moore, R. Payne, V. Rowntree, C.T. Tynan, J.L. Bannister y R. Desalle. 2000. World-wide genetic differentiation of *Eubalaena*: questioning the number of right whale species. Molecular Ecology 9:1793-1802.

Rzhetsky, A. y M. Nei. 1992. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. Molecular Biology and Evolution 9: 945-967.

Saccone, C., G. Pesole y E. Sbisa. 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure–function model and evolutionary pattern. Journal of Molecular Evolution 33: 83-91.

Saito, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.

Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F., S. Nicklen, y A.R. Coulson. 1977. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 74(12): 5463-5467.

Scammon, C.M. 1874. The marine mammals of the northwestern coast of North America. Dover Reprint, New York.

Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Schneider-Gadicke, A., P. Beer-Romero, L.G. Brown, G. Mardon, S.W. Luoh y D.C. Page. 1989. Putative transcription activator with alternative isoforms encoded by human ZFX gene. Nature 342 (6250): 708-711.

Sears, L.E., L.S. Moran, C. Kissinger, T. Creasey, H. Perry-O'Keefe, M. Roskey, E. Sutherland y B.E. Slatko. 1992. CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. Biotechniques 13(4): 626-33.

Sears, R. 1987. The photographic identification of individual blue whales *Balaneoptera musculus* in the Sea of Cortez. Cetus 7(1): 14-17.

Sears, R., J.M. Williamson, F.W. Wenzel, M. Bérubé, D. Gendron y P.W. Jones. 1990. Photographic identification of the blue whale (*Balaenoptera musculus*) in the Gulf of St. Lawrence, Canada. Report to the International Whaling Commission. Special Issue 12: 335-342.

Sigurjónsson, J. y T. Gunnlaugsson. 1990. Recent trends in abundance of blue whale (*Balaenoptera musculus*) and humpback whales (*Megaptera novaenagliae*) off west and southwest Iceland, with a note on occurrence of other cetacean species. Report to the International Whaling Commission 40: 537-551.

Smit, A.M. 2003. Age determination and establishment of reproductive condition from marine mammal biopsy sampling. DOC Science Internal Series 133. Department of Conservation, Wellington.

Smith, A.B. 1994. Parsimony, phylogenetic analysis, and fossils. p. 31-44. En: Systematics and the fossil record. Blackwell Scientific Publications.

Springer, A.M. 1998. Is it all climate change? Why marine bird and mammal populations fluctuate in the North Pacific. p 109-119. En: G. Holloway, P. Muller y D. Henderson (eds.), Biotic impacts of extratropical climate variability in the Pacific. Proceedings 'Aha Huliko'a Hawaiian Winter Workshop. University of Hawaii, Honolulu.

Springer, A.M., D.G. Roseneau, D.S. Lloyd, C P. McRoy y E.C. Murphy. 1986. Seabird responses to fluctuating prey abundance in the eastern Bering Sea. Marine Ecology Progress Series 32: 1-12.

Stafford, K.M. 1995. Characterization of blue whale calls from the Northeast Pacific and development of a matched filter to locate blue whales on U.S. Navy SOSUS (Sound Surveillance System) arrays. MS Thesis, Oregon State University, OR.

Stafford, K.M. 2003. Two types of blue whale calls recorded in the Gulf of Alaska. Marine Mammal Science 19(4): 682-693.

Stafford, K.M., D.R. Bohnenstiehl, M. Tolstoy, E. Chapp, D.K. Mellinger y S.E. Moore. 2004. Antartic-type blue whale calls recorded at low latitudes in the Indian and eastern Pacific Oceans. Deep-Sea Research 51: 1337-1346.

Stafford, K.M., S.L. Nieukirk y C.G. Fox. 1999. Low-frequency whale sounds recorded on hydrophones moored in the Eastern Tropical Pacific. Journal of the Acoustics Society of America 106(6): 3687-3698.

Stafford, K.M., S.L. Nieukirk y C.G. Fox. 2001. Geographical and seasonal variation of blue whale calls in the North Pacific. Journal of Cetacean Research Management 3: 65-76.

Steiger, G. y J. Calambokidis. 2000. Reproductive rates of humpback whales off California. Marine Mammal Science 16: 220-239.

Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. Trends in Ecology and Evolution 15: 199-203.

Swofford, D.L. y G.J. Olsen. 1990. Phylogeny reconstruction. p. 411-501. En: D.M. Hillis y C. Moritz (eds.). Molecular systematic. Sinauer Associates, NY.

Swofford, D.L., G.J. Olsen, P.J. Waddell y D.M. Hillis. 1996. p 407-514. Phylogenetic inference. En: D.M. Hillis, B.K. Mabel y C. Moritz (eds.). Molecular Systematics. 2nd ed. Sinauer Associates, Suderland.

Taberlet, P., L.P. Waits y G. Luikart. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends in Evolution and Ecology 14(8): 323-327.

Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics 105:437-460.

Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. p. 37-59. En: N. Takahata y A.G. Clark (eds). Mechanisms of molecular evolution. Introduction to molecular paleopopulation biology. Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc.

Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong trasition-transversion and G+C content biases. Molecular Biology and Evolution 9: 678-687.

Tamura, K. y M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10: 512-526.

Taylor, B.L. y S.J. Chivers. 1997. p 341-346. Anonymous alleles can bias result. En: A.E., Dizon, S.J. Chivers y W.F. Perrin (eds.). Molecular genetics of marine mammals. The Society of Marine Mammalogy. Special Publication Number 3.

Thompson, P.O., L.T. Findley, O. Vidal y W.C. Cummings. 1996. Underwater sounds of blue whales, *Balaenoptera musculus* in the Gulf of California, Mexico. Marine Mammals Science 12:288-293.

Thompson, P.O. y W.A. Friedl. 1982. A long term study of low frequency sounds from several species of whales off Oahu, Hawaii. Cetology 45:1-19.

Tiedemann, R, O. Hardy, X. Vekemans y M.C. Milinkovitch. 2000. Higher impact of female than male migration on population structure in large mammals. Molecular Ecology 9: 1159–1163.

Tilman, M.F. 1975. Assessment of North Pacific stocks of whales. Marine Fisheries Review 37:1-4.

Tomilin, A.G. 1967. Mammals of the USSR and adjacent countries. Vol. IX. Cetacea, Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem.

Tønnessen, J. N., y A.O. Johnsen. 1982. The history of modern whaling. University of California Press, Berkeley.

Trenberth, K.E. y J.W. Hurrell. 1994. Decadal atmospheric-ocean variations in the North Pacific. Climate Dynamics 9: 303-319.

Valsecchi, E., D. Glockner-Ferrari, M. Ferrari y W. Amos. 1998. Molecular analysis of the efficiency of sloughed skin sampling in whale population genetics. Molecular Ecology 7(10): 1419-1422.

Wade, P.R. y T. Gerrodete. 1993. Estimates of cetacean abundance and distribution in the eastern tropical Pacific. Report to the International Whaling Commission 43: 477-493.

Watterson, G. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. Theoretical Population Biology 7:256-276.

Watkins, W.A., M.A. Daher, G.M. Reppucci, J.E. George, D.L. Martin, N.A. Di Marzio y D.P. Gannon. 2000. Seasonallity and distribution of whale calls in the North Pacific. Oceanography 13(1): 62-67.

Weinrich, M.T., R.H. Lambersten, C.S. Baker, M.R. Schilling y C.R. Belt. 1991. Behavioral responses of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the southern Gulf of Maine to biopsy sampling. Report to the International Whaling Commission. Special Issue 13: 91-98.

Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.

Whitehead, H., J.C.D. Gordon, E.A. Mathews y K. Richard. 1990. Obtaining skin samples from living sperm whales. Marine Mammal Science 6: 316-326.

Wilson, A.C., R.L. Cann, S.M. Carr, M. George, Jr., U.B. Gyllensten, K.M. Helm-Bychowski, R.G. Higuchi, S.R. Palumbi, E.M. Prager, R.D. Sage y M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives and evolutionary genetics. Biological Journal of the Linnean Society 26: 375-400.

Wolter, K. y M.S. Timlin. 1998. Measuring the strength of ENSO - how does 1997/98 rank? Weather 53: 315-324.

Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19: 395-420.

WWF. 2003. Word Wildlife Foundation. Whale Stocks Status. [Disponible en http://www.worldwildlife.org]

Yablokov, A.V. 1994. Validity of whaling data. Nature 367:108

Yang, Z. 1994a. Estimating the pattern of nucleotide substitution. Journal of Molecular Evolution 39: 105-111.

Yang, Z. 1994b. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. Journal of Molecular Evolution 39: 306-314.

Yochem, P.K. y S. Leatherwood. 1985. Blue Whale *Balaenoptera musculus* (Linnaeus, 1758). p. 193-240. En: S. Ridgway y S. Harrison (eds.). Handbook of marine mammals. Vol. 3. Academic Press, London.

Zouros, E. 1979. Mutation rates, population sizes and amounts of electrophoretic variation of enzyme loci in natural population. Genetics 92:623-646.

ANEXOS

Anexo A. Secuencias blanco para los cebadores y enzimas de restricción empleados en la identificación molecular del sexo.

Human ZFX mRNA for put. transcription activator, isoform 2. ACCESSION X59739 Schneider-Gadicke,A., Beer-Romero,P., Brown,L.G., Mardon,G., Luoh,S.W. and Page,D.C. TITLE Putative transcription activator with alternative isoforms encoded by human ZFX gene JOURNAL Nature 342 (6250), 708-711 (1989)

Human zinc finger protein Y-linked (ZFY) mRNA, complete cds. ACCESSION M30607 VERSION M30607.1 GI:340435 KEYWORDS zinc finger protein. SOURCE Homo sapiens (human) REFERENCE 1 (bases 1 to 2659) AUTHORS Palmer,M.S., Berta,P., Sinclair,A.H., Pym,B. and Goodfellow,P.N. TITLE Comparison of human ZFY and ZFX transcripts JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (5), 1681-1685 (1990)

Sitio de restricción para Taq I
ZFXY0097 F
ZFXY0582 F
ZFXY701R 5-GCACTTCTTTGGTATCTGAG -'3 Aviva Rosenberg = Fain & LeMay P23EZ
ZFXY0923 R (modificado de Palsboll al eliminar de este un nuclétido en el extremo 3')
ZFXY1204 R
ZFXY F 5'-GGAGAGCCACAAGCTGACCAGC-3'
ZFXY R 5'-CCCTTGTTCAGCTGTCTC -3'

>Human ZFX 1333...2463 ACC: X59739
CATCCTTTGACTGTCTATCCTTGCATGATTTGTGGGAAGAAGTTTAAGTCGAGAGGTTTTTTTGAAAAGGCACATGAAAA
ACCATCCCGAACACCTTGCCAAGAAGAAATACCGCTGTACTGACTGTGATTACACTACCAACAAGAAGATAAGTTTAC
ACAACCACCTGGAGAGCCACAAGCTGACCAGCAAGGCAGAGAAGGCCATTGAATGCGATGAGTGTGGGAAGCATTTCT
CTCATGCAGGGGCTTTGTTTACTCACAAAATGGTGCATAAGGAAAAAGGAGCCAACAAAATGCACAAGTGTAAATTCT
GTGAATACTAGACAGCTGAACAAGCGTTATTGAATCGCCACCTCTTGGCAGTCCACAGCAAGAACTTTCCTCATATTTG
TGTGGAGTGTGGTAAGGGTTTTCGTCACCCGTCAGAGCTCAAAAAGCACATGAGAATCCATACTGGGGAGAAGCCGTA
CCAATGCCAGTACTGCGAATATAGGTCTGCAGACTCTTCTAACTTGAAAACGCATGTCAAAACTAAGCATAGTAAAGA
GATGCCATTCAAGTGTGACATTTGTCTTCTGACTTTCTCGGATACCAAAGAGGTGCAGCAACATGCTCTTATCCACCAA
GAAAGCAAAACACACCAGTGTTTGCATTGCGACCACAAGAGTTCGAACTCAAGTGATTTGAAACGACACATAATTTCA
GTTCACACGAAAGACTACCCCCATAAGTGTGACATGTGTGATAAAGGCTTTCACAGGCCTTCAGAACTCAAGAAACAC
GTGGCTGCCCACAAGGGCAAAAAAATGCACCAGTGTAGACATTGTGACTTTAAGATTGCAGATCCATTTGTTCTAAGTC
GCCATATTCTCTCAGTTCACACAAAGGATCTTCCATTTAGGTGCAAGAGATGTAGAAAGGGATTTAGGCAACAGAGTG
AGCTTAAAAAGCATATGAAGACACACAGTGGCAGGAAAGTGTATCAGTGTGAGTACTGTGAGTATAGCACTACAGATG
CCTCAGGCTTTAAACGGCACGTTATTTCCATTCACACGAAAGACTATCCTCACCGGTGTGAGTACTGCAAGAAAGGCTT
CCGAAGACCTTCAGAAAAGAACCAGCACATAATG

>Human ZFY 1246 ... 2376 ACC: M30607
CATCCTTTGACTGTCTATCCTTGCATGATTTGTGGGAAGAAGTTTAAGTCGAGGGGTTTTTTGAAAAGACACATGAAAA
ACCATCCTGAACACCTTGCCAAGAAGAAGTACCACTGTACTGACTGTGATTACACTACCAATAAGAAGATAAGTTTACA
TAACCACCTGGAGAGCCACAAGCTGACCAGCAAGGCAGAGAAGGCCATTGAATGTGATGAGTGTGGGAAGCATTTTTC
TCATGCAGGGGCTTTGTTTACTCACAAAATGGTGCATAAGGAAAAAGGGGCCAACAAAATGCACAAGTGTAAATTCTG
TGAATATCTAGACAGCTGAACAAGCGTTATTGAATCGCCACCTCTTGGCAGTCCACAGCAAGAACTTTCCTCATATTTGT
GTGGAGTGTGGTAAAGGTTTCCGATACCCGTCGGAACTGAGAAAGCACATGCGAATCCATACCGGCGAGAAGCCATAC
CAATGCCAGTACTGTGAATATAGGTCTGCAGACTCTTCTAACTTGAAAACACATATAAAAACAAAGCATAGTAAAGAG
ATGCCATTCAAGTGTGACATTTGTCTTCTGACTTTCTCAGATACCAAAGAAGTGCAGCAACATACTCTTGTCCACCAAG
AAAGCAAAACACATCAGTGTTTGCATTGCGACCACAAGAGTTCAAACTCAAGTGATTTGAAACGACATGTAATTTCAGT
TCATACGAAAGACTATCCTCATAAGTGTGAGATGTGCGAGAAAGGCTTTCACAGGCCTTCAGAACTTAAGAAACATGT
GGCTGTCCACAAAGGTAAAAAAATGCACCAATGTAGACATTGTGACTTTAAGATTGCAGACCCATTTGTTCTAAGTCGC
CATATTCTCTCAGTTCACACAAAGGATCTTCCATTTAGGTGTAAGAGATGTAGAAAGGGATTTAGGCAACAAAATGAGC
TTAAAAAGCATATGAAGACACACAGTGGCAGGAAAGTATATCAGTGTGAGTACTGTGAGTATAGCACTACAGATGCCT
CAGGCTTTAAACGGCACGTTATTTCCATTCATACAAAAGACTATCCTCATCGGTGTGAGTACTGCAAGAAAGGCTTCCG
AAGACCTTCAGAAAAGAACCAGCACATAATG

>BmysBWm2ZFY
CATCCTTTGACTGTCTATCCTTGTATGATTTGTGGGAAAAAGTTTAAGTCGAGAGGGTTTTTGAAAAGGCACATGAAAA
ACCACCCTGAACACCTCACCAAGAAGAAGTACCGCTGTACTGACTGTGATTACACTACCAACAAGAAGATAAGTTTAC
ACAACCACCTGGAGAGCCACAAGCTGACCAGCAAGGCGGAGAAGGCCATTGAATGCGATGAGTGTGGGAAGCATTTCT
CTCATGCTGGGGCTTTGTTTACTCACAAAATGGTGCATAAGGAAAAAGGAGCTAACAAAATGCACAAGTGTAAATTCT
GTGAATACGAGACAGCTGAACAAGGGTTATTGAATCGCCACCTTTTGGCGGTCCACAGCAAGAACTTTCCTCATATATG
TGTGGAGTGCGGTAAAGGTTTTCGTCACCCGTCAGAGCTCAAAAAGCACATGCGAATCCATACTGGGGAGAAGCCGTA
CCAATGCCAGTACTGTGAATATAGGTCTGCAGACTCTTCTAATTTGAAAACTCATGTAAAAACTAAGCATAGTAAAGAG
ATGCCATTCAAGTGTGACATTTGTCTTCTGACTTTCTCAGATACCAAAGAAGTGC

>BmysBWm1ZFX
CATCCTTTGACTGTCTATCCTTGCATGATTTGTGGGAAAAAGTTTAAGTCGAGAGGTTTTTTGAAAAGGCACATGAAAA
ACCATCCTGAACACCTTACCAAGAAGAAGTACCGCTGTACTGACTGTGATTACACTACCAACAAGAAGATAAGTTTAC
ACAACCACCTGGAGAGCCACAAGCTGACCAGCAAGGCAGAGAAGGCCATCGAATGCGACGAATGTGGGAAGCATTTC
TCTCACGCTGGGGCTTTGTTTACTCACAAAATGGTGCATAAGGAAAAAGGAGCCAACAAAATGCACAAGTGTAAATTC
TGTGAATATGAGACAGCTGAACAAGGGTTGTTGAATCGCCACCTTTTGGCGGTCCACAGCAAGAACTTTCCTCATATAT
GTGTGGAGTGCGGTAAAGGTTTTCGTCACCCATCAGAGCTCAAAAAGCACATGCGAATCCATACTGGGGAGAAGCCGT
ACCAATGCCAGTACTGCGAATATAGGTCTGCAGACTCTTCTAACTTGAAAACGCATGTAAAAACTAAGCATAGTAAAG
AGATGCCATTCAAGTGTGACATTTGTCTTCTGACTTTCTCAGATACCAAAGAAGTGC

>BmysBWf1ZFX
CATCCTTTGACTGTCTATCCTTGCATGATTTGTGGGAAAAAGTTTAAGTCGAGAGGTTTTTTGAAAAGGCACATGAAAA
ACCATCCTGAACACCTTACCAAGAAGAAGTACCGCTGTACTGACTGTGATTACACTACCAACAAGAAGATAAGTTTAC
ACAACCACCTGGAGAGCCACAAGCTGACCAGCAAGGCAGAGAAGGCCATCGAATGCGACGAATGTGGGAAGCATTTC
TCTCACGCTGGGGCTTTGTTTACTCACAAAATGGTGCATAAGGAAAAAGGAGCCAACAAAATGCACAAGTGTAAATTC
TGTGAATATGAGACAGCTGAACAAGGGTTGTTGAATCGCCACCTTTTGGCGGTCCACAGCAAGAACTTTCCTCATATAT
GTGTGGAGTGCGGTAAAGGTTTTCGTCACCCATCAGAGCTCAAAAAGCACATGCGAATCCATACTGGGGAGAAGCCGT
ACCAATGCCAGTACTGCGAATATAGGTCTGCAGACTCTTCTAACTTGAAAACGCATGTAAAAACTAAGCATAGTAAAG
AGATGCCATTCAAGTGTGACATTTGTCTTCTGACTTTCTCAGATACCAAAGAAGTGC

>ErobGWm2ZFY
CATCCTTTGACTGTCTATCCTTGTATGATTTGTGGGAAAAAGTTTAAGTCGAGAGGTTTTTTGAAAAGGCACATGAAAA
ACCACCCTGAACACCTCACCAAGAAGAAGTACCGCTGTACTGACTGTGATTACACTACCAACAAGAAGATAAGTTTAC
ACAACCACCTGGAGAGCCACAAGCTGACCAGCAAGGCAGAGAAGGCCATTGAATGCGATGAGTGTGGGAAGCATTTCT
CTCACGCTGGGGCTTTGTTTACTCACAAAATGGTGCATAAGGAAAAAGGAGCTAACAAAATGCACAAGTGTAAATTCT
GTGAATATGAGACAGCTGAACAAGGGTTATTGAATCGCCACCTTTTGGCAGTCCACAGCAAGAACTTTCCTCATATATG
TGTGGAGTGCGGTAAAGGTTTTCGTCACCCGTCAGAGCTCAAAAAGCACATGCGAATCCACACTGGGGAGAAGCCGTA
CGAATGCCAGTACTGTGAATATAGGTCTGCAGACTCTTCTAATTTGAAAACTCATGTAAAAACTAAGCATAGTAAAGAG
ATGCCATTCAAGTGTGACATTTGTCTTCTGACTTTCTCAGATACCAAAGAAGTGC

>ErobGWm1ZFX
CATCCTTTGACTGTCTATCCTTGCATGATTTGTGGGAAAAAGTTTAAGTCGAGAGGTTTTTTGAAAAGGCACATGAAAA
ACCATCCTGAACACCTTACCAAGAAGAAGTACCGCTGTACTGACTGTGATTACACTACCAACAAGAAGATAAGTTTAC
ACAACCACCTGGAGAGCCACAAGCTGACCAGCAAGGCAGAGAAGGCCATCGAATGCGATGAATGTGGGAAGCATTTC
TCTCACGCTGGGGCTTTGTTTACTCACAAAATGGTGCATAAGGAAAAAGGAGCCAACAAAATGCACAAGTGTAAATTC
TGTGAATATGAGACAGCTGAACAAGGGTTGTTGAATCGCCACCTTTTGGCGGTCCACAGCAAGAACTTTCCTCATATAT
GTGTGGAGTGCGGTAAAGGTTTTCGTCACCCATCAGAGCTCAAAAAGCACATGCGAATCCATACTGGGGAGAAGCCGT
ACCAATGCCAGTACTGCGAATATAGGTCTGCAGACTCTTCTAACTTGAAAACGCATGTAAAAACTAAGCATAGTAAAG
AGATGCCATTCAAGTGTGACATTTGTCTTCTGACTTTCTCAGATACCAAAGAAGTGC

>ErobGWf1ZFX
CATCCTTTGACTGTCTATCCTTGCATGATTTGTGGGAAAAAGTTTAAGTCGAGAGGTTTTTTGAAAAGGCACATGAAAA
ACCATCCTGAACACCTTACCAAGAAGAAGTACCGCTGTACTGACTGTGATTACACTACCAACAAGAAGATAAGTTTAC
ACAACCACCTGGAGAGCCACAAGCTGACCAGCAAGGCAGAGAAGGCCATCGAATGCGATGAATGTGGGAAGCATTTC
TCTCACGCTGGGGCTTTGTTTACTCACAAAATGGTGCATAAGGAAAAAGGAGCCAACAAAATGCACAAGTGTAAATTC
TGTGAATATGAGACAGCTGAACAAGGGTTGTTGAATCGCCACCTTTTGGCGGTCCACAGCAAGAACTTTCCTCATATAT
GTGTGGAGTGCGGTAAAGGTTTTCGTCACCCATCAGAGCTCAAAAAGCACATGCGAATCCATACTGGGGAGAAGCCGT
ACCAATGCCAGTACTGCGAATATAGGTCTGCAGACTCTTCTAACTTGAAAACGCATGTAAAAACTAAGCATAGTAAAG
AGATGCCATTCAAGTGTGACATTTGTCTTCTGACTTTCTCAGATACCAAAGAAGTGC

Cebadores oligonucleótidos específicos para la identificación de machos en ballena azul

LOCUS AB108511 786 bp DNA linear
DEFINITION *Balaenoptera musculus* SRY gene for sex determining region Y
ACCESSION AB108511
AUTHORS Nishida,S., Pastene,L.A., Goto,M. and Koike,H.
TITLE SRY gene structure and phylogeny in the cetacean species
JOURNAL Mammal Study 28, 57-66 (2003)

BSRY188-211-F (5'-**ACGGTGAGGATTACAGCCCAGAGG**-3')
BSRY264-287-R (5'-**CGATCATTTGAGCCACCATTGTC**-3'),

BSRY370-393-F (5'-**GATCAAAGGCGAAAGGTGGCTCTA**-3')
BSRY500-523-R (5'-**ATTTGTCTCGGTGCATGGCTCGTA**-3')

TATTGAGGGGAGGTGTTGGGGGCGGAGAAGTACATATTTCACTGCAAAAGCTATAGTCAGTCAGTCCCTGGC
AGAAATAACCCTTGAATAGCAAGATAATTTTCGTAACGCTTACACCTTCCAATTTTGCTTCCTCACCCTTTT
TAAACGGTGCAATCATACGCTTCTGCCATGTTCAGAATTGTGA**ACGGTGAGGATTACAGCCCAGAGG**TACAG
CAACGAAATAGCCTCGACTTTGGGAAAGCCCCTTCCCTACTGTGGACG**GACAATGGTGGCTCAAATGATCG**G
TGTGAAACTGGAGGAAATGGTAGAGAGAGCGGCCAGGACCGCGTCAAGCGACCCATGAACGCTTTCATTGTG
TGGTCTCGT**GATCAAAGGCGAAAGGTGGCTCTA**GAGAATCCCCAAATGCAAAACTCAGAGATCAGTAAGCGC
TTGGGATACGACTGGAAAATGCTTACAGAAGCTGAAAAGCAGCCATTCTTCGAGGAGGCACAGAGAC**TACGA**
GCCATGCACCGAGACAAATACCCGGGCTATAAATATCGACCTCGTCGGAAGGCCAAGAGGCCACAGAAATTG
CTTCCTGCAGACTCTTCAGTACTGTGCAGCCGAATGCACATAGAGGAGACGTTGTACCCCTTCACATACAAG
GACGGTTGCGCCAAGGCCACACGTTCACGAATGGAAAGTCGGCTAAGCCACTCACAGCCCACGAACACAACC
AGCTCACTCCTGCCACAGGAGCATCGCAGCAGCTGGACAAGCCTGAGCCACAATAGGGTAACCTAG

Anexo B. Secuencias del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial de Balaenoptera musculus que definen los haplotipos de las agregaciones mexicanas.

NPBW01

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCGTGCATGTATGTACTCCCCCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCTCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW02

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTATACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCGTGCATGTATGTACTCCCCCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCTCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW03

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTATACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCGTGCATGTATGTACTCCCCCATAACCAGT
TAGTCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCTCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW04

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACCTCGTGCATGTATGTACTCCCCCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCTCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW05

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACCTCGTGCATGTATGTACTTCCCCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCT
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCTCAGATCGATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW06

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTCCGTGCATGCATGTACTTCCTCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCCCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTTCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW07

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTCCGTGCATGCATGTACTTCCTCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACTACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCCCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTTCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW08

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTCCGTGCATGCATGTACTTCCTCATAACCAGT

TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATATACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACTACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTGCATGTTCTTATGCATCCCCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW09

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTCCGTGCATGTATGTACCCCCTCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCTCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW10

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTCCGTGCATGTATGTACTTCCTCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCCCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTTCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW11

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCGTGCATGCATGTACTTCCTCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACTACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCCCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTTCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW13

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCGTGCATGTATGTACTCCCCCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCCCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCCCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW14

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCGTGCATGTATGTACTCCCCCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCCCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW15

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCGTGCATGTATGTACTCCCCCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCTCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCCCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW16

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCGTGCATGTATGTACTCCCCCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCT

CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAATAGTACATGTTCTTATGCATCCCCAGATCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW17

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCGTGCATGTATGTACTCCCCCATGACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTACATGTTCTTATGCATCCTCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCCTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

NPBW18

AGAAGCATCACACTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTATATAAACTATTCCCTGAAACATGTATATTGTACAATAACCGCAAA
GCCACAGTACTATGTCCGTATTAAAAAATAATTATCTCATTACATATTGTTATGTACTTCGTGCATGTATGTACTCCCTCATAACCAGT
TAATCAGTGTTATCCCTGTGAATATGTATACATACACATGCTATGTATAATTGTGCATTCAATTATCTTCACCACGAGCAGTTAAAGCC
CGTATTAAATTTTATTAATTTTACATATTACATAATATTTATTAATAGTACAGTAGTGCATGTTCTTATGCATCCTCAGGTCAATTTAA
ATCAAATGATTCTTATGGCCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTTGGCAGGGATCCCTC
TTCTCGCACCGGGCCCATTACTCGTGGGGGTAGCTATTTAATGATCTTTATAAGA

Anexo C. Ballenas azules fotoidentificadas en las que se identificó molecularmente el sexo y el linaje materno.

Individuo	Sexo	Haplotipo
Bm0001	hembra	NPBW08
Bm0003	hembra	NPBW01
Bm0004	hembra	NPBW01
Bm0006	hembra	NPBW01
Bm0007	hembra	NPBW06
Bm0012	macho	NPBW14
Bm0020	hembra	NPBW16
Bm0023	macho	NPBW14
Bm0035	hembra	NPBW01
Bm0040	macho	NPBW06
Bm0041	hembra	NPBW01
Bm0046	hembra	NPBW01
Bm0049	macho	NPBW01
Bm0050	hembra	NPBW06
Bm0059	hembra	NPBW16
Bm0060	macho	NPBW01
Bm0065	hembra	NPBW02
Bm0067	macho	NPBW01
Bm0074	hembra	NPBW01
Bm0099	hembra	NPBW01
Bm0100	No determinado	NPBW01
Bm0107	hembra	NPBW02
Bm0113	hembra	NPBW06
Bm0116	macho	NPBW07
Bm0117	macho	NPBW06
Bm0119	hembra	NPBW02
Bm0124	hembra	NPBW02
Bm0126	No determinado	No determinado
Bm0127	hembra	NPBW14
Bm0127	hembra	NPBW14
Bm0128	hembra	NPBW02
Bm0128	hembra	No determinado
Bm0129	hembra	NPBW02
Bm0130	hembra	NPBW14
Bm0130	hembra	NPBW14
Bm0131	hembra	NPBW01
Bm0132	No determinado	No determinado
Bm0133	macho	NPBW04
Bm0134	hembra	NPBW01
Bm0135	macho	NPBW02
Bm0136	hembra	NPBW01
Bm0137	No determinado	No determinado
Bm0141	No determinado	No determinado

Bm0142	macho	NPBW02
Bm0143	hembra	NPBW01
Bm0146	hembra	NPBW01
Bm0147	hembra	NPBW01
Bm0150	No determinado	No determinado
Bm0151	No determinado	No determinado
Bm0152	macho	NPBW14
Bm0152	No determinado	No determinado
Bm0153	macho	NPBW08
Bm0154	hembra	NPBW06
Bm0155	hembra	NPBW14
Bm0160	macho	NPBW02
Bm0162	hembra	NPBW02
Bm0164	macho	NPBW16
Bm0165	hembra	NPBW05
Bm0166	hembra	NPBW05
Bm0169	macho	NPBW01
Bm0172	hembra	NPBW06
Bm0173	hembra	NPBW01
Bm0176	No determinado	No determinado
Bm0177	macho	NPBW05
Bm0180	No determinado	No determinado
Bm0181	hembra	NPBW01
Bm0182	No determinado	No determinado
Bm0183	No determinado	No determinado
Bm0184	hembra	NPBW18
Bm0184	No determinado	No determinado
Bm0185	hembra	NPBW01
Bm0186	No determinado	No determinado
Bm0187	hembra	No determinado
Bm0188	hembra	No determinado
Bm0189	macho	No determinado
Bm0190	No determinado	No determinado
Bm0191	macho	No determinado
Bm0192	hembra	NPBW14
Bm0194	No determinado	No determinado
Bm0195	No determinado	No determinado
Bm0198	macho	NPBW01
Bm0203	No determinado	No determinado
Bm0204	No determinado	No determinado
Bm0205	No determinado	No determinado
Bm0206	macho	NPBW14
Bm0207	macho	No determinado
Bm0208	No determinado	NPBW07
Bm0209	No determinado	No determinado
Bm0211	hembra	NPBW02
Bm0213	macho	No determinado
Bm0215	macho	NPBW05

Bm0216	hembra	NPBW01
Bm0217	No determinado	No determinado
Bm0218	macho	NPBW02
Bm0219	macho	NPBW01
Bm0223	No determinado	No determinado
Bm0224	hembra	NPBW01
Bm0225	macho	NPBW01
Bm0226	hembra	No determinado
Bm0227	macho	NPBW14
Bm0228	hembra	NPBW01
Bm0229	macho	NPBW06
Bm0230	hembra	NPBW02
Bm0235	hembra	NPBW01
Bm0237	hembra	NPBW06
Bm0238	macho	NPBW01
Bm0239	hembra	NPBW01
Bm0240	macho	NPBW01
Bm0247	hembra	NPBW18
Bm0248	hembra	NPBW18
Bm0249	macho	NPBW14
Bm0250	hembra	NPBW01
Bm0251	hembra	NPBW05
Bm0252	macho	NPBW01
Bm0253	hembra	NPBW01
Bm0254	hembra	NPBW01
Bm0255	macho	NPBW01
Bm0256	hembra	NPBW14
Bm0258	macho	NPBW13
Bm0266	hembra	NPBW02
Bm0267	hembra	NPBW18
Bm0269	macho	NPBW14
Bm0270	No determinado	NPBW01
Bm0271	macho	NPBW01
Bm0276	hembra	NPBW01
Bm0278	macho	NPBW14
Bm0279	macho	NPBW01
Bm0281	No determinado	NPBW01
Bm0282	hembra	NPBW01
Bm0283	macho	NPBW01
Bm0284	hembra	NPBW01
Bm0286	hembra	NPBW01
Bm0287	hembra	NPBW01
Bm0288	macho	NPBW01
Bm0289	macho	NPBW01
Bm0290	macho	NPBW01
Bm0293	macho	NPBW01
Bm0297	No determinado	NPBW01
Bm0298	hembra	NPBW16

Bm0299	hembra	NPBW16
Bm0300	hembra	NPBW18
Bm0301	macho	NPBW01
Bm0303	macho	NPBW07
Bm0304	macho	NPBW07
Bm0307	macho	NPBW02
Bm0309	hembra	NPBW01
Bm0310	hembra	NPBW06
Bm0311	hembra	NPBW06
Bm0312	macho	NPBW07
Bm0313	macho	NPBW16
Bm0321	macho	NPBW01
Bm0327	No determinado	NPBW16
Bm0328	macho	NPBW18
Bm0330	hembra	NPBW16
Bm0332	macho	NPBW14
Bm0334	No determinado	No determinado
Bm0335	macho	NPBW14
Bm0337	macho	NPBW01
Bm0338	hembra	NPBW15
Bm0340	macho	NPBW06
Bm0341	macho	NPBW06
Bm0342	hembra	NPBW01
Bm0343	macho	NPBW01
Bm0345	hembra	NPBW01
Bm0346	hembra	NPBW02
Bm0346	macho	NPBW09
Bm0346	hembra	NPBW17
Bm0348	macho	NPBW14
Bm0350	hembra	NPBW16
Bm0351	macho	NPBW01
Bm0352	No determinado	NPBW06
Bm0353	macho	NPBW02
Bm0354	hembra	NPBW14
Bm0355	macho	NPBW01
Bm0356	macho	NPBW01
Bm0358	macho	NPBW16
Bm0362	macho	NPBW16
Bm0363	macho	NPBW01
Bm0364	macho	NPBW02
Bm0365	macho	NPBW14
Bm0366	No determinado	NPBW01
Bm0368	macho	NPBW07
Bm0370	hembra	NPBW01
Bm0372	hembra	NPBW14
Bm0374	macho	NPBW13
Bm0375	hembra	NPBW01
Bm0376	macho	NPBW01

Bm0377	hembra	NPBW14
Bm0379	hembra	NPBW10
Bm0380	hembra	NPBW14
Bm0383	macho	NPBW18
Bm0384	hembra	NPBW01
Bm0385	hembra	NPBW14
Bm0387	macho	NPBW14
Bm0388	hembra	NPBW01
Bm0389	No determinado	NPBW11
Bm0391	hembra	NPBW10
Bm0393	hembra	NPBW01
Bm0394	macho	NPBW01
Bm0395	hembra	NPBW01
Bm0396	macho	NPBW14
Bm0397	hembra	NPBW07
Bm0398	hembra	NPBW16
Bm0399	hembra	NPBW01
Bm0404	hembra	NPBW05
Bm0405	macho	NPBW05
Bm0409	hembra	NPBW01
Bm0409	hembra	NPBW01
Bm0412	No determinado	No determinado
Bm0413	macho	NPBW06
Bm0414	macho	NPBW07
Bm0415	hembra	NPBW02
Bm0418	macho	NPBW01
Bm0419	hembra	NPBW02
Bm0420	hembra	NPBW02
Bm0421	No determinado	No determinado
Bm0422	macho	NPBW05
Bm0423	macho	NPBW01
Bm0424	hembra	NPBW18
Bm0425	macho	NPBW18
Bm0445	macho	NPBW14
Bm0446	macho	NPBW02
Bm0447	macho	NPBW03
Bm0448	macho	NPBW07
Bm0449	hembra	NPBW01
Bm0450	hembra	NPBW01
Bm0451	hembra	NPBW03
Nuevo 01	To Do	No determinado
Nuevo 10	macho	NPBW06
Nuevo 02	To Do	No determinado
Nuevo 03	macho	NPBW06
Nuevo 04	macho	NPBW14
Nuevo 05	hembra	NPBW06
Nuevo 06	macho	NPBW01
Nuevo 07	hembra	NPBW01

Nuevo 08	To Do	No determinado
Nuevo 09	To Do	No determinado
No Asignado 01	hembra	NPBW01
No Asignado 02	hembra	NPBW02
No Asignado 03	hembra	NPBW02
No Asignado 04	macho	NPBW16
No Asignado 05	No determinado	No determinado
No Asignado 06	No determinado	No determinado
No Asignado 07	No determinado	No determinado
No Asignado 08	No determinado	No determinado
No Asignado 09	hembra	NPBW01
No Asignado 10	No determinado	NPBW01
No Asignado 11	No determinado	No determinado
No Asignado 12	macho	NPBW15
No Asignado 13	No determinado	NPBW01
No Asignado 14	No determinado	No determinado
No Asignado 15	hembra	NPBW14
No Asignado 16	hembra	NPBW01
No Asignado 17	No determinado	No determinado
No Asignado 18	hembra	NPBW07
No Asignado 19	macho	NPBW01
No Asignado 20	No determinado	No determinado
No Asignado 21	macho	No determinado
No Asignado 22	No determinado	No determinado
No Asignado 23	hembra	NPBW01
No Asignado 24	macho	No determinado
No Asignado 25	No determinado	NPBW04
No Asignado 26	macho	No determinado
No Asignado 27	hembra	NPBW01
No Asignado 28	macho	No determinado
No Asignado 29	hembra	NPBW01
No Asignado 3th Bm0024	hembra	No determinado
No Asignado A21	hembra	NPBW14
No Asignado Junio	No determinado	No determinado
No Asignado EVM 1	hembra	NPBW16
No Asignado EVM 2	hembra	NPBW14
No Asignado P12	No determinado	NPBW09
No Asignado P15	macho	NPBW17
No Asignado P15 A	hembra	No determinado
No Asignado v	hembra	NPBW07
No Asignado x	macho	NPBW14

Anexo D. Secuencias homólogas para la región control mitocondrial empleadas en el análisis filogenético para todas las especies de misticetos reportadas en el GeneBank.

	Fuente	No. Acceso al GeneBank	Especie
1	Arnason et al.1993	X72197.1	*Balaena mysticetus*
2	Rooney et al. 2001	AF355204.1	*Balaena mysticetus*
3	Rooney et al. 2001	AF355205.1	*Balaena mysticetus*
4	Rooney et al. 2001	AF355206.1	*Balaena mysticetus*
5	Rooney et al. 2001	AF355207.1	*Balaena mysticetus*
6	Rooney et al. 2001	AF355208.1	*Balaena mysticetus*
7	Rooney et al. 2001	AF355209.1	*Balaena mysticetus*
8	Rooney et al. 2001	AF355210.1	*Balaena mysticetus*
9	Rooney et al. 2001	AF355211.1	*Balaena mysticetus*
10	Rooney et al. 2001	AF355212.1	*Balaena mysticetus*
11	Rooney et al. 2001	AF355213.1	*Balaena mysticetus*
12	Rooney et al. 2001	AF355214.1	*Balaena mysticetus*
13	Rooney et al. 2001	AF355215.1	*Balaena mysticetus*
14	Rooney et al. 2001	AF355216.1	*Balaena mysticetus*
15	Rooney et al. 2001	AF355217.1	*Balaena mysticetus*
16	Rooney et al. 2001	AF355218.1	*Balaena mysticetus*
17	Rooney et al. 2001	AF355219.1	*Balaena mysticetus*
18	Rooney et al. 2001	AF355220.1	*Balaena mysticetus*
19	Rooney et al. 2001	AF355221.1	*Balaena mysticetus*
20	Rooney et al. 2001	AF355222.1	*Balaena mysticetus*
21	Rooney et al. 2001	AF355223.1	*Balaena mysticetus*
22	Rooney et al. 2001	AF355224.1	*Balaena mysticetus*
23	Rooney et al. 2001	AF355225.1	*Balaena mysticetus*
24	Rooney et al. 2001	AF355226.1	*Balaena mysticetus*
25	Rooney et al. 2001	AF355227.1	*Balaena mysticetus*
26	Rooney et al. 2001	AF355228.1	*Balaena mysticetus*
27	Rooney et al. 2001	AF355229.1	*Balaena mysticetus*
28	Rooney et al. 2001	AF355230.1	*Balaena mysticetus*
29	Rooney et al. 2001	AF355231.1	*Balaena mysticetus*
30	Rooney et al. 2001	AF355232.1	*Balaena mysticetus*
31	Rooney et al. 2001	AF355233.1	*Balaena mysticetus*
32	Rooney et al. 2001	AF355234.1	*Balaena mysticetus*
33	Rooney et al. 2001	AF355235.1	*Balaena mysticetus*
34	Rooney et al. 2001	AF355236.1	*Balaena mysticetus*
35	Rooney et al. 2001	AF355237.1	*Balaena mysticetus*
36	Rooney et al. 2001	AF355238.1	*Balaena mysticetus*
37	Rooney et al. 2001	AF355239.1	*Balaena mysticetus*
38	Rooney et al. 2001	AF355240.1	*Balaena mysticetus*
39	Rooney et al. 2001	AF355241.1	*Balaena mysticetus*
40	Rooney et al. 2001	AF355242.1	*Balaena mysticetus*
41	Rooney et al. 2001	AF355243.1	*Balaena mysticetus*
42	Rooney et al. 2001	AF355244.1	*Balaena mysticetus*
43	Rooney et al. 2001	AF355245.1	*Balaena mysticetus*

44	Rooney et al. 2001	AF355246.1	*Balaena mysticetus*
45	Rooney et al. 2001	AF355247.1	*Balaena mysticetus*
46	Rooney et al. 2001	AF355248.1	*Balaena mysticetus*
47	Rooney et al. 2001	AF355249.1	*Balaena mysticetus*
48	Rooney et al. 2001	AF355250.1	*Balaena mysticetus*
49	Rooney et al. 2001	AF355251.1	*Balaena mysticetus*
50	Rooney et al. 2001	AF355252.1	*Balaena mysticetus*
51	Rooney et al. 2001	AF355253.1	*Balaena mysticetus*
52	Rooney et al. 2001	AF355254.1	*Balaena mysticetus*
53	Rooney et al. 2001	AF355255.1	*Balaena mysticetus*
54	Rooney et al. 2001	AF355256.1	*Balaena mysticetus*
55	Rooney et al. 2001	AF355257.1	*Balaena mysticetus*
56	Rooney et al. 2001	AF355258.1	*Balaena mysticetus*
57	Rooney et al. 2001	AF355259.1	*Balaena mysticetus*
58	Rooney et al. 2001	AF355260.1	*Balaena mysticetus*
59	Rooney et al. 2001	AF355261.1	*Balaena mysticetus*
60	Rooney et al. 2001	AF355262.1	*Balaena mysticetus*
61	Rooney et al. 2001	AF355263.1	*Balaena mysticetus*
62	Rooney et al. 2001	AF355264.1	*Balaena mysticetus*
63	Rooney et al. 2001	AF355265.1	*Balaena mysticetus*
64	Rooney et al. 2001	AF355266.1	*Balaena mysticetus*
65	Rooney et al. 2001	AF355267.1	*Balaena mysticetus*
66	Rooney et al. 2001	AF355268.1	*Balaena mysticetus*
67	Rooney et al. 2001	AF355269.1	*Balaena mysticetus*
68	Rooney et al. 2001	AF355270.1	*Balaena mysticetus*
69	Rooney et al. 2001	AF355271.1	*Balaena mysticetus*
70	Andersen et al. 2003	AF487467.1	*Balaenoptera acutorostrata*
71	Andersen et al. 2003	AF487468.1	*Balaenoptera acutorostrata*
72	Andersen et al. 2003	AF487469.1	*Balaenoptera acutorostrata*
73	Andersen et al. 2003	AF487470.1	*Balaenoptera acutorostrata*
74	Andersen et al. 2003	AF487471.1	*Balaenoptera acutorostrata*
75	Andersen et al. 2003	AF487472.1	*Balaenoptera acutorostrata*
76	Andersen et al. 2003	AF487473.1	*Balaenoptera acutorostrata*
77	Andersen et al. 2003	AF487474.1	*Balaenoptera acutorostrata*
78	Andersen et al. 2003	AF487475.1	*Balaenoptera acutorostrata*
79	Andersen et al. 2003	AF487476.1	*Balaenoptera acutorostrata*
80	Andersen et al. 2003	AF487477.1	*Balaenoptera acutorostrata*
81	Andersen et al. 2003	AF487478.1	*Balaenoptera acutorostrata*
82	Andersen et al. 2003	AF487479.1	*Balaenoptera acutorostrata*
83	Andersen et al. 2003	AF487480.1	*Balaenoptera acutorostrata*
84	Andersen et al. 2003	AF487481.1	*Balaenoptera acutorostrata*
85	Andersen et al. 2003	AF487482.1	*Balaenoptera acutorostrata*
86	Andersen et al. 2003	AF487483.1	*Balaenoptera acutorostrata*
87	Andersen et al. 2003	AF487484.1	*Balaenoptera acutorostrata*
88	Andersen et al. 2003	AF487485.1	*Balaenoptera acutorostrata*
89	Andersen et al. 2003	AF487486.1	*Balaenoptera acutorostrata*
90	Andersen et al. 2003	AF487487.1	*Balaenoptera acutorostrata*
91	Andersen et al. 2003	AF487488.1	*Balaenoptera acutorostrata*

92	Andersen et al. 2003	AF487489.1	*Balaenoptera acutorostrata*
93	Andersen et al. 2003	AF487490.1	*Balaenoptera acutorostrata*
94	Andersen et al. 2003	AF487491.1	*Balaenoptera acutorostrata*
95	Arnason et al.1993	X72006.1	*Balaenoptera acutorostrata*
96	Bakke et al. Unpublished	X87773.1	*Balaenoptera acutorostrata*
97	Bakke et al. Unpublished	X87774.1	*Balaenoptera acutorostrata*
98	Grohmann et al. Unpublished	AJ226093.1	*Balaenoptera acutorostrata*
99	Grohmann et al. Unpublished	AJ226094.1	*Balaenoptera acutorostrata*
100	Grohmann et al. Unpublished	AJ226095.1	*Balaenoptera acutorostrata*
101	Grohmann et al. Unpublished	AJ226096.1	*Balaenoptera acutorostrata*
102	Grohmann et al. Unpublished	AJ226097.1	*Balaenoptera acutorostrata*
103	Grohmann et al. Unpublished	AJ226098.1	*Balaenoptera acutorostrata*
104	Grohmann et al. Unpublished	AJ226099.1	*Balaenoptera acutorostrata*
105	Grohmann et al. Unpublished	AJ226100.1	*Balaenoptera acutorostrata*
106	Grohmann et al. Unpublished	AJ226101.1	*Balaenoptera acutorostrata*
107	Grohmann et al. Unpublished	AJ226102.1	*Balaenoptera acutorostrata*
108	Grohmann et al. Unpublished	AJ226103.1	*Balaenoptera acutorostrata*
109	Grohmann et al. Unpublished	AJ226104.1	*Balaenoptera acutorostrata*
110	Grohmann et al. Unpublished	AJ226105.1	*Balaenoptera acutorostrata*
111	Grohmann et al. Unpublished	AJ226106.1	*Balaenoptera acutorostrata*
112	Grohmann et al. Unpublished	AJ226107.1	*Balaenoptera acutorostrata*
113	Grohmann et al. Unpublished	AJ226108.1	*Balaenoptera acutorostrata*
114	Grohmann et al. Unpublished	AJ226109.1	*Balaenoptera acutorostrata*
115	Grohmann et al. Unpublished	AJ226110.1	*Balaenoptera acutorostrata*
116	Grohmann et al. Unpublished	AJ226111.1	*Balaenoptera acutorostrata*
117	Grohmann et al. Unpublished	AJ226112.1	*Balaenoptera acutorostrata*
118	Grohmann et al. Unpublished	AJ226113.1	*Balaenoptera acutorostrata*
119	Grohmann et al. Unpublished	AJ226114.1	*Balaenoptera acutorostrata*
120	Grohmann et al. Unpublished	AJ226115.1	*Balaenoptera acutorostrata*
121	Grohmann et al. Unpublished	AJ226116.1	*Balaenoptera acutorostrata*
122	Grohmann et al. Unpublished	AJ226117.1	*Balaenoptera acutorostrata*
123	Grohmann et al. Unpublished	AJ226119.1	*Balaenoptera acutorostrata*
124	Grohmann et al. Unpublished	AJ226121.1	*Balaenoptera acutorostrata*
125	Grohmann et al. Unpublished	AJ226122.1	*Balaenoptera acutorostrata*
126	Grohmann et al. Unpublished	Y17160.1	*Balaenoptera acutorostrata*
127	Mace 1999	AY230267.1	*Balaenoptera acutorostrata*
128	McEwing Unpublished	AY352278.1	*Balaenoptera acutorostrata*
129	McEwing Unpublished	AY352279.1	*Balaenoptera acutorostrata*
130	McEwing Unpublished	AY352280.1	*Balaenoptera acutorostrata*
131	Arnason et al.1993	X72195.1	*Balaenoptera borealis*
132	McEwing Unpublished	AY340947	*Balaenoptera borealis*
133	McEwing Unpublished	AY340957	*Balaenoptera borealis*
134	Arnason et al.1993	X72196.1	*Balaenoptera edeni*
135	Wada et al. 2003	AB116099.1	*Balaenoptera edeni*
136	Wada et al. 2003	AF398372.1	*Balaenoptera edeni*
137	Yang et al. Unpublished	AF398372	*Balaenoptera edeni*
138	Yoshida et al. 1999	AF146378	*Balaenoptera edeni*
139	Yoshida et al. 1999	AF146379	*Balaenoptera edeni*

140	Yoshida et al. 1999	AF146380	*Balaenoptera edeni*
141	Yoshida et al. 1999	AF146381	*Balaenoptera edeni*
142	Yoshida et al. 1999	AF146382	*Balaenoptera edeni*
143	Yoshida et al. 1999	AF146383	*Balaenoptera edeni*
144	Yoshida et al. 1999	AF146384	*Balaenoptera edeni*
145	Yoshida et al. 1999	AF146385	*Balaenoptera edeni*
146	Yoshida et al. 1999	AF146386	*Balaenoptera edeni*
147	Yoshida et al. 1999	AF146387	*Balaenoptera edeni*
148	Yoshida et al. 1999	AF146388	*Balaenoptera edeni*
149	Yoshida et al. 1999	AF146389	*Balaenoptera edeni*
150	Arnason et al.1993	X72204.1	*Balaenoptera musculus*
151	Arnason y Gullberg 1993	NC_001601.1	*Balaenoptera musculus*
152	Baker et al. 1996	L35607	*Balaenoptera musculus*
153	Baker et al. 1996	L35608	*Balaenoptera musculus*
154	Borsa et al. Unpublished	AY235201	*Balaenoptera musculus*
155	McEwing Unpublished	AY340958	*Balaenoptera musculus*
156	McEwing Unpublished	AY390265	*Balaenoptera musculus*
157	McEwing Unpublished	AY390266	*Balaenoptera musculus*
158	McEwing Unpublished	AY390267	*Balaenoptera musculus*
159	McEwing Unpublished	AY390268	*Balaenoptera musculus*
160	McEwing Unpublished	AY390269	*Balaenoptera musculus*
161	McEwing Unpublished	AY390270	*Balaenoptera musculus*
162	McEwing Unpublished	AY390271	*Balaenoptera musculus*
163	McEwing Unpublished	AY390272	*Balaenoptera musculus*
164	McEwing Unpublished	AY390273	*Balaenoptera musculus*
165	McEwing Unpublished	AY390274	*Balaenoptera musculus*
166	McEwing Unpublished	AY390275	*Balaenoptera musculus*
167	McEwing Unpublished	AY390276	*Balaenoptera musculus*
168	McEwing Unpublished	AY390277	*Balaenoptera musculus*
169	Arnason et al. 1991	NC_001321.1	*Balaenoptera physalus*
170	Arnason et al.1993	X61145.1	*Balaenoptera physalus*
171	Berube et al. 1998	AF119956	*Balaenoptera physalus*
172	Berube et al. 1998	AF119957	*Balaenoptera physalus*
173	Berube et al. 1998	AF119958	*Balaenoptera physalus*
174	Berube et al. 1998	AF119959	*Balaenoptera physalus*
175	Berube et al. 1998	AF119960	*Balaenoptera physalus*
176	Berube et al. 1998	AF119961	*Balaenoptera physalus*
177	Berube et al. 1998	AF119962	*Balaenoptera physalus*
178	Berube et al. 1998	AF119963	*Balaenoptera physalus*
179	Berube et al. 1998	AF119964	*Balaenoptera physalus*
180	Berube et al. 1998	AF119965	*Balaenoptera physalus*
181	Berube et al. 1998	AF119966	*Balaenoptera physalus*
182	Berube et al. 1998	AF119967	*Balaenoptera physalus*
183	Berube et al. 1998	AF119968	*Balaenoptera physalus*
184	Berube et al. 1998	AF119969	*Balaenoptera physalus*
185	Berube et al. 1998	AF119970	*Balaenoptera physalus*
186	Berube et al. 1998	AF119971	*Balaenoptera physalus*
187	Berube et al. 1998	AF119972	*Balaenoptera physalus*

188	Berube et al. 1998	AF119973	*Balaenoptera physalus*
189	Berube et al. 1998	AF119974	*Balaenoptera physalus*
190	Berube et al. 1998	AF119975	*Balaenoptera physalus*
191	Berube et al. 1998	AF119976	*Balaenoptera physalus*
192	Berube et al. 1998	AF119977	*Balaenoptera physalus*
193	Berube et al. 1998	AF119978	*Balaenoptera physalus*
194	Berube et al. 1998	AF119979	*Balaenoptera physalus*
195	Berube et al. 1998	AF119980	*Balaenoptera physalus*
196	Berube et al. 1998	AF119981	*Balaenoptera physalus*
197	Berube et al. 1998	AF119982	*Balaenoptera physalus*
198	Berube et al. 1998	AF119983	*Balaenoptera physalus*
199	Berube et al. 1998	AF119984	*Balaenoptera physalus*
200	Berube et al. 1998	AF119985	*Balaenoptera physalus*
201	Berube et al. 1998	AF119986	*Balaenoptera physalus*
202	Berube et al. 1998	AF119987	*Balaenoptera physalus*
203	Berube et al. 1998	AF119988	*Balaenoptera physalus*
204	Berube et al. 1998	AF119989	*Balaenoptera physalus*
205	Berube et al. 1998	AF119990	*Balaenoptera physalus*
206	Berube et al. 1998	AF119991	*Balaenoptera physalus*
207	Berube et al. 1998	AF119992	*Balaenoptera physalus*
208	Berube et al. 1998	AF119993	*Balaenoptera physalus*
209	Berube et al. 1998	AF119994	*Balaenoptera physalus*
210	Berube et al. 1998	AF119995	*Balaenoptera physalus*
211	Berube et al. 1998	AF119996	*Balaenoptera physalus*
212	Berube et al. 1998	AF119997	*Balaenoptera physalus*
213	Berube et al. 1998	AF119998	*Balaenoptera physalus*
214	Berube et al. 1998	AF119999	*Balaenoptera physalus*
215	Berube et al. 1998	AF120000	*Balaenoptera physalus*
216	Berube et al. 1998	AF120001	*Balaenoptera physalus*
217	Berube et al. 1998	AF120002	*Balaenoptera physalus*
218	Berube et al. 1998	AF120003	*Balaenoptera physalus*
219	Berube et al. 1998	AF120004	*Balaenoptera physalus*
220	Berube et al. 1998	AF120005	*Balaenoptera physalus*
221	Berube et al. 1998	AF120006	*Balaenoptera physalus*
222	McEwing Unpublished	AY340948.1	*Balaenoptera physalus*
223	McEwing Unpublished	AY340949.1	*Balaenoptera physalus*
224	McEwing Unpublished	AY340950.1	*Balaenoptera physalus*
225	McEwing Unpublished	AY340951.1	*Balaenoptera physalus*
226	McEwing Unpublished	AY340952.1	*Balaenoptera physalus*
227	McEwing Unpublished	AY340953.1	*Balaenoptera physalus*
228	McEwing Unpublished	AY340954.1	*Balaenoptera physalus*
229	McEwing Unpublished	AY340955.1	*Balaenoptera physalus*
230	McEwing Unpublished	AY340955.1	*Balaenoptera physalus*
231	McEwing Unpublished	AY340956.1	*Balaenoptera physalus*
232	McEwing Unpublished	AY343929.1	*Balaenoptera physalus*
233	McEwing Unpublished	AY343930.1	*Balaenoptera physalus*
234	Pierce et al. 2004	AY582748	*Balaenoptera physalus*
235	Arnason et al.1993	X72198.1	*Caperea marginata*

236	Arnason et al.1993	X72200.1	*Eschrichtius robustus*
237	Goerlitz et al. 2003	AY514457.1	*Eschrichtius robustus*
238	Goerlitz et al. 2003	AY514458.1	*Eschrichtius robustus*
239	Goerlitz et al. 2003	AY514459.1	*Eschrichtius robustus*
240	Goerlitz et al. 2003	AY514460.1	*Eschrichtius robustus*
241	Goerlitz et al. 2003	AY514461.1	*Eschrichtius robustus*
242	Goerlitz et al. 2003	AY514462.1	*Eschrichtius robustus*
243	Goerlitz et al. 2003	AY514463.1	*Eschrichtius robustus*
244	Goerlitz et al. 2003	AY514464.1	*Eschrichtius robustus*
245	Goerlitz et al. 2003	AY514465.1	*Eschrichtius robustus*
246	Goerlitz et al. 2003	AY514466.1	*Eschrichtius robustus*
247	Goerlitz et al. 2003	AY514467.1	*Eschrichtius robustus*
248	Goerlitz et al. 2003	AY514468.1	*Eschrichtius robustus*
249	Goerlitz et al. 2003	AY514469.1	*Eschrichtius robustus*
250	Goerlitz et al. 2003	AY514470.1	*Eschrichtius robustus*
251	Goerlitz et al. 2003	AY514471.1	*Eschrichtius robustus*
252	Goerlitz et al. 2003	AY514472.1	*Eschrichtius robustus*
253	Goerlitz et al. 2003	AY514473.1	*Eschrichtius robustus*
254	Goerlitz et al. 2003	AY514474.1	*Eschrichtius robustus*
255	Goerlitz et al. 2003	AY514475.1	*Eschrichtius robustus*
256	Goerlitz et al. 2003	AY514476.1	*Eschrichtius robustus*
257	Goerlitz et al. 2003	AY514477.1	*Eschrichtius robustus*
258	Goerlitz et al. 2003	AY514478.1	*Eschrichtius robustus*
259	Goerlitz et al. 2003	AY514479.1	*Eschrichtius robustus*
260	Goerlitz et al. 2003	AY514480.1	*Eschrichtius robustus*
261	Goerlitz et al. 2003	AY514481.1	*Eschrichtius robustus*
262	Goerlitz et al. 2003	AY514482.1	*Eschrichtius robustus*
263	Goerlitz et al. 2003	AY514483.1	*Eschrichtius robustus*
264	Goerlitz et al. 2003	AY514484.1	*Eschrichtius robustus*
265	Goffredi et al. Unpublished	AY238943.1	*Eschrichtius robustus*
266	LeDuc et al. Unpublished	AF326789	*Eschrichtius robustus*
267	LeDuc et al. Unpublished	AF326790	*Eschrichtius robustus*
268	LeDuc et al. Unpublished	AF326791	*Eschrichtius robustus*
269	LeDuc et al. Unpublished	AF326792	*Eschrichtius robustus*
270	LeDuc et al. Unpublished	AF326793	*Eschrichtius robustus*
271	LeDuc et al. Unpublished	AF326794	*Eschrichtius robustus*
272	LeDuc et al. Unpublished	AF326795	*Eschrichtius robustus*
273	LeDuc et al. Unpublished	AF326796	*Eschrichtius robustus*
274	LeDuc et al. Unpublished	AF326797	*Eschrichtius robustus*
275	LeDuc et al. Unpublished	AF326798	*Eschrichtius robustus*
276	LeDuc et al. Unpublished	AF326799	*Eschrichtius robustus*
277	LeDuc et al. Unpublished	AF326800	*Eschrichtius robustus*
278	LeDuc et al. Unpublished	AF326801	*Eschrichtius robustus*
279	LeDuc et al. Unpublished	AF326802	*Eschrichtius robustus*
280	LeDuc et al. Unpublished	AF326803	*Eschrichtius robustus*
281	LeDuc et al. Unpublished	AF326804	*Eschrichtius robustus*
282	LeDuc et al. Unpublished	AF326805	*Eschrichtius robustus*
283	LeDuc et al. Unpublished	AF326806	*Eschrichtius robustus*

284	LeDuc et al. Unpublished	AF326807	*Eschrichtius robustus*
285	LeDuc et al. Unpublished	AF326808	*Eschrichtius robustus*
286	LeDuc et al. Unpublished	AF326809	*Eschrichtius robustus*
287	LeDuc et al. Unpublished	AF326810	*Eschrichtius robustus*
288	LeDuc et al. Unpublished	AF326811	*Eschrichtius robustus*
289	LeDuc et al. Unpublished	AF326812	*Eschrichtius robustus*
290	LeDuc et al. Unpublished	AF326813	*Eschrichtius robustus*
291	LeDuc et al. Unpublished	AF326814	*Eschrichtius robustus*
292	LeDuc et al. Unpublished	AF326815	*Eschrichtius robustus*
293	LeDuc et al. Unpublished	AF326816	*Eschrichtius robustus*
294	LeDuc et al. Unpublished	AF326817	*Eschrichtius robustus*
295	LeDuc et al. Unpublished	AF326818	*Eschrichtius robustus*
296	LeDuc et al. Unpublished	AF326819	*Eschrichtius robustus*
297	LeDuc et al. Unpublished	AF326820	*Eschrichtius robustus*
298	LeDuc et al. Unpublished	AF326821	*Eschrichtius robustus*
299	LeDuc et al. Unpublished	AF326822	*Eschrichtius robustus*
300	LeDuc et al. Unpublished	AF326823	*Eschrichtius robustus*
301	LeDuc et al. Unpublished	AF326824	*Eschrichtius robustus*
302	Steeves et al. Unpublished	AF369762.1	*Eschrichtius robustus*
303	Steeves et al. Unpublished	AF369763.1	*Eschrichtius robustus*
304	Steeves et al. Unpublished	AF369764.1	*Eschrichtius robustus*
305	Steeves et al. Unpublished	AF369765.1	*Eschrichtius robustus*
306	Steeves et al. Unpublished	AF369766.1	*Eschrichtius robustus*
307	Steeves et al. Unpublished	AF369767.1	*Eschrichtius robustus*
308	Steeves et al. Unpublished	AF369768.1	*Eschrichtius robustus*
309	Steeves et al. Unpublished	AF369769.1	*Eschrichtius robustus*
310	Steeves et al. Unpublished	AF369770.1	*Eschrichtius robustus*
311	Steeves et al. Unpublished	AF369771.1	*Eschrichtius robustus*
312	Steeves et al. Unpublished	AF369772.1	*Eschrichtius robustus*
313	Steeves et al. Unpublished	AF369773.1	*Eschrichtius robustus*
314	Steeves et al. Unpublished	AF369774.1	*Eschrichtius robustus*
315	Steeves et al. Unpublished	AF369775.1	*Eschrichtius robustus*
316	Steeves et al. Unpublished	AF369776.1	*Eschrichtius robustus*
317	Steeves et al. Unpublished	AF369777.1	*Eschrichtius robustus*
318	Steeves et al. Unpublished	AF369778.1	*Eschrichtius robustus*
319	Steeves et al. Unpublished	AF369779.1	*Eschrichtius robustus*
320	Steeves et al. Unpublished	AF369780.1	*Eschrichtius robustus*
321	Steeves et al. Unpublished	AF369781.1	*Eschrichtius robustus*
322	Steeves et al. Unpublished	AF369782.1	*Eschrichtius robustus*
323	Steeves et al. Unpublished	AF369783.1	*Eschrichtius robustus*
324	Steeves et al. Unpublished	AF369784.1	*Eschrichtius robustus*
325	Steeves et al. Unpublished	AF369785.1	*Eschrichtius robustus*
326	McEwing Unpublished	AY395733.2	*Eubalaena glacialis*
327	McEwing Unpublished	AY395734.1	*Eubalaena glacialis*
328	Arnason et al.1993	X72199.1	*Eubalena glacialis*
329	Arnason et al.1993	X72202.1	*Megaptera novaeangliae*
330	Baker et al. 1993	AF068067	*Megaptera novaeangliae*
331	Baker et al. 1993	AF068068	*Megaptera novaeangliae*

332	Baker et al. 1993	AF068069	*Megaptera novaeangliae*
333	Baker et al. 1993	AF068070	*Megaptera novaeangliae*
334	Baker et al. 1993	AF068071	*Megaptera novaeangliae*
335	Baker et al. 1993	AF068072	*Megaptera novaeangliae*
336	Baker et al. 1993	AF068073	*Megaptera novaeangliae*
337	Baker et al. 1993	AF068074	*Megaptera novaeangliae*
338	Baker et al. 1993	AF068075	*Megaptera novaeangliae*
339	Baker et al. 1993	AF068076	*Megaptera novaeangliae*
340	Baker et al. 1993	AF068077	*Megaptera novaeangliae*
341	Baker et al. 1993	AF068078	*Megaptera novaeangliae*
342	Baker et al. 1993	AF068079	*Megaptera novaeangliae*
343	Baker et al. 1993	AF068080	*Megaptera novaeangliae*
344	Baker et al. 1993	AF068081	*Megaptera novaeangliae*
345	Baker et al. 1993	AF068082	*Megaptera novaeangliae*
346	Baker et al. 1993	AF068083	*Megaptera novaeangliae*
347	Baker et al. 1993	AF068084	*Megaptera novaeangliae*
348	Baker et al. 1993	AF068085	*Megaptera novaeangliae*
349	Baker et al. 1993	AF068086	*Megaptera novaeangliae*
350	Baker et al. 1993	AF068087	*Megaptera novaeangliae*
351	Baker et al. 1993	AF068088	*Megaptera novaeangliae*
352	Baker et al. 1993	AF068089	*Megaptera novaeangliae*
353	Baker et al. 1993	AF068090	*Megaptera novaeangliae*
354	Baker et al. 1993	AF068091	*Megaptera novaeangliae*
355	Baker et al. 1993	AF068092	*Megaptera novaeangliae*
356	Baker et al. 1993	AF068093	*Megaptera novaeangliae*
357	Baker et al. 1993	AF068094	*Megaptera novaeangliae*
358	Baker et al. 1993	AF068095	*Megaptera novaeangliae*
359	Baker et al. 1993	AF068096	*Megaptera novaeangliae*
360	Baker et al. 1993	AF068097	*Megaptera novaeangliae*
361	Baker et al. 1993	AF068098	*Megaptera novaeangliae*
362	Baker et al. 1993	AF068099	*Megaptera novaeangliae*
363	Baker et al. 1993	AF068100	*Megaptera novaeangliae*
364	Baker et al. 1993	AF068101	*Megaptera novaeangliae*
365	Baker et al. 1993	AF068102	*Megaptera novaeangliae*
366	Baker et al. 1993	AF068103	*Megaptera novaeangliae*
367	Baker et al. 1993	AF068104	*Megaptera novaeangliae*
368	Baker et al. 1993	AF068105	*Megaptera novaeangliae*
369	Baker et al. 1993	AF068106	*Megaptera novaeangliae*
370	Baker et al. 1993	AF068107	*Megaptera novaeangliae*
371	Baker et al. 1993	AF068108	*Megaptera novaeangliae*
372	Baker et al. 1993	AF068109	*Megaptera novaeangliae*
373	Baker et al. 1993	AF068110	*Megaptera novaeangliae*
374	Baker et al. 1993	AF068111	*Megaptera novaeangliae*
375	Baker et al. 1993	AF068112	*Megaptera novaeangliae*
376	Baker et al. 1993	AF068113	*Megaptera novaeangliae*
377	Baker et al. 1993	AF068114	*Megaptera novaeangliae*
378	Palsboll et al. 1995	U76963.1	*Megaptera novaeangliae*
379	Palsboll et al. 1995	U76964.1	*Megaptera novaeangliae*

380	Palsboll et al. 1995	U76965.1	*Megaptera novaeangliae*
381	Palsboll et al. 1995	U76966.1	*Megaptera novaeangliae*
382	Palsboll et al. 1995	U76967.1	*Megaptera novaeangliae*
383	Palsboll et al. 1995	U76968.1	*Megaptera novaeangliae*
384	Palsboll et al. 1995	U76969.1	*Megaptera novaeangliae*
385	Palsboll et al. 1995	U76970.1	*Megaptera novaeangliae*
386	Palsboll et al. 1995	U76971.1	*Megaptera novaeangliae*
387	Palsboll et al. 1995	U76972.1	*Megaptera novaeangliae*
388	Palsboll et al. 1995	U76973.1	*Megaptera novaeangliae*
389	Palsboll et al. 1995	U76974.1	*Megaptera novaeangliae*
390	Palsboll et al. 1995	U76975.1	*Megaptera novaeangliae*
391	Palsboll et al. 1995	U76976.1	*Megaptera novaeangliae*
392	Palsboll et al. 1995	U76977.1	*Megaptera novaeangliae*
393	Palsboll et al. 1995	U76978.1	*Megaptera novaeangliae*
394	Palsboll et al. 1995	U76979.1	*Megaptera novaeangliae*
395	Palsboll et al. 1995	U76980.1	*Megaptera novaeangliae*
396	Palsboll et al. 1995	U76981.1	*Megaptera novaeangliae*
397	Palsboll et al. 1995	U76982.1	*Megaptera novaeangliae*
398	Palsboll et al. 1995	U76983.1	*Megaptera novaeangliae*
399	Palsboll et al. 1995	U76984.1	*Megaptera novaeangliae*
400	Palsboll et al. 1995	U76985.1	*Megaptera novaeangliae*
401	Palsboll et al. 1995	U76986.1	*Megaptera novaeangliae*
402	Palsboll et al. 1995	U76987.1	*Megaptera novaeangliae*
403	Palsboll et al. 1995	U76988.1	*Megaptera novaeangliae*
404	Palsboll et al. 1995	U76989.1	*Megaptera novaeangliae*
405	Palsboll et al. 1995	U76990.1	*Megaptera novaeangliae*
406	Palsboll et al. 1995	U76991.1	*Megaptera novaeangliae*
407	Valsecchi et al. 2002	AF419261.1	*Megaptera novaeangliae*
408	Valsecchi et al. 2002	AF419262.1	*Megaptera novaeangliae*
409	Valsecchi et al. 2002	AF419263.1	*Megaptera novaeangliae*
410	Valsecchi et al. 2002	AF419264.1	*Megaptera novaeangliae*
411	Valsecchi et al. 2002	AF419265.1	*Megaptera novaeangliae*
412	Valsecchi et al. 2002	AF419266.1	*Megaptera novaeangliae*
413	Valsecchi et al. 2002	AF419267.1	*Megaptera novaeangliae*
414	Valsecchi et al. 2002	AF419268.1	*Megaptera novaeangliae*
415	Valsecchi et al. 2002	AF419269.1	*Megaptera novaeangliae*
416	Valsecchi et al. 2002	AF419270.1	*Megaptera novaeangliae*
417	Valsecchi et al. 2002	AF419271.1	*Megaptera novaeangliae*

Anexo E. Alineamiento efectuado mediante el programa McAlign para los haplotipos mitocondriales en misticetos.

#MEGA

Titulo: Alineamiento MCALIGN para el dominio hipervariable I de la región control mitocondrial de misticetos

Formato

Tipo de dato: Nucleótidos

Secuencias =27

NSitios=258

Deleción = -

*Pygmy Right = *Caperea marginata*, Right = *Eubalena glacialis*, Bowhead = ***Balaena mysticetus***, Bryde = *Balaenoptera edeni*, Sei = *Balaenoptera* ***borealis***, Fin = *Balaenoptera* ***physalus***, Blue = *Balaenoptera musculus*, Minke = ***Balaenoptera acutorostrata***, Humpback = ***Megaptera novaeangliae***

Datos:

```
[                                                                                                                   1 ]
[                      1 1111111112 222222222 3 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
[             1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#Pygmy_Right  TATTGAAAA - TAA-TTTATC TTATCACATA CTAC TATGTA -CCCGTGCAT GTATGCATGT CCACATAACC  -----AACA- -GCGT--T-- CTCTTGAAAT
#Right1       TATTAAAAA - TAAA-TTATC CTATTACATA TTATTATGTA ACCCGTGCAT GTATGCACTA CCACATGGCC  -----AATAT TG-GTCCTGA CTC-ATAAAT
#Right2       TATTAAAAA - TAAA-TTATC CTATTACATA TTACTATGTA ATC CGTGCAT GTATGCACTA CCACATGGCC  -----AATAC TA-GTCCTGA CTC-ATAAAT
#Bowhead1     TATTGAAAA - TAA-CTTATT TTATTGCATA TTACTATGTA ACCCGTGCAT GTATGCACCT CCACATGGCC  -----GATAC TA-GTCCCAA CTC-ATAAAT
#Bowhead2     TATTGAAAA - TAA-CTTATT TTATTGCATA TTACTATGTA ACTCGTGCAT GT ATGCACCG CCACATGGCC -----GATAC TA-GTCCCAA CTC-ATAAAT
#Gray1        TATTAAAAA - TAA-CTTATT TTATTGCATA CTGTTATGTA ACTCGTGCAT GTATGTACTT CCACATAACC CA  -TAGTAGT TA-GTATT-C CCCTGTGAAT
#Gray2        TATTAAAAA - TAA-CTTATT TTATTGCATA CTGTTATGTA ACTTGTGCAT GTATGTACTT C CACATAACC CA-TAGTAGT TA-GTATT-C CCCTGTGAAT
#Bryde1       TATCGAAAAA AAAACTTGTC TTGTCACATA TTACTATGTG ATTTGTACAT GTATATACCT TCCCATAACT    ---TAATTAA TA-GTCTT-C TCTTATGGGG
#Bryde_Jap2   TATCGAAAAA TAA -CTTGTC TTATCACATA TTATTATGTG ACTTGTACAT GTATATACCC TCCCATAACT    ---CAATTAA TA-GTCTT-C TCCTATGAGT
#Sei1         TATCGAAAAA TAA -CTTGTC CTATCACATA CTATTATGTG ATTTCTACAT ATATATACC - TCCCACAACT ---TAATTAA TA-GTCTT-C TCCTGTAGGT
#Sei2         TATCGAAAAA TAA -CTTGTC CTATCACATA TTATTATGTG ATTTGTACAT ATATACACC - TCCCCCAACT ---TAATTAA TA-GTCTT-C TCCTGTAGGT
#Fin1         TATTGAAAA - TAA-CTTGCC TTATTAGATA TTATTATGTA ACTCGTGCAT GTATGTACTT CCACATAA -- ------TTAA TA-GCGTCTT TCC-ATGGGT
#Fin2         TATTGAAAA - TAA-CTTGCC TTATTAGATA TTATTATGTA ATTCGTGCAT GTATGTACTT CCACATAA -- ------TTAA TA-GCGTCTT TCC-ATGGGT
#Fin3         TATTGAAAA - TAA-CTTGCC TTATTAGATA TTATTATGTA ATTCGTGCAT GTATGTACTT CCACATAA -- ------TTAA TA-GCGTCTT TCC-ATGGGT
#Fin4         TATTGAAAA - TAA-CTTGCC TTATTAGATA TTATTATGTA ACTCGTGCAT GTATGTACTT CCACATAA -- ------TTAA TA-GCGTCTT TCC-ATGGGT
#Fin5         TATTGAAAA - TAA-CTTGCC TTATTAGATA TTATTATGTA ACTCGTGCAT GCATGTACTT CCACATAA -- ------TTAA TA-GCGTCTT TCC-ATGGGT
#Blue1        TATTAAAAAA TAA --TTATC TCATTACATA TTGTTATGTA CTTCGTGCAT GTATGTACTT CCCCATAACC AG  -T--TAAT CA-GTGTTAT CCCTGTGAAT
#Blue2        TATTAAAAAA TAA --TTATC TCATTACATA TTGTTATGTA CTTCGTGCAT GTATGTACTC CCCCATAACC AG  -T--TAAT CA-GTGTTAT CCCTGTGAAT
#Blue3        TATTAAAAAA TAA --TTATC TCATTACATA TTGTTATGTA CTCCGTGCAT GCATGTACTT CCTCATAACC AG  -T--TAAT CA-GTGTTAT CCCTGTGAAT
#Blue4        TATT AAAAAA TAA --TTATC TCATTACATA TTGTTATGTA CTCTGTGCAT GTATGTACTT CCCCATAACC AG  -T--TAAT CA-GTGTTAT CCCTGTGAAT
#Blue5        TATTAAAAAA TAA --TTATC TCATTACATA TTGTTATGTA CTTCGTGCAT GTATGTACTC CCTCATAACC AG  -T--TAAT CA-GTGTTAT CCCTGTGAAT
#Minke_Ant1   TATTGAAAA - TAG-TTTATT TTATTACATA TCATTATGTA  -CCCGTGCAT GTATGCATGT CCACATAACC AG -TAATAAT GA--TGTC-C TCCTGTAAAT
#Minke_Ant2   TATTGAAAA - TAG-TTTATT TTATTACATA TCATTATGTA  -CCCGTGCAT GTATGCATGT CCACATAACC AG -TAATAAT GA--TGTC-C TCCTGTAAAT
#Minke_Atl1   TATTAAAAA - TAA-TTTATC TTATTACATA CTATTATGTA  -CCCGTGCAT GTATGCATGT CCACATAACC AA -TAATAGC GA--TGTC-C TCCTGTAAAT
#Minke_Atl2   TATTAAAAA - TAA-TTTATC TTATTACATA CTATTATGTA  -CTCGTGCAT GTATGCATGT CCACATAACC AA -TAATAAC GA--TGTC-C TCCTGTAAAT
#Humpback1    TATTGAAAA - TAG-CTCATT CCATTACATA C CATTATGTA ATTCGTGCAT GTATGTACTA CCACATAACC AACTGATA -G CA--CCT--- TCC-ATGAG-
#Humpback2    TATTGAAAA - TAG-CTCATT CCATTACATA CCATTATGTA ATTCGTGCAT GTATGTACTA CCATATAACC AACTGATA -G CA--CCT--- TCC-ATGAG-
```

```
[          1111111111 1111111111 1111111111  1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111112 ]
[          0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 ]
[          1234567890 1234567890 1234567890 12345 67890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#Pygmy_Right --GTATA--T GTACATATAC TAT-GTATAA TTGTACATTC AATTATCATC ACTACGACCA GTTAAAGCTC GTATTAAATT TCATTAATTT TACATAT  -TA
#Right1      -TGTACC--T ATACATGC-- TAT-GTATAA TCGTGCATTC AA TTATTTTC ACTACGGGAA GTTAAAGCTC GTATTAAATT TTATTTATTT TACATACGTA
#Right2      -TGTACC--T ATACATGC-- TAT-GTATAA TCGTGCATTC AATTATTTTC ACTACGGGAA GTTAAAGCTC GTATTAAATT TTATTTATTT TACATATGTA
#Bowhead1    -TGTATA--T ATACATGC-- TAT-GTATAA TCGTGCATTC AATTATTTTC A CTACGGGAA GTTAAAGCTC GTAATGAATT TTATTTATTT TACATACGTA
#Bowhead2    -TGTATA--T GTACATGC-- TAT-GTATAA TCGTGCATTC AATTATTTTC ACTACGGGAA GTTAAAGCTC GTAATGAATT TTATTTATTT TACATACGTA
#Gray1       ATGTATATGT ACACATAC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACTACG -GAA GTTAAAGCCC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT -TA
#Gray2       ATGTATATGT ACACATAC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACTACG -GAA GTTAAAGCCC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT -TA
#Bryde1      ATGTATATAT ATACATGC -- TAT-GTATAA CTGTGCATTC AATTATTTTC ACTACGAGCA GTTAAAGCTC  GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT -TA
#Bryde_Jap2  ATGTATATGT ATACATGC -- TAT-GTATAA CTGTGCATTC AATTATTTTC ACCACGAGCA GTTGAAGTCC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
#Sei1        ATGTATATAA ATACATGC -- TAT-GTATAA CTGTGCATTC AATTATTTTC ACCACGAGCA GTTGAAGCTC GTATTAAAT  T TCATTAATTT TACATAT -TA
#Sei2        ATGTATATAA ATACATGC -- TAT-GTATAA CTGTGCATTC AATTATTTTC ACTACGAGCA GTTGAAGCTC GTATTAAATT TCATTAATTT TACATAT  -TA
#Fin1        ATGAACAGAT ATACATGC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATTTTC ACCACGAGCA GTTGAAGCTC GTATTAAATT TTATTAAT  TT TACATAT -TA
#Fin2        ATGAATAGAT ATACATGC -- TAT-GTATAA CTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTAAAGCCC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
#Fin3        ATGAATAGAT ATACATGC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTAAAGCCC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
#Fin4        ATGAACAGAT ATACATGC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATTTTC ACCACGAGCA GTTGAAGCTC GTATTAAATT TTATTAATTT CACATAT  -TA
#Fin5        ATGAACAGAT ATACATGC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATTTTC ACCACGAGCA GTTGAAGCTC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
#Blue1       ATGTATACAT ACACATGC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTAAAGCCC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
#Blue2       ATGTATACAT ACACATGC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTAAAGCCC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
#Blue3       ATG TATACAT ACACATGC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTAAAGCCC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
#Blue4       ATGTATATAT ACACATGC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTAAAGCCC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
#Blue5       ATGTATACAT AC ACATGC-- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTAAAGCTC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
#Minke_Ant1  ATGTATATGT ATACATAC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTGAAGCTC GTATTAAATT TCATTAATTT TACATAT  -TA
#Minke_Ant2  ATGTATATGT ATACATAC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTGAAGCCC GTATTAAACT TCATTAATTT TACATAT  -TA
#Minke_Atl1  ATGTATATGT ATACATAC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTAAAGCTC GTATTAAAAT TCATTAATTT TACATAT  -TA
#Minke_Atl2  ATGTATATGT ATACATAC -- TAT-GTATAA TTGTGCATTC AATTATCTTC ACCACGAGCA GTTAAAGCCC GTATTAAAAT TCATTAATTT TACATAT  -TA
#Humpback1   ---------- ---------- TAT-GTATAA TCGTGCATTC AATTATCTTC ACTACGAGCA GTTAAAGCTC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
#Humpback2   ---------- ---------- TAT-GTATAA TCGTGCATTC AATTATCTTC ACTACGAGCA GTTAAAGCTC GTATTAAATT TTATTAATTT TACATAT  -TA
```

```
[          2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 22222222]
[          0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 55555555]
[          12345 67890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 12345678]
#Pygmy_Right CATAATATTT ATT -AATTAT ACA-TAGTAC ATGTGCTTA- A-ATC---A- ---A-TTC
#Right1      CATAATAATC ATT -GATCGT GCA-TGGTAC ATGCTCTTA- A-ATC---A- ---A-TTC
#Right2      CATAATAATC ATT -GATCGT GCA-TAGTAC ATGTCCTTA- A-ATC---A- ---A-TTC
#Bowhead1    CATAATAATC ATT -GATCGT GCA-TGGTAT ATGTCCTCA- A-ATC---A- ---A-TTC
#Bowhead2    CATAATAATC ATT -GATCGT GCA-TAGTAC ATGTCCTTA- A-ATC---A- ---A-TTC
#Gray1       CATAATATTT ATT -AATAGT ACAATAGTGC ATGCTCTTAT GCATCCCCAG  GTTA-TTC
#Gray2       CATAATATTT ATT -AATAGT ACAATAGCGC ATGTTCTTAT GCATCCCCAG GTTA -TTC
#Bryde1      CATAATATTT ATT -AATAGT ACAATAGCGC ATGTCATTAT GCATCCTCTG GTCAATTA
#Bryde_Jap2  CATAATATTC ATT -GATAGT ACAATAGCAC ATGTTGTTAT GCATCCCCTG ATCAATTT
#Sei1        CATAATATTT ATT -AATAGT ACAGTAGCGC ATGTTATTAT GCATCCCCTG GTCAATTC
#Sei2        CATAATATTC ATT -GATAGT ACATTAGTGC ATGCTATTAT GCATCCCCTG GTGAATTT
#Fin1        CATAATATGT ATT -AATAGT ACAATAGCGC ATGTTCTTAT GCATCCCCAG GTTTATTT
#Fin2        CATAATTTGT A TT-AATAGT ACAATAGCGC ATGTTCTTAT GCATCCCCAG GTTTATTT
#Fin3        CATAATTTGT ATT -AATAGT ACAATAGCGC ATGTTCTTAT GCATCCCCAG GTTTATTT
#Fin4        CATAATATGT ATT -AATAGT ACAATAGCGC ATGTTCTTAT GCATCCCCAG ATCTATTT
#Fin5        CATAATATGT ATT -AATAGT ACAATAGCGC ATGT TCTTAT GCATCCCCAG ATCTATTT
#Blue1       CATA-TATTT ATTTAATAGT ACAGTAGTGC ATGTTCTTAT GCATCCTCAG GTCAATTT
#Blue2       CATAATATTT ATT -AATAGT ACAGTAGTAC ATGTTCTTAT GCATCCTCAG GTCAATTT
#Blue3       CATAATATTT ATT -AATAGT ACAGTAGTAC ATGTTCTTAT GCATCCCCAG GTCAATT T
#Blue4       CATA-ATATT TATTAATAGT ACAGTAGTAC ATGTTCTTAT GCATCCTCAG ATCAATTT
#Blue5       CATAATATTC ATT -AATAGT ACAGTAGCAC ATGTTCTTAT GCATCCCCAG ATCAATTT
#Minke_Ant1  CATGGTATTC ACT -AATAGT ACATTAGCGC ATGATATTAT GCATCCTCAA ACCAATTC
#Minke_Ant2  CATGATATTC  ACT-AATAGT ACATTAGTGC ATGATATTAT GCATCCTCAA ATCAATCC
#Minke_Atl1  CATAATATTC ATT -GATAGT ACATTAGCGC ATGTTCTTAT GCATCCACAA GCTAATTT
#Minke_Atl2  CATAATATTC ATT -GATAGT ACATTAGCGC ATGTTCTTAT GCATCCACAA GTTAATTT
#Humpback1   CATAATATGT ATT -AATAAT ACAATAGTAC AT GTCCTTAT AAATTCCCAG GTTTATTT
#Humpback2   CATAATATGT ATT -AATAAT ACAATAGTAC ATGTCCTTAT AAATTCCCAG GTTTATTT
```

Anexo F. Tendencia demográfica del Stock de ballena azul del Pacífico Nororiental 1909-2005 (tasa neta de crecimiento anual 2%).

Temporada	Captura Total	Captura PNOcc	Captura PNOr*	Stock Original	Pt/k	%	Z	Stock Remanente
1909 - 1910	97	97	0	4,191	1.0000	100.00	1.80	4,191
1910 - 1911	243	243	0	4,191	1.0000	100.00	1.80	4,191
1911 - 1912	348	236	112	4,191	1.0000	100.00	1.80	4,079
1912 - 1913	116	58	58	4,079	0.9733	97.33	1.82	4,025
1913 - 1914	123	123	0	4,025	0.9604	96.04	1.84	4,031
1914 - 1915	108	57	51	4,031	0.9618	96.18	1.84	3,985
1915 - 1916	100	75	25	3,985	0.9509	95.09	1.85	3,967
1916 - 1917	82	75	7	3,967	0.9466	94.66	1.85	3,968
1917 - 1918	27	24	3	3,968	0.9468	94.68	1.85	3,973
1918 - 1919	57	53	4	3,973	0.9479	94.79	1.85	3,976
1919 - 1920	54	35	19	3,976	0.9487	94.87	1.85	3,964
1920 - 1921	37	37	0	3,964	0.9460	94.60	1.85	3,972
1921 - 1922	34	34	0	3,972	0.9478	94.78	1.85	3,980
1922 - 1923	64	35	29	3,980	0.9496	94.96	1.85	3,958
1923 - 1924	33	33	0	3,958	0.9444	94.44	1.85	3,966
1924 - 1925	291	35	256	3,966	0.9463	94.63	1.85	3,718
1925 - 1926	290	36	254	3,718	0.8871	88.71	1.91	3,479
1926 - 1927	197	9	188	3,479	0.8301	83.01	1.98	3,312
1927 - 1928	217	10	207	3,312	0.7904	79.04	2.04	3,131
1928 - 1929	131	16	115	3,131	0.7470	74.70	2.10	3,044
1929 - 1930	133	55	78	3,044	0.7264	72.64	2.14	2,997
1930 - 1931	20	20	0	2,997	0.7150	71.50	2.16	3,027
1931 - 1932	17	17	0	3,027	0.7224	72.24	2.15	3,058
1932 - 1933	15	11	4	3,058	0.7296	72.96	2.13	3,092
1933 - 1934	23	21	2	3,092	0.7377	73.77	2.12	3,123
1934 - 1935	161	22	139	3,123	0.7452	74.52	2.11	3,013
1935 - 1936	47	8	39	3,013	0.7189	71.89	2.15	3,005
1936 - 1937	66	12	54	3,005	0.7169	71.69	2.16	2,981
1937 - 1938	41	4	37	2,981	0.7114	71.14	2.17	2,976
1938 - 1939	5	0	5	2,976	0.7100	71.00	2.17	3,002
1939 - 1940	51	15	36	3,002	0.7162	71.62	2.16	2,997
1940 - 1941	76	35	41	2,997	0.7150	71.50	2.16	2,986
1941 - 1942	15	14	1	2,986	0.7126	71.26	2.16	3,016
1942 - 1943	15	15	0	3,016	0.7197	71.97	2.15	3,047
1943 - 1944	2	2	0	3,047	0.7270	72.70	2.14	3,077
1944 - 1945	10	10	0	3,077	0.7342	73.42	2.13	3,107
1945 - 1946	10	10	0	3,107	0.7413	74.13	2.11	3,136
1946 - 1947	34	30	4	3,136	0.7482	74.82	2.10	3,161
1947 - 1948	53	52	1	3,161	0.7541	75.41	2.09	3,188
1948 - 1949	19	17	2	3,188	0.7606	76.06	2.08	3,213
1949 - 1950	18	14	4	3,213	0.7667	76.67	2.07	3,237
1950 - 1951	72	63	9	3,237	0.7723	77.23	2.07	3,254
1951 - 1952	122	106	16	3,254	0.7765	77.65	2.06	3,265
1952 - 1953	142	134	8	3,265	0.7790	77.90	2.06	3,283
1953 - 1954	207	196	11	3,283	0.7834	78.34	2.05	3,298
1954 - 1955	142	131	11	3,298	0.7869	78.69	2.04	3,312
1955 - 1956	150	136	14	3,312	0.7904	79.04	2.04	3,324
1956 - 1957	143	128	15	3,324	0.7931	79.31	2.03	3,334

1957 - 1958	125	91	34	3,334	0.7954	79.54	2.03	3,324
1958 - 1959	149	116	33	3,324	0.7932	79.32	2.03	3,316
1959 - 1960	86	15	71	3,316	0.7913	79.13	2.04	3,271
1960 - 1961	90	52	38	3,271	0.7804	78.04	2.05	3,259
1961 - 1962	112	59	53	3,259	0.7776	77.76	2.06	3,232
1962 - 1963	443	374	69	3,232	0.7712	77.12	2.07	3,190
1963 - 1964	140	105	35	3,190	0.7611	76.11	2.08	3,183
1964 - 1965	134	97	37	3,183	0.7594	75.94	2.09	3,173
1965 - 1966	0	0	0	3,173	0.7572	75.72	2.09	3,201
1966 - 1967	0	0	0	3,201	0.7639	76.39	2.08	3,229
1967 - 1968	0	0	0	3,229	0.7704	77.04	2.07	3,256
1968 - 1969	0	0	0	3,256	0.7768	77.68	2.06	3,282
1969 - 1970	0	0	0	3,282	0.7831	78.31	2.05	3,308
1970 - 1971	0	0	0	3,308	0.7893	78.93	2.04	3,333
1971 - 1972	0	0	0	3,333	0.7953	79.53	2.03	3,358
1972 - 1973	0	0	0	3,358	0.8013	80.13	2.02	3,382
1973 - 1974	0	0	0	3,382	0.8071	80.71	2.02	3,406
1974 - 1975	0	0	0	3,406	0.8127	81.27	2.01	3,429
1975 - 1976	0	0	0	3,429	0.8183	81.83	2.00	3,452
1976 - 1977	0	0	0	3,452	0.8237	82.37	1.99	3,474
1977 - 1978	0	0	0	3,474	0.8289	82.89	1.99	3,496
1978 - 1979	0	0	0	3,496	0.8341	83.41	1.98	3,517
1979 - 1980	0	0	0	3,517	0.8391	83.91	1.97	3,537
1980 - 1981	0	0	0	3,537	0.8440	84.40	1.97	3,557
1981 - 1982	0	0	0	3,557	0.8488	84.88	1.96	3,577
1982 - 1983	0	0	0	3,577	0.8535	85.35	1.95	3,596
1983 - 1984	0	0	0	3,596	0.8580	85.80	1.95	3,615
1984 - 1985	0	0	0	3,615	0.8625	86.25	1.94	3,633
1985 - 1986	0	0	0	3,633	0.8668	86.68	1.94	3,650
1986 - 1987	0	0	0	3,650	0.8710	87.10	1.93	3,667
1987 - 1988	0	0	0	3,667	0.8751	87.51	1.93	3,684
1988 - 1989	0	0	0	3,684	0.8790	87.90	1.92	3,700
1989 - 1990	0	0	0	3,700	0.8829	88.29	1.92	3,716
1990 - 1991	0	0	0	3,716	0.8866	88.66	1.92	3,731
1991 - 1992	0	0	0	3,731	0.8903	89.03	1.91	3,746
1992 - 1993	0	0	0	3,746	0.8938	89.38	1.91	3,760
1993 - 1994	0	0	0	3,760	0.8973	89.73	1.90	3,775
1994 - 1995	0	0	0	3,775	0.9006	90.06	1.90	3,788
1995 - 1996	0	0	0	3,788	0.9039	90.39	1.90	3,801
1996 - 1997	0	0	0	3,801	0.9070	90.70	1.89	3,814
1997 - 1998	0	0	0	3,814	0.9101	91.01	1.89	3,827
1998 - 1999	0	0	0	3,827	0.9130	91.30	1.89	3,839
1999 - 2000	0	0	0	3,839	0.9159	91.59	1.88	3,850
2000 - 2001	0	0	0	3,850	0.9187	91.87	1.88	3,862
2001 - 2002	0	0	0	3,862	0.9214	92.14	1.88	3,873
2002 - 2003	0	0	0	3,873	0.9240	92.40	1.87	3,883
2003 - 2004	0	0	0	3,883	0.9266	92.66	1.87	3,894
	5,731	3,514	2,217					