



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

**Niveles de parentesco entre Cachalotes machos
adultos del Pacífico Norte (*Physeter macrocephalus*)
y su relación con la transmisión del comportamiento
de depredación sobre palangres**

TESIS PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

SANDRA CAROLINA MORENO MEDINA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. NOVIEMBRE 2010

RESUMEN

Los cachalotes (*Physeter macrocephalus*) machos han aprendido a depredar sobre palangres en el Golfo de Alaska; comportamiento que parece haberse esparcido ampliamente durante la última década. La depredación por cachalotes es interesante no sólo desde la perspectiva económica por su interacción con las pesquerías, sino también como una ventana para el estudio de la transmisión de comportamiento y los aspectos sociales del aprendizaje en cetáceos. Para evaluar cómo dicho comportamiento se ha esparcido en el Golfo de Alaska y las implicaciones que pudiera tener para el futuro de la pesquería, se evaluó si la transmisión del comportamiento de depredación puede ocurrir dentro de la unidad social entre padres e hijos (transmisión vertical), o bien mediante el aprendizaje social (transmisión horizontal) entre individuos cercanamente asociados pero sin parentesco. Para ello se estimó el coeficiente de parentesco (R) entre individuos asociados y no asociados a embarcaciones de palangre en el Pacífico Norte, así como también entre individuos dentro y fuera del área en la que se ha observado con mayor frecuencia la depredación. La posible ruta de transmisión de este comportamiento se analizó a nivel del DNA mitocondrial, así como del DNA nuclear (6 loci microsatélites y 36 SNPs). Ya que los machos depredadores correspondieron a los tres linajes mitocondriales más frecuentes a nivel mundial, y ninguno de ellos está filogenéticamente asociado en forma directa, la resolución del DNA mitocondrial no fue suficiente para determinar que la transmisión fuese vertical. Por otro lado, aunque los niveles de parentesco encontrados fueron bajos, no se observaron diferencias significativas entre los individuos asociados a palangres de los no asociados, así como tampoco entre aquellos observados dentro y fuera del área de depredación. Además de los análisis mencionados, se llevó a cabo un análisis de asignación poblacional de los individuos asociados a palangres con el fin de evaluar las futuras repercusiones que pudiese tener el incremento de las interacciones con la pesquería; los resultados sugirieron que los cachalotes asociados a palangres así como también el resto de los individuos evaluados en el estudio, pertenecen a diferentes estratos poblacionales, lo que minimiza el daño a la diversidad genética de las poblaciones a las que pertenecen. El tamaño de muestra, así como la naturaleza de los marcadores nucleares usados, permitieron la realización de simulaciones para evaluar la eficiencia de estos en estimaciones de R ; con lo que se pudo observar y apoyar que la transmisión del comportamiento no es a través de padres a hijos. A pesar de que ambos marcadores nucleares apoyaron tal hipótesis, los microsatélites mostraron un mejor rendimiento en comparación con los SNPs, haciendo más confiables las estimaciones a través de microsatélites debido a la sobrestimación de los SNPs cuando el tamaño de muestra es grande y la subestimación cuando el tamaño de muestra es pequeño. Con los resultados obtenidos, se hace evidente la necesidad de incrementar el esfuerzo en busca de medidas de mitigación que reduzcan la interacción.

ABSTRACT

Depredation by sperm whales is not only interesting as an issue of economics due to interaction with fisheries, but also as a window to study the transmission of behavior and social aspects of learning in cetaceans. To assess how such the behavior has been spreading in the Gulf of Alaska and the implications it may have in the future of the fishery, we assessed whether behavioral transmission of predation can occur within the social unit between parent and child (vertical transmission) or through social learning (horizontal transmission) among individuals closely associated but not related. In order, we estimated the kinship coefficient (R) among individuals associated and non-associated with longline vessels in the North Pacific, as well as among individuals inside and outside of the area that was most frequently observed predation. The possible way of transmission of this behavior was analyzed at the level of mitochondrial DNA and nuclear DNA (6 microsatellite loci and 36 SNPs). Since depredating males corresponded to the three most common mitochondrial lineages worldwide, and none of them is directly linked phylogenetically, the resolution of mitochondrial DNA was not enough to determine that the transmission is vertical. Furthermore, although the levels of relatedness were low, there were no significant differences among individuals associated with longlines, neither among those observed inside and outside the predation area. In addition to the above analysis, we conducted a population assignment analysis of the individuals associated with longlines in order to assess the future impact that could have the increasing of the interactions with the fishery, the results suggested that sperm whales associated with longlines as well as the rest of the individuals examined in the study belong to different population strata, which minimizes the impact on the genetic diversity of populations to which they belong. The sample size and the nature of the nuclear markers used allowed the realization of simulations to assess the efficiency of these to estimate R , the results support that the transmission of the behavior is not through parents to children. Although both nuclear markers supported this hypothesis, microsatellite showed a better performance compared with SNPs, making it more reliable estimates through microsatellites due to an overestimation of the SNPs when the sample size is large and underestimation when the sample size is small. With these results, it becomes evident the need to increase efforts to find mitigation measures to reduce the interaction.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

**Niveles de parentesco entre cachalotes machos adultos del
Pacífico Norte (*Physeter macrocephalus*) y su relación con la
transmisión del comportamiento de depredación sobre palangres**

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

SANDRA CAROLINA MORENO MEDINA

Aprobada por:

Dr. Luis Manuel Enríquez Paredes

Dra. Sara L. Mesnick

M. en C. Brittany L. Hancock

DEDICATORIA

A mis padres Mirna y Fernando quienes me han apoyado moral y económicamente de forma incondicional en esta aventura y en las que aún me faltan. Y quienes además siempre ven por mi bienestar a pesar de que signifique estar lejos de ellos.

A mis hermanas Claudia y Nínive. Mis mejores momentos han sido con ustedes y pensando en ustedes. Muchas de sus cualidades han forjado lo que soy ahora.

A mis preposiciones, quienes me tuvieron confianza y gracias a ellos he llegado a completar y dar sentido a mi oración.

Y, en memoria de Armando Moreno, del cual no me pude despedir en mi ausencia tratando de perseguir sueños.

*Las preposiciones son los conectores por excelencia,
los puentes que unen palabras y dan sentido a la oración.*

AGRADECIMIENTOS

El sentido de esta tesis hubiese tomado rumbos distintos; desde ser un trabajo de diferenciación genética con una muestra mayor de corvinas, hasta una evaluación filogenética de los mangles en México. Sin embargo, gracias al sitio de colecta de las primeras y la escasa variabilidad cloroplástica de las segundas (resultando cada una en solo un haplotipo), tuve la oportunidad de involucrarme en un área totalmente desconocida para mí; gracias a la cual tuve la inmensa fortuna de aprender y conocer a cada una de las preposiciones de mi oración quienes a pesar de no conocerme tuvieron confianza en mí y por ello siempre estaré agradecida.

Al Dr. Jorge de la Rosa Vélez (q. e. p. d.) por darme la oportunidad de trabajar con él y aceptar ser mi tutor al inicio del posgrado. Su ausencia trajo mucha tristeza pero a la vez nos fortaleció a los estudiantes del cuerpo académico como hermanos.

Al inicio del posgrado a diferencia de la mayoría de mis compañeros, no inicié con una beca CONACyT, por lo que estoy inmensamente agradecida a los doctores Raquel Muñiz y Luis Enríquez quienes fueron mis benefactores para pagar mi primer semestre en la maestría. Muchísimas gracias.

Dado el fallecimiento del Dr. de la Rosa, el Dr. Luis Enríquez toma la batuta de mi tutoría y la dirección de tesis sin imaginarse el desgaste moral, intelectual y económico que eso le causaría, es por ellos que: Gracias Luis por permitirme ser tu estudiante, crece y aprender en esta área; tener la suficiente confianza en mí trabajo, estar dispuesto a enseñarme, financiarme: el viaje a La Paz con el cual tuve la oportunidad de ver de cerca cachalotes, el Summer Institute of Bioestistics 2009 de la Universidad de Washington que me permitió entender mejor los temas de parentesco, la 18va reunión bienal de SMM en Quebec, la 32va reunión de SOMEMMA en Veracruz, gastos en San Diego durante mi estancia, alimentarme y tenerme la suficiente paciencia para aguantarme. Gracias por la confianza que aun sigo creyendo no merezco.

Sin imaginarme que en mi futuro estarían los cachalotes presentes, la influencia de Luis trajo en escena a la Dra. Sarah Mesnick con la quien tuve la oportunidad de

trabajar tan de cerca en el Southwest Fisheries Science Center (SWFSC). Sarah muchas gracias por todo, por permitirme trabajar en los laboratorios del SWFSC, poner tu confianza en mí a pesar de ser una completa desconocida, estar siempre en la mejor disposición, involucrarme en este mundo, darme un techo cuando me quede sin fondos, financiarme durante 3 meses en San Diego, tener paciencia con mi inglés, darme la confianza para participar en este proyecto y enseñarme que los autores de los artículos no están muy lejos de mi alcance. En verdad mil gracias.

Al proyecto interno: Demografía histórica y estado actual de las poblaciones de tres especies de mamíferos explotadas comercialmente en la Península de Baja California con base sus niveles de diversidad genética neutral. Aprobado en la 12va. Convocatoria de apoyo a proyectos de investigación por proporcionarme una pequeña beca.

Después de 6 meses de carencias finalmente me otorgan la beca, con lo que agradezco a CONACyT por otorgármela (número de becario: 213360). Mi estancia en el SWFSC no la hubiese llevado a cabo sin el apoyo de la misma institución con la beca mixta para estancias en el extranjero.

Al inicio de mi estancia en San Diego, no tenía un techo donde alojarme, y la Dra. Irma Soria me permitió muy amablemente quedarme en su casa por tres semanas. Muchas gracias doctora.

A Brittany Hancock quien fungió como mi supervisora en el laboratorio dentro del proyecto de SNPs en cachalotes y que formó parte del comité de tesis. Britt gracias por aguantarme tanto tiempo, se que no fue fácil para ti y agradezco inmensamente la paciencia que tuviste, así como la disposición. Aprendí mucho de ti lo cual no olvidaré.

Varias personas fueron un factor importante para acostumbrarme a la dinámica de trabajo, distinta a la acostumbrada, en el laboratorio del SWFSC. Así que agradezco a Phill Morin por ayudarme con todos los trámites en el SWFSC, enseñarme tanto y estar en la mejor disposición para explicarme las cosas que no entendía, y a Vicki Pease por haber sido mi supervisora mientras recibía entrenamiento en genotipado de SNPs.

Muestrear 39 cachalotes machos adultos en el Pacífico Norte, no es tarea fácil, por lo que agradezco a Vladimir Burkanov, Jan Straley, pescadores de bacalao negro de Sitka, Alaska y a SEASWAP. Llevar a cabo la extracción, amplificación de DNA mitocondrial, análisis molecular del sexo y genotipado de microsatélites de 232 cachalotes, reflejan el arduo trabajo de más de 10 años de investigación que involucran a Kelly Robertson, Amanda Bowman, Viki Pease, Nadia Rubio-Cisneros y Brittany Hancock.

A mis hermanos de la vida: Miki, Cristina y Eduardo, y a mis compañeros y amigos del cuerpo académico de ecología molecular y biotecnología: Yuliana, Nelva, Santiago, Ana Ruth, Renne, Polo, Paola, Raquel, Ricardo, Karla y Michelle. Y a mis compañeros de casa y amigos: Giuliana y Jorge por apoyarme en todo sentido, tanto monetario como moral.

No puedo dejar de darle las gracias al grupo de azules (Nelva Victoria y Luis Enríquez) que sin sus datos perfectos, no hubiera leído tantos artículos para debatir con ellos de que no eran perfectos... Aunque al final lo resultaran.

No por ser los últimos son los menos importantes, mi familia. Que de forma incondicional me ha financiado cada unas de las aventuras en las que he estado en estos tres años y medio a través de su arduo trabajo. Por ser las voces de aliento y testigos de mis frustraciones y alegrías. Y darme las palabras que me hacen sentir más comprometida en realizar el mejor esfuerzo que debo: *Tu preocúpate por estudiar y nosotros del dinero.*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vii
TABLA DE CONTENIDO.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABLAS	xiii
INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES.....	20
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
ÁREA DE ESTUDIO	28
COLECCIÓN DE DATOS	30
OBTENCIÓN DE DATOS MOLECULARES	31
Extracción de DNA total.....	32
Identificación molecular del sexo	32
Amplificación y secuenciación del DNA mitocondrial	33
Amplificación y genotipado de microsatélites.....	34
Amplificación y genotipado de SNPs	35
Descubrimiento de los SNPs en cachalotes	35
Diseño de ensayo y amplificación de PCR múltiple para SNPs	36
Genotipado de SNPs	38
ANÁLISIS DE DATOS.....	41
Calidad de análisis	41
Diversidad molecular y tasa de error por locus.....	42
Potencial informativo de marcadores nucleares para evaluar parentesco y probabilidad de identidad.....	43
Estrategias para evaluar la transmisión del comportamiento de depredación.....	45
Comparaciones entre las categorías de individuos.....	45
Evaluación de transmisión del comportamiento mediante DNA mitocondrial ..	46
Evaluación de transmisión del comportamiento mediante marcadores nucleares	47
Evaluación del tipo, número y polimorfismo de los marcadores en la estimación del parentesco: Simulaciones	49
Pruebas de asignación poblacional de los individuos evaluados	50
RESULTADOS.....	52
DNA mitocondrial.....	52
Diversidad molecular de marcadores nucleares.....	54
Formas de evaluar la transmisión de depredación	59
DNA mitocondrial.....	59
Niveles de parentesco con base en los marcadores nucleares.....	59

Comparación entre las categorías de asociación a palangres y ubicación geográfica con respecto al área de depredación	61
Parentesco entre individuos dentro de un mismo grupo	62
Simulación de escenarios para realizar la correcta asignación de parentesco	64
Asignación de la población	68
DISCUSIÓN	70
Tamaño de muestra e incertidumbre para evaluar parentesco	70
Marcadores moleculares y su poder informativo para la asignación de relaciones de parentesco reales.....	71
Estimadores de parentesco	76
¿Cuántos marcadores microsatélites o SNPs son necesarios para estimar confiablemente los niveles de parentesco?	79
Parentesco entre los cachalotes machos adultos evaluados en el estudio y su relación con el comportamiento de depredación.....	81
La depredación, la conservación e implicaciones económicas	83
SUGERENCIAS Y CONSIDERACIONES FINALES	85
CONCLUSIONES	88
REFERENCIAS	89
ANEXO 1.....	100
ANEXO 2.....	101
ANEXO 3.....	102
ANEXO 4.....	105
ANEXO 5.....	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la región del Pacífico Norte en el que se indica la posición geográfica de los cachalotes evaluados en el presente estudio.....	29
Figura 2. Áreas estadísticas del Concilio para el Manejo de Pesquerías en el Pacífico Norte. Localización de 110 cachalotes avistados durante las operaciones palangreras en el Golfo de Alaska durante 1998 (Hills <i>et al.</i> , 1999).....	29
Figura 3. Descubrimiento de SNPs a través de la secuenciación de locus aleatorios.....	36
Figura 4. Modelo de dispersión de los alelos en los en el ensayo del locus CAT262.....	40
Figura 5. Frecuencia relativa de linajes mitocondriales presentes entre los cachalotes machos del Pacífico Norte.....	54
Figura 6. Relaciones filogenéticas intraespecíficas para los linajes maternos de cachalote a nivel mundial (ver Mesnick, 2003).....	60
Figura 7. Distribución e intervalos de la muestra simulada usando las frecuencias alélicas de loci microsatélites en la muestra.....	66
Figura 8. Distribución e intervalos de la muestra simulada usando las frecuencias alélicas de loci SNPs en la muestra.....	67
Figura 9. Distribución e intervalos de relaciones de parentesco observados en la simulación de 16 microsatélites independientes con alelos equi-frecuentes.....	67
Figura 10. Distribución e intervalos de relaciones de parentesco observados en la simulación de 100 SNPs independientes con frecuencias alélicas equilibradas.....	10

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Combinaciones de marcadores nucleares empleados para evaluar el parentesco (R). Se detalla el código de la combinación y el número total de marcadores en cada combinación (n).....	49
Tabla II. Distribución de haplotipos dentro de los grupos.....	53
Tabla III. Diversidad genética mitocondrial para las distintas categorías de evaluación....	54
Tabla IV. Diversidad genética por locus para los marcadores nucleares.....	57
Tabla V. Probabilidad de identidad para cada tipo de marcador multilocus (PI_{MM}) y para la combinación de ambos marcadores nucleares (PI_{42MN}). Se hace referencia al potencial informativo individual de los loci (PIC) y su clasificación por importancia relativa (P_{IP}).....	58
Tabla VI. Valores promedio de parentesco y varianza dentro de los distintos grupos de cachalotes del Pacífico Norte evaluados en el presente estudio.	63
Tabla VII. Valores de parentesco (R) estimados entre algunos individuos asociados a palangre dentro de un grupo y no asociados dentro de un grupo.....	64
Tabla VIII. Porcentajes de asignación de individuos en las clasificaciones realizadas.....	69

INTRODUCCIÓN

El continuo crecimiento de la población humana demanda de la búsqueda de fuentes de alimento y del incremento en la explotación de recursos actualmente explotados, factores que han promovido el desarrollo y la innovación de tecnologías para poder llegar a recursos que eran difíciles de acceder. Esto ha traído como consecuencia un traslape cada vez mayor de las actividades extractivas con el hábitat de fauna silvestre, aumentando con ello el número y la frecuencia de las interacciones entre algunas especies y las pesquerías. La depredación sobre los artes de pesca, que se ha definido como la remoción de las capturas pesqueras y/o carnadas por algunas especies de cetáceos (Donoghue *et al.*, 2002), es un claro ejemplo de dichas interacciones.

La remoción de los peces capturados en palangres por parte de los cachalotes (*Physeter macrocephalus*) es muy bien conocida en el Océano Sur (Nolan y Liddle, 2000; Huckle-Gaete *et al.*, 2004; Purves *et al.*, 2004; Tixier *et al.*, 2009), llegando a representar en algunos sitios hasta un 3.7% del total de las pérdidas pesqueras asociadas con la depredación (Tixier *et al.*, 2009). Por lo anterior; se ha sugerido que este comportamiento parece estar ampliamente esparcido en dicha zona (Hill *et al.*, 1999).

Para el Pacífico Norte, existen reportes anecdóticos de depredación sobre palangres por cachalotes en aguas de Alaska desde la década de los 70's

(O'Connell *et al.*, 2006), pero la frecuencia de esta interacción ha ido en aumento en la última década (Hill *et al.*, 1999; Straley *et al.*, 2006; Sigler *et al.*, 2006). La evidencia recurrente de que algunos cachalotes siguen embarcaciones palangreras por períodos de varios días, merodeando en su proximidad durante las actividades de pesca, despertó la preocupación del sector pesquero y científico sobre el posible rumbo que la depredación pueda tomar. En respuesta, se inició un programa piloto para caracterizar la naturaleza y el alcance de la interacción en la región Sureste del Golfo de Alaska, donde opera la flota palangrera para el bacalao negro (Hill *et al.*, 1999).

Es así como en 2003, surge el Southeast Alaska Sperm Whale Avoidance Program (SEASWAP). A pesar de que los resultados preliminares de programas pilotos señalaron que las pérdidas por la interacción no fueron significativas, queda claro que la pérdida existe y que la depredación por parte de los cachalotes reduce el volumen de capturas por la remoción de peces de las líneas o el valor del producto por el daño a la captura cuando los cachalotes tratan de removerla (Hill *et al.*, 1999).

Debido a que muchas decisiones de importancia biológica que un animal pueda tomar pueden estar afectadas al observar el comportamiento de otros como lo son el alimento a seleccionar, estrategias de caza, el tiempo de forrajeo entre otros (Galef y Laland, 2005). La depredación a pesca palangrera por parte de los cachalotes puede ser un comportamiento

adquirido en su unidad familiar (transmisión vertical) o bien, entre individuos con lazos sociales estrechos pero no necesariamente relacionados por parentesco (transmisión horizontal) a manera de una “aprendizaje social”.

Este último escenario pudiera hacer que el comportamiento se difunda a diferentes grupos y niveles sociales, convirtiéndose en un problema incontrolable y con un fuerte impacto para el sector pesquero. Se ha sugerido que, si el comportamiento de depredación entre los cachalotes fuese el caso de un aprendizaje social entre individuos cercanamente asociados, pero sin relaciones de parentesco, la depredación podría aumentar exponencialmente con el tiempo, haciendo más frecuente la interacción con la pesquería (Franz y Nunn, 2009). En consecuencia, aumentarían tanto la posibilidad de la muerte de algún cachalote que al exhibir este comportamiento corre el riesgo de quedar enredado en la línea de palagres, como las pérdidas económicas de la flota palangrera. Más aun, considerando que el cachalote es una especie que se encuentra protegida y actualmente catalogada como “especie en peligro” (ESA, 1973), la muerte incidental de alguno de ellos en la artes de pesca podría tener implicaciones restrictivas y un impacto económico mayor sobre el sector pesquero.

Por todo lo anterior, resulta evidente la relevancia que tiene para el futuro desarrollo de la pesquería, el evaluar la naturaleza de la depredación por parte de los cachalotes y los posibles escenarios de diseminación de este comportamiento en la población. Para ello es necesario conocer el pedigrí o

la genealogía de los cachalotes que interactúan con las pesquerías en Alaska, para poder establecer así sus relaciones de parentesco.

El conocimiento de la estructura de pedigrí es de gran valor en el estudio de la evolución fenotípica. En el sentido más general, el conocimiento de las relaciones familiares nos permite estudiar la naturaleza de la herencia fenotípica, mientras que en un contexto social, la expresión de los rasgos de comportamiento se puede esperar que varíen según el nivel de parentesco entre los organismos que interactúan socialmente (Hamilton, 1964; Wilson y Ferguson, 2002). A pesar de que el pedigrí con frecuencia puede ser monitoreado bajo condiciones controladas en cautiverio o en laboratorio, su estudio es complicado en poblaciones silvestres y particularmente en aquellas cuya naturaleza, comportamiento y hábitat limitan su seguimiento; tal es el caso de los cetáceos. No obstante, el uso de herramientas moleculares para dar respuesta (a corto plazo) a interrogantes ecológicas asociadas con el comportamiento animal es una ruta factible para superar esta limitación, estimando las relaciones genéticas mediante el uso de marcadores genéticos (Frentiu *et al.*, 2008).

En la última década, los marcadores moleculares por excelencia para el estudio del parentesco y la genealogía han sido los microsatélites, que poseen un alto nivel de polimorfismo y heterocigosidad. Sin embargo, el avance tecnológico y científico ha permitido no solo el descubrimiento, sino

el desarrollo, la evaluación y la aplicación de otros marcadores, como los polimorfismos de nucleótido simple¹ o SNPs (por sus siglas en inglés).

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) son los polimorfismos más abundantes en el genoma (Brumfield *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2004). Debido que la tasa de mutación en una sola base es baja (cerca de 1×10^{-8} cambios por nucleótido por generación), los SNPs consisten usualmente de dos alelos (marcadores bialélicos). Gracias al potencial y características de este marcador es muy posible que en el futuro puedan remplazar a los microsatélites como los marcadores de elección en genética de la conservación. Son especialmente útiles en estudios que involucran DNA parcialmente degradado (de muestras de DNA no invasivas o DNA antiguo), ya que al ser segmentos cortos es posible amplificarlos por PCR de fragmentos de DNA de al menos 50 pares de bases (Allendorf y Gordon, 2007; Morin y McCarthy 2007).

Debido a sus atractivas características, entre las destacan su amplia distribución en genoma de vertebrados, sencilla reproducibilidad, evaluación e interpretación además de la evaluación de cientos de estos mediante chips de DNA; los SNPs han mostrado un gran potencial para estudios en genética de poblaciones con énfasis en la estructura poblacional (Narum *et al.*, 2008; Coates *et al.*, 2009; Morin *et al.*, 2010) y recientemente en estudios de parentesco, paternidad, identificación individual y forense (Heaton *et al.*,

¹ El polimorfismo de un solo nucleótido o SNP por sus siglas en inglés, es un cambio en la secuencia de ADN que afecta a una sola base en la secuencia del genoma. Aunque las inserciones y deleciones pueden ser consideradas como SNPs.

2002; Werner *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Seddon *et al.*, 2005; Anderson y Garza, 2006).

Muchos estimadores han sido desarrollados para inferir las relaciones genealógicas a partir de datos de marcadores moleculares cuando no hay información de pedigrí (p.e. Lynch, 1988; Li, 1993; Lynch y Ritland, 1999; Milligan, 2003; Queller y Goodnight, 1989; Ritland, 1996; Fernández y Toro, 2006; Wang 2002, Wang, 2017). Sin embargo, factores como el tamaño de muestra, el número loci, el número de alelos por locus y sus frecuencias, determinan la eficiencia o el desempeño de dichos estimadores (Milligan, 2003; Wang 2010; Horn *et al.* 2009). Debido a lo anterior, el poder estadístico de los estimadores de parentesco es crítico para su utilidad en la práctica. La forma más adecuada para evaluar el desempeño de los estimadores es el uso de simulaciones, aunque por su complejidad estas han sido empleadas generalmente para caracterizar el error de muestreo (Milligan, 2003; Wang, 2007).

Es por ello que en el presente trabajo se plateó estimar la relaciones de parentesco entre cachalotes (*Physeter macrocephalus*) machos adultos del Pacífico Norte que interactúan con las embarcaciones palangreras en las costas de Sitka, Alaska, mediante el uso de tres marcadores moleculares (DNA mitocondrial, Microsatélites y SNPs) para evaluar la forma en la que se pudiera estar transmitiendo el comportamiento de depredación sobre la pesquería de palangres en dicha zona.

ANTECEDENTES

Los cachalotes (*Physeter macrocephalus*) son la segunda especie de odontocetos distribuidos globalmente, que poseen un alto dimorfismo sexual y compleja estructura social (Christal y Whitehead, 2001; Whitehead, 2003). Mientras que los machos pueden llegar a penetrar aguas árticas y realizar migraciones desde aguas frías a zonas templadas para el apareamiento, la dispersión de las hembras es más limitada (Whitehead, 2003), sugiriendo el posible desarrollo de diferenciación genética; ya que hembras e inmaduros de esta especie forman grupos sociales estables a través del tiempo, los cuales son denominados unidades sociales (Christal *et al.*, 1998) que se caracterizan por perdurar décadas o más. La mayoría de las hembras que conforman dichas unidades se caracterizan por estar en su mayoría emparentadas matrilinealmente (Mesnick *et al.*, 1999; 2001; 2003; Gero *et al.*, 2008). Y es aquí donde los inmaduros aprenden las estrategias para conseguir su alimento. Los machos en estas unidades sociales perduran hasta las edades de seis a 13 años aproximadamente (Richard *et al.* 1996; Whitehead 2003; Pinela *et al.*, 2009), continuando con una vida solitaria hasta conformar grupos esporádicos de solteros jóvenes, mientras van creciendo en edad y tamaño, y desplazándose a latitudes altas donde permanecerán la mayor parte del tiempo alimentándose y madurando de forma solitaria.

Es en latitudes altas donde los cachalotes depredan sobre embarcaciones pesqueras, principalmente aquellas dedicadas a la pesca de bacalao negro (*Anoplopoma fimbria*) y lenguado del Pacífico (*Hippoglossus stenolepis*). Aunque la depredación por cachalotes ha sido ampliamente documentada los océanos del Sur y en el Atlántico Norte (NMFS, 2009), en el Golfo de Alaska fue documentada por primera ocasión en 1978 y su frecuencia ha aumentado considerablemente entre 1998 y 2004 (Sigler *et al.*, 2008). Ante la iniciativa de los pescadores, el gobierno de Estados Unidos y sus instituciones científicas han venido trabajando en conjunto con el sector pesquero en la búsqueda de medidas de mitigación al problema (Straley *et al.*, 2009).

La pesquería de bacalao negro es reconocida como una pesquería sustentable en la costa Oeste de los Estados Unidos y ha sido calificada como “recomendable” por la organización SeaFoodWatch² debido a que el bacalao es una especie abundante, bien manejada y con artes de pesca “ambientalmente amigables”. Si las interacciones de esta pesquería con los cachalotes aumentaran, es muy posible que la pesquería pierda su estatus de nivel de calidad ecológica.

Al instaurarse el SEASWAP (Southeast Alaska Sperm Whale Avoidance Program), ningún cachalote había muerto o presentado heridas severas como consecuencia de la interacción con la pesquería. Sin embargo en

² www.seafoodwatch.org

2006, se observaron tres cachalotes con heridas severas causadas por los artes de pesca en el Golfo de Alaska y la extrapolación realizada considerando el esfuerzo de pesca arrojó una estimación de diez animales heridos al año por efecto de la pesquería (NMFS 2009).

Dentro de los esfuerzos y logros del programa SEASWAP destacan: 1) el uso de bitácoras pesqueras para la evaluar la eficiencia de métodos alternativos de montaje de los artes de pesca y las capturas para planear ajustes a las temporadas de pesca (Straley *et al.*, 2009); 2) marcaje bioacústico de los cachalotes que se observan depredando y de aquellos presentes en las áreas naturales de forrajeo para evaluar los cambios en los patrones de buceo y comportamiento alimentario (Mathias *et al.*, 2009) y 3) la recolecta de muestras para la evaluación genética con la que se dio a conocer que los individuos asociados a la depredación son exclusivamente machos adultos (S. Mesnick, com. pers.).

A la fecha no existen estimaciones del número de cachalotes en aguas de Alaska ni estimaciones recientes de su abundancia en el Pacífico Norte (NMFS, 2009). Con base en la densidad promedio global reportadas por Whitehead (2002) para esta especie, algunas estimaciones sugieren que en el Pacífico Norte podría haber al menos unos 112,000 individuos (NMFS, 2009).

Las características propias de la especie, entre las que se destacan su amplia distribución, sus largos periodos de buceos, el potencial de dispersión y el patrón de segregación temporal de los machos adultos, así como la compleja estructura social, han complicado y limitado en gran medida los estudios relacionados con la delimitación de sus poblaciones.

Es por ello que durante la última década, los estudios de estructura poblacional de la especie se ha abordado mediante en el uso de marcadores genéticos, principalmente variaciones en la secuencias del DNA mitocondrial y/o polimorfismo en marcadores nucleares microsatélites (Dillon 1996; Lyrholm y Gyllensten 1998; Mesnick *et al.*, 1999; Lyrholm *et al.*, 1999; Engelhaup *et al.*, 2009; Pinela *et al.*, 2009; Kanda *et al.*, 2009). Los resultados de tales estudios indican una baja variabilidad genética, que a su vez se traduce en una reducida diferenciación genética entre cuencas oceánicas y una sutil evidencia de subdivisión dentro de las mismas (Engelhaup *et al.*, 2009, Mesnick *et al.*, 1999).

Particularmente, los estudios poblacionales de cachalotes en el Pacífico Norte habían sugerido cierto nivel de diferenciación genética para el DNA mitocondrial y una estructura poblacional marginal para marcadores nucleares tipo microsatélite (Mesnick *et al.* 2009). Sin embargo, ante la incertidumbre asociada con los bajos niveles de variabilidad genética presentes en la especie, los esfuerzos para dilucidar la presencia de diferenciación poblacional llevaron al diseño y evaluación de nuevos

marcadores como los SNPs. Los primeros resultados generados del desarrollo de SNPs para el estudio de las poblaciones de ballenas de cabeza arqueada (*Balaena mysticetus*) y cachalotes (Morin *et al.*, 2007b; Morin *et al.*, 2010, Mesnick *et al.*, 2010), hacen verlos como marcadores prometedores para su aplicación en estudios poblacionales de cetáceos.

En el análisis más reciente de la estructura poblacional de los cachalotes en el Pacífico Norte, en el que Mesnick y colaboradores (2010) utilizan tanto marcadores mitocondriales (Región control) como nucleares (microsatélites y SNPs), se concluye que el estrato de la Corriente de California muestra una diferencia significativa de los animales muestreados tanto en aguas adyacentes del Sur y de aguas distantes al Oeste de Hawai (Mesnick *et al.*, 2010).

El estudio de Mesnick y colaboradores (*op. cit*), en el que se incluyeron 287 individuos muestreados desde el Golfo de Alaska hasta Ecuador y Perú, abre la posibilidad para estimar el parentesco y evaluar si la forma de transmisión del comportamiento de depredación (entre cachalotes machos) en el Sureste del Golfo de Alaska es vertical u horizontal.

Incluir una muestra grande y un mayor número de marcadores moleculares en las estimaciones de parentesco permite aumentar el poder de discriminación y asignación de relaciones de parentesco entre los cachalotes machos que han sido observados desplegando el comportamiento de depredación (Milligan, 2003; Wang, 2010). Conocer la identidad genética de

los cachalotes machos del Pacífico Norte y en particular de los individuos asociados a embarcaciones palangreras a través de marcadores moleculares permitirá: 1) identificar la forma en la cual se transmite el comportamiento de depredación; 2) identificar la posible ruta que puede tomar el incremento de esta actividad riesgosa en el tiempo en Alaska; 3) identificar posibles sociedades entre machos adultos que se creían no existentes entre estos en latitudes altas; 4) evaluarla conectividad de los individuos con otras poblaciones donde puedan transmitir una forma de alimentación oportunista, sin mucho esfuerzo, que pueda provocar el surgimiento de depredación en áreas donde no existe; y 5) Evaluar la eficiencia de SNPs como posibles marcadores de elección para estudios de parentesco asociados a comportamiento.

HIPÓTESIS

Las crías y los individuos inmaduros de la especie poseen una alta cohesión social con sus grupos maternos en las regiones tropicales y templadas. Posteriormente al abandonar sus grupos maternos, los machos inmaduros forman grupos esporádicos con otros machos solteros conforme van adquiriendo su madurez física y sexual. Finalmente, los machos adultos pasan la mayor parte del tiempo alimentándose en altas latitudes, donde se suponen individuos solitarios.

Lo anterior, aunado a que a la fecha no se han observado grupos de hembras e inmaduros interactuando con embarcaciones de pesca demersal y que las principales zonas de pesca palangrera se localizan en latitudes altas, es más probable que la transmisión del comportamiento de depredación se de en alguna forma horizontal (aprendizaje social) entre los machos adultos que interactúan con embarcaciones de palangre en el sureste de Sitka, Alaska.

OBJETIVO GENERAL

Elucidar si el comportamiento de depredación sobre palangres por parte de los cachalotes en el Sureste de Alaska se transmite de forma vertical (por parentesco) o de forma horizontal (aprendizaje social).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar los niveles de parentesco presentes entre los cachalotes machos adultos del Pacífico Norte con base en tres marcadores moleculares (DNAMit, Microsatélites y SNPs).
2. Contrastar los niveles de parentesco entre los cachalotes muestreados dentro del área de depredación con los muestreados fuera del área de depredación.
3. Contrastar los niveles de parentesco entre los machos asociados a embarcaciones de palangre con respecto a los no asociados a palangres.
4. Comparar la resolución obtenida con diferentes estimadores de parentesco empleando los marcadores nucleares (Microsatélites y SNPs) de forma independiente y conjunta.
5. Con base a los genotipos multilocus de los machos evaluados y los datos genéticos disponibles para las poblaciones del Pacífico Norte, asignar la población de procedencia más probable y determinar si los machos depredadores corresponden a una población específica.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de piel de cachalote macho adulto analizadas en el presente trabajo fueron colectadas desde Sitka, Alaska, hasta las Islas Kuril, Rusia (Fig. 1).

Aunque la pesquería de bacalao negro y lenguado se lleva a cabo tanto en el Golfo de Alaska como en el Mar de Bering, la depredación se ha visto estar presente particularmente entre las áreas estadísticas 630-650 del Concilio para el Manejo de Pesquerías en el Pacífico Norte (Fig. 2). Actualmente, la pesca comercial de bacalao negro ocurre anualmente del 15 de marzo al 15 de noviembre en la porción superior de la plataforma continental (Hills *et al.*, 1999). La cuota de captura permitida para el 2010 fue de 483,181.82 Kg. (distribuida en 87 permisos) que refleja un decremento del 1% con respecto al 2009; sin embargo, la cuota individual aumentó en un 0.5% (5541.991 Kg.) con respecto al año anterior (Alaska Department of Fish and Game, 2010).

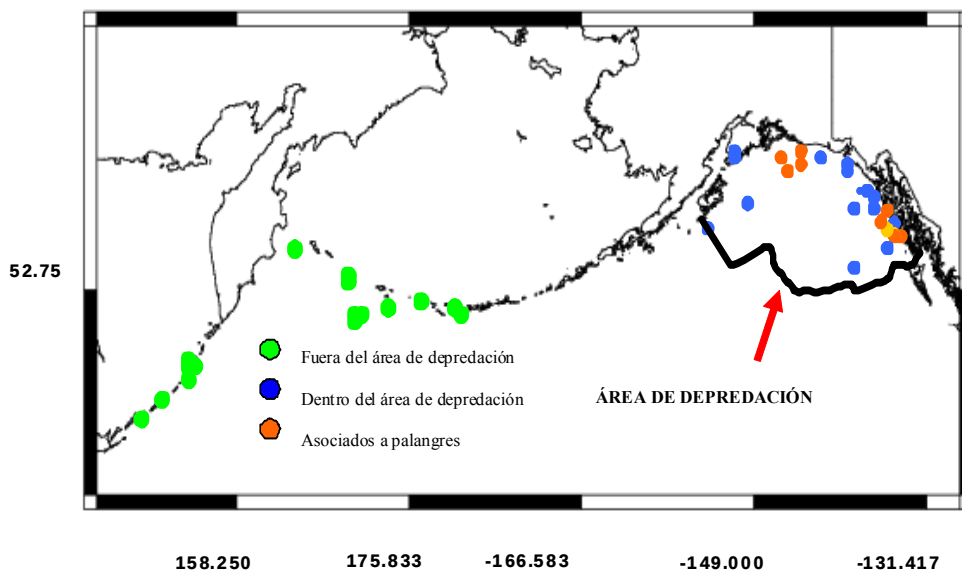


Figura 1. Mapa de la región del Pacífico Norte en el que se indica la posición geográfica de los cachalotes evaluados en el presente estudio. Modificado de Sigler *et al.* (2008).

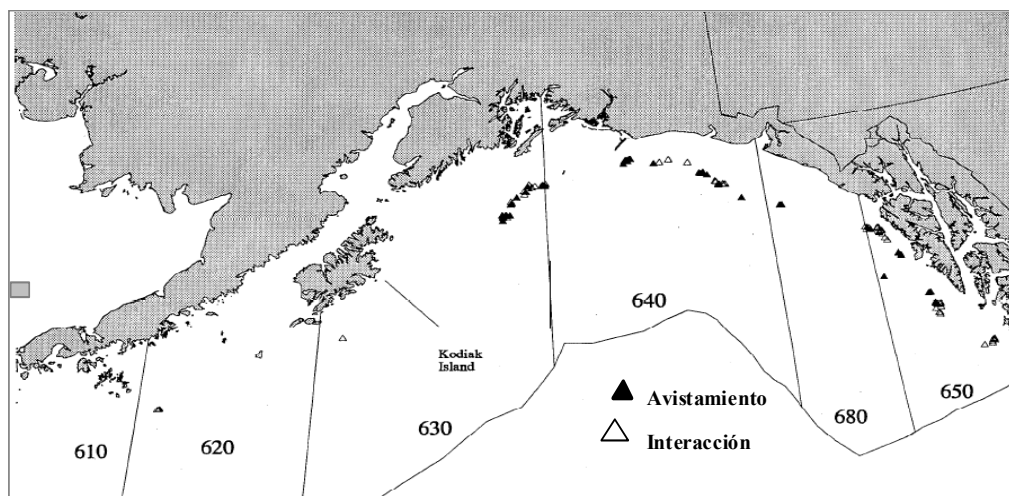


Figura 2. Áreas estadísticas del Concilio para el Manejo de Pesquerías en el Pacífico Norte. Localización de 110 cachalotes avistados durante las operaciones palangreras en el Golfo de Alaska durante 1998 (Hills et al., 1999).

COLECCIÓN DE DATOS

Como se mencionó anteriormente, a la fecha, el estudio más exhaustivo sobre los niveles de diversidad genética y estructura poblacional del los cachalotes en el Pacífico Norte es el trabajo de Mesnick y colaboradores (2010). La base de datos de dicho estudio, propiedad del Southwest Fisheries Science Center³ (SWFSC), esta conformada por 287 cachalotes para los que se cuenta con la identificación molecular del sexo, los haplotipos mitocondriales, seis microsatélites y 36 SNPs recientemente desarrollados para la especie.

Para el desarrollo del presente trabajo, se estimaron los niveles de parentesco de 39 machos adultos que forman parte de la muestra analizada por Mesnick y colaboradores (*op. cit*). Sin embargo, dado que la resolución y el sesgo de los estimadores de parentesco esta estrechamente asociado con la adecuada estimación de las frecuencias alélicas de los marcadores empleados en la población, se utilizaron adicionalmente 193 muestras de individuos (machos y hembras) obtenidas desde Ecuador y Perú hasta el Noroeste del Pacífico Norte y Hawai que se describe detalladamente en Mesnick *et al.* (2010).

La obtención de las muestras y datos de marcadores moleculares se logró gracias a la colaboración de varios investigadores a nivel mundial y a los esfuerzos del SWFSC. Concretamente, las 39 muestras asociadas al presente estudio fueron recolectadas en el período 2003-2007 por varias personas y organizaciones participantes dentro de Programa SEASWAP y otros proyectos (Dra. Janice Straley⁴, Proyecto SPLASH⁵, Craig Matkin⁶, Paul Wade⁷, John Durban⁸, Nellie Warner⁹ y Vladimir N. Burkanov¹⁰) Todas

³ SWFSC. Southwest Fishery Science Center (SWFSC) del National Oceanographic and Atmospheric Agency (NOAA), 3333 N. Torrey Pines Court La Jolla, CA 92037.

⁴ Dr. Janice M. Straley. University of Alaska Southeast, Sitka Campus, Sitka, AK 99835, USA.

⁵ SPLASH: Structure of Populations, Levels of Abundance and Status of Humpback. Whales in the North Pacific.

⁶ Craig Matkin. North Gulf Oceanic Society. 3430 Main St. Suite B1, Homer, AK., 99603, USA.

⁷ Pual Wade. NMML/NOAA Fisheries, 7600 Sand Point Way NE, Seattle, WA. 98115, USA.

las muestras fueron recolectadas de organismos vivos con excepción de dos individuos varados. Los dos animales varados fueron hallados en playas de la barrera de islas del delta del Río Cooper (Kate Wynne), Isla Montague (Alaska Sea Life Center¹¹).

Las muestras fueron agrupadas con base en dos criterios: comportamiento alimentario y posición geográfica. De esta forma, para análisis posteriores se consideraran cuatro categorías: individuos asociados a los palangres (directamente asociados o en la proximidad de las operaciones de pesca), individuos no asociados a los palangres, individuos dentro del área de depredación e individuos fuera de área de depredación (ver Fig.1). Adicionalmente, cuando ciertos individuos muestreados fueron hallados en próxima cercanía con algún otro macho o muestreados en un intervalo de tiempo menor a una hora en una misma área geográfica, se consideraron como parte del mismo grupo¹² y por tanto parte de la misma categoría dentro del análisis.

OBTENCIÓN DE DATOS MOLECULARES

El diseño de los marcadores moleculares, en análisis de las muestras y el exhaustivo control de calidad de los datos, se llevaron a cabo en el SWFSC bajo la coordinación de la Dra. Sarah Mesnick y el Dr. Phill Morin.

Aunque los datos correspondientes a la identificación molecular del sexo, las secuencias mitocondriales y los microsatélites que se habían generado previamente en el SWFSC fueron facilitados por la Dra. Mesnick, para el

⁸ John Durban. Center of Whale Research, 355 Smugglers Cove, Friday Harbor, WA. 98250, USA.

⁹ Nellie Warner. Department of Environmental Systems, UC San Diego, La Jolla, CA. 92093 USA.

¹⁰ Dr. Vladimir N. Burkanov. Kamchatka Branch of the Pacific Institute of Geography, 6, Partizanskay St., Petropavlovsk-Kamchatsky, 683000, Russia, and National Marine Mammal Laboratory, NMFS, NOAA 7600 Sand Point Way NE, Building 4 Seattle, WA 98115.

¹¹ 301 Railway Ave Seward, AK 99664, Estados Unidos (800) 224-2525

¹² “Grupo” involucra a individuos muestreados en plena cercanía unos de otros, así como también a individuos muestreados dentro de un intervalo de tiempo menor a una hora en una misma área geográfica.

desarrollo del estudio se participó activamente en la evaluación de los marcadores SNPs en la muestras del Pacífico Norte.

A pesar de que los protocolos y la base de datos moleculares empleados en este trabajo se encuentran detalladamente descritos en Mesnick y colaboradores (2010), se mencionaran brevemente algunos aspectos metodológicos relacionados con la obtención de los marcadores moleculares.

Extracción de DNA total

El DNA total fue extraído de tejido blando usando métodos estándares entre los que se incluyen cloruro de litio (Gemmell y Akiyama, 1996), precipitación proteica por cloruro de sodio (modificado de Miller *et al.*, 1988), filtros de purificación base sílica (kit QIAGEN DNeasy), método estandar de fenol/cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989) y mediante X-tractor Gene robot (Corbett Robotics). Las cantidad y la calidad de la extracción fue evaluada por electroforesis en agarosa y aquellas que produjeron poco o DNA degradado fueron procesadas de nuevo.

Identificación molecular del sexo

La identificación molecular del sexo se realizó mediante la amplificación por PCR de diferentes regiones de los cromosomas sexuales (SRY; Richard *et al.*, 1994 o Zinc Finger; Fain y LeMay 1995) y fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa. Alternativamente se empleó por PCR-Tiempo real (qPCR, Morin *et al.*, 2005), utilizando en cada corrida controles de amplificación positiva (una a hembra y un macho varados en los que se determinó el sexo en el campo) y un control negativo (sin DNA).

La inconsistencia de los datos obtenidos o una nula amplificación fue seguida por nuevas amplificaciones con metodos alternos hasta obtener congruencia en el resultado o ajustando la concentración del DNA. Aquellas muestras con ambigüedades se consideraron como de “sexo desconocido”.

Amplificación y secuenciación del DNA mitocondrial

Para determinar los diferentes linajes maternos presentes, se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 590 pb (pares de bases) que comprende la porción hipervariable I de la región control mitocondrial. Los cebadores usados, reactivos y perfiles de amplificación se encuentran descritos en Mesnick *et al.* (2010)

Posterior a la amplificación, los productos de PCR fueron purificados y secuenciados de forma automatizada en ambas direcciones (cadena pesada y ligera) empleando terminadores de secuencia BigDye™ o dRhodamine™ (Applied Biosystems). Los cromatogramas fueron evaluados mediante el programa SEQUENCHER v 4.1 o v.4.8 (Genecodes) o SEQED v.1.0.3 (Applied Biosystems).

Las inconsistencias en alguna de las cadenas, o la presencia de sitios variables que indicasen un nuevo linaje materno fueron secuenciados de nuevo para corroborar los haplotipos.

Amplificación y genotipado de microsatélites

Se amplificaron seis marcadores microsatélites marcados con fluorocromos: EV01 y EV05 (Valsecchi y Amos, 1996), SW10, SW13 y SW19 (Richard *et al.*, 1996) y D1rFCB017 (Buchanan *et al.*, 1996). En todas las corridas de PCR se incluyeron controles positivos y negativos de amplificación; en las ocasiones en las cuales los controles positivos de amplificación dieron resultados inconsistentes las corridas fueron reanalizadas mediante una segunda amplificación o procesadas de nueva cuenta desde la extracción del tejido en caso de que estuviera disponible. El éxito de la amplificación se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa en los que se incluyó una escalera molecular de 100 pb (Invitrogen™) para determinar si los productos amplificados correspondían con los tamaños esperados para cada microsatélite. Las condiciones de amplificación de los microsatélites pueden ser vistas en Mesnick *et. al* (2010).

Posterior a la amplificación, se llevaron a cabo las electroforesis capilar automatizada en un secuenciador Applied Biosystems 377, 3100 o 3130XL. Para el análisis de electrofenogramas se utilizaron los softwares GENESCAN™ o GENEMAPPER (Applied Biosystem), a través de los cuales se pueden identificar los tamaños de los alelos para generar los genotipos multilocus de cada individuo.

Aquellas corridas en las cuales alguno de individuos analizados o los controles de amplificación presentaron ambigüedades, se reamplificaron y reanalizaron para confirmar el tamaño de los alelos. Posteriormente se procedió a realizar control de análisis de datos a través del cual se identificaron individuos con el mismo genotipo multilocus que indicaba la identidad de un mismo individuo, estos datos fueron corroborados con el DNA mitocondrial y la identidad molecular del sexo.

Finalmente antes de iniciar la evaluación del parentesco entre los cachalotes machos del Pacífico Norte, se realizó la evaluación de la calidad de análisis¹³ de datos el cual se describe a detalle en Morin *et al.* (2009a,b) y brevemente en el apartado de análisis de datos.

Amplificación y genotipado de SNPs

Descubrimiento de los SNPs en cachalotes

A través de aproximaciones de gen blanco (targeted gene approach, Aitken *et al.* 2004) y locus aleatorios (Fig. 3; Morin *et al.* 2004), se detectaron SNPs en un set de muestras de cachalote. Mediante 202 pares de cebadores que amplifican secuencias homólogas (comparative anchor tagged sequences, CATS; Lyons *et al.* 1997), fueron utilizados para encontrar SNPs en DNA genómico de un cachalote por amplificación (Morin *et al.* 2007b), siguiendo los métodos de Aitken *et al.* (2004). En el caso de los locus aleatorios se obtuvieron secuencias de DNA de la biblioteca genómica de ballenas de cabeza arqueada (*Baleana mysticetus*) previamente generada para la detección de microsatélites (Huebinger *et al.* 2008). Para determinar la presencia de polimorfismos, se utilizó tejido de individuos pertenecientes a poblaciones de varias partes del mundo, que posteriormente formaron la base de controles positivos de amplificación incluidos en todas las corridas de PCR y qPCR. Es así, que la búsqueda ha producido la identificación de 36 SNPs para cachalote, de los cuales 16 fueron caracterizados de locus independientes, mientras que los 20 restantes estuvieron ligados en 8 loci diferentes (los loci ligados incluyeron desde 2 a 4 SNPs). El descubrimiento y optimización para obtener los genotipos de los 36 SNPs, se realizaron en el SWFSC y se describen con detalle en Mesnick *et al.* (2010).

¹³ La calida de análisis es la forma de control de calidad que se realiza a los datos después de determinar el tamaño de los alelos por marcados y muestra. Esto incluye evaluar la tasa de error por marcador, para posteriormente incluir la corrección en los análisis de parentesco.

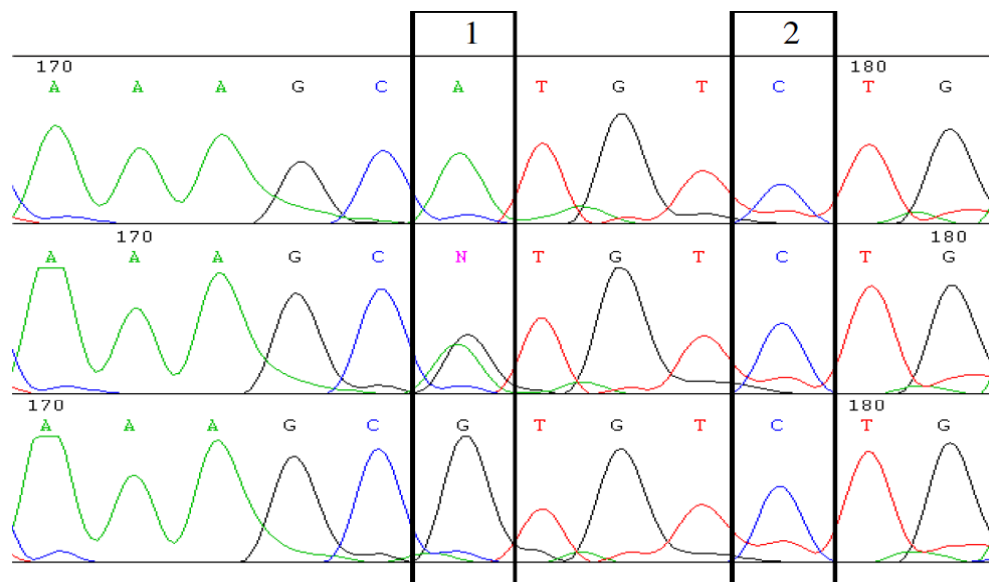


Figura 3. Descubrimiento de SNPs a través de la secuenciación de locus aleatorios. Cada secuencia distingue individuos distintos. En el recuadro 1 se observan que en la secuencia superior el individuo para dicho locus posee una secuencia de homocigoto AA, mientras que el de en medio una secuencia de heterocigoto AG y el de la base un homocigoto GG. En el recuadro 2 se presenta las secuencias de un mismo alelo CC. Sin embargo, en muchas ocasiones los programas no son capaces de distinguir las diferencias entre artefactos de PCR y cambios reales, así podría distinguirse que los tres individuos para el recuadro 2 son heterocigotos CT. De aquí la necesidad de realizar clonaciones para determinar la presencias de ambas secuencias (tomado de Vignal *et al.*, 2002).

Diseño de ensayo y amplificación de PCR múltiple para SNPs

Para el genotipado de SNPs se utiliza el sistema SNP ampliflour (Ampliflour HT SNP genotyping kit and buffers S7912, Chenomic Inc., Temecula, CA, USA), el cual funciona eficazmente en el genotipado de SNPs en cetáceos (Morin *et al.*, 2007b). Sin embargo, la calidad de los ensayos es sensible a la concentración de DNA. Para resolver dicho problema se utilizaron cebadores de PCR flanqueantes para la preamplificación individual de los loci¹⁴ antes del genotipado del ensayo ampliflour (Morin y Mccarthy 2007).

¹⁴ El anexo 1 y 2 incluyen los cebadores y SNPs evaluados en el estudio.

La preamplificación de los loci SNPs se llevo a acabo en PCRs múltiples los cuales consistieron de 28 SNPs (dentro de 23 loci) contenidos en una sola reacción de PCR (Ensayo SNPs A); tres SNPs (en dos loci) contenidos en una sola reacción (Ensayo SNPs B) y cuatro SNPs (diferentes loci) en otra reacción (Ensayo SNPs C).

La reacción de PCR para el ensayo SNPs A, consistió de una mezcla maestra de 1X de HotStar Taq Buffer (Qiagen), 1 mg/ml de BSA, 4.5 mM de $MgCl_2$, 250 μM de cada dNTP, 0.05 U/ μl de HotStartTaq Polimerasa (Qiagen), 0.15 μM de cada cebador en la mezcla de cebadores¹⁵ (Anexo 4) y DNA template (15-40 ng), llevado a un volumen de 25 μl .

El perfil de amplificación consistió en un periodo inicial de 10 minutos a 95°C, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 segundos, 30 segundos de reincorporación a 55°C y un periodo de elongación de 30 segundos a 72°C, y un periodo de elongación final de 72°C durante 4 minutos. El éxito de la amplificación fue evaluado mediante electroforesis en geles de agarosa/EtBr, usando un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder).

Los ensayos SNPs B y C consistieron de una reacción de 1X de Taq PCR Master Mix (Qiagen), 1 mg/ml de BSA, 250 μM de cada dNTP, 0.05 U/ μl de HotStartTaq Polimerasa, 0.2 μM de cada cebador en la mezcla de cebadores¹⁶ y DNA template (15-40 ng), llevado a un volumen de 25 μl .

El perfil de amplificación para ambos consistió en un periodo inicial de 15 minutos a 95°C, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 90 segundos de reincorporación a 58°C y un periodo de elongación de 90 segundos a 72°C, y un periodo de elongación final de 72°C

¹⁵ La mezcla de cebadores posee una concentración final de cada cebador de 1 μM llevados a un volumen de 1 ml.

¹⁶ La mezcla de cebadores posee una concentración final de cada cebador de 2 μM llevados a un volumen de 500 μL . A diferencia de la mezcla de los 23 pares de cebadores, esta mezcla es completada con buffer TBE y no con agua.

durante 10 minutos. El éxito de la amplificación fue evaluado de la misma forma como se mencionó anteriormente.

En cada corrida se incluyeron para todos los PCR controles positivos y negativos de amplificación. Los controles negativos consistieron de la mezcla de reacción sin DNA template, así estos productos tanto en la electroforesis como en el genotipado no producirían producto a menos de la presencia de contaminación. Los controles positivos consistieron de muestras ya amplificadas, de genotipo conocido para cada SNP, los cuales son evaluados después del genotipado y debe coincidir en cada corrida.

Los controles positivos y negativos son utilizados como base para el control de calidad de cada una de las corridas que se realizan, para la detección de contaminación y malas corridas, o fallas del instrumento. En los casos en los cuales el genotipo de los controles positivos fuese diferente al conocido, se preamplificaron y genotiparon de nuevo debido a la inconsistencia.

Genotipado de SNPs

Cada SNP fue genotipado individualmente utilizando PCR-tiempo real en un instrumento qPCR Stratagene MX3000P. Los productos preamplificados fueron típicamente diluidos 1:100 y transferidos (cuatro microlitros) a placas individuales utilizando un sistema de manipulación de líquidos automatizado. Los productos transferidos se secaron a 55°C, cubiertos con sellos de aluminio y almacenados a temperatura ambiente y protegidas de la luz hasta su posterior análisis (Morin y McCarthy, 2007).

El genotipado ampliflour requiere de cinco cebadores en total. Tres de estos cebadores no contienen marca fluorescente y son locus-específicos: dos cebadores “forward” alelo-específicos con una etiqueta única en el extremo 5' y un cebador “reverse” común, el cual es el mismo utilizado en los PCR múltiples durante la preamplificación. Los otros dos son cebadores universales ampliflour (marcados con fluorescencia), cada uno de los cuales

tiene una secuencia única 3' complementaria a los cebadores "forward" no marcados alelo-específicos y una secuencia 3' que forma horquillas estables cuando se encuentran en solución (Morin *et al.*, 2010b). Estos últimos cebadores contienen porciones similares de una molécula secuestradora (quencher) y una reportera (fluoróforo Dabsyl; JOE o FAM), localizadas en cercana proximidad mientras el cebador se encuentre conformando la horquilla (Morin y McCarthy 2007). La descripción detallada del mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la detección de la emisión fluorescente y el genotipado automatizado se encuentra bien descrita en Morin y McCarthy (2007). En el Anexo 2 se enlistan los cebadores alelos específicos empleados en el presente trabajo.

La mezcla maestra de cada ensayo amplifluor se realiza para cada una de las placas secas en un volumen final de 10 μ l por reacción. La reacción contenía 1X buffer de amplifluor (Millipore) con una concentración apropiada de $MgCl_2$ (anexo 1), 200 μ M de cada dNTP, 25 nM de cada cebador alelo-específico, 375 μ M del cebador reverse, 0.5X de cada cebador Amplifluor (con marcas fluorescentes de JOE o FAM), y 0.1 μ l de Titanium Taq (CloneTech Laboratories).

El ciclo de amplificación y la lectura de los archivos de salida se realizaron en un instrumental Stratagene MX3000P de PCR tiempo real (qPCR). El ciclo de amplificación incluyó un tiempo inicial de desnaturalización de 96°C por 4 minutos, seguido por 40 ciclos de 96°C por 10 segundos, con una apropiada temperatura de incorporación 58-62°C por 20 segundos y una temperatura de elongación de 72°C por 40 segundos.

Finalizado el genotipado de cada uno de los SNPs, estos fueron evaluados. Los alelos fueron renombrados y se realizó un gráfica de dispersión de alelos (Fig. 4). Se evaluó la consistencia en la asignación de los alelos para los controles positivos y la ausencia de amplificación de los controles negativos. En el caso en que alguna de las muestras no amplificara, el

genotipado fue repetido utilizando diferentes diluciones de DNA. Aquellos ensayos en los cuales la separación de los alelos no adecuada o ambigua, así como para aquellos en los que la amplificación fue tardía, se realizó una segunda amplificación, ya sea modificando la dilución de amplificación o el número de ciclos de amplificación.

Los resultados del genotipado de cada individuo son exportados a una base de datos en la que son incorporados el resto de los alelos evaluados en cada ensayo creando el genotipo multilocus de cada cachalote analizado. Terminado el genotipado multilocus de todos los individuos, se procedió a evaluar la calidad de análisis descrito en el siguiente apartado.

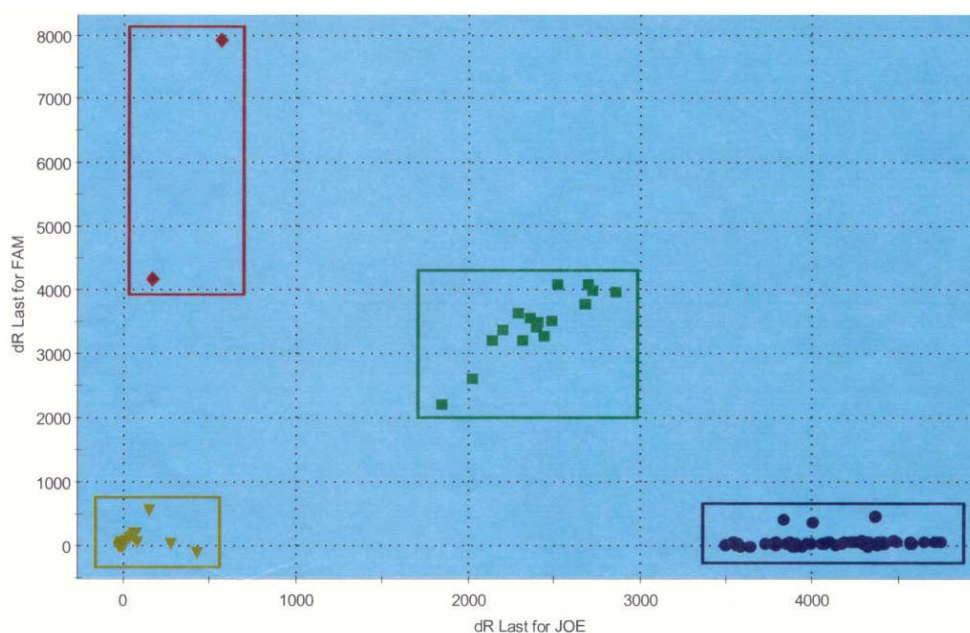


Figura 4. Modelo de dispersión de los alelos en los en el ensayo del locus CAT262. Los rombos en el recuadro rojo representan los alelos GG, los cuadros verdes denotan individuos con genotipo GA, mientras que los círculos azules representan organismos homocigotos GG. Lo triángulos invertidos representan los controles negativos de amplificación.

ANÁLISIS DE DATOS

Calidad de análisis

Para las secuencias de DNA mitocondrial y la identificación de los linajes maternos se emplearon exclusivamente secuencias de buena calidad. Con ellas se procedió a identificar los linajes maternos presentes en la muestra de los machos adultos y las posteriores estimaciones de diversidad haplotípica y nucleotídica de la muestra de machos evaluados.

Varios métodos se encuentran disponibles para investigar la calidad de datos de una muestra genética de DNA nuclear, estos pueden ir desde evaluar el número de genotipos en los que no se logró la revisión de los alelos y el porcentaje de genotipos multilocus homocigotos, hasta evaluaciones más complicadas que incluyen el efecto individual de los genotipos sobre la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (Morin *et al.*, 2009a; 2010b). Es así que para el caso de datos nucleares a través un sencillo análisis del número de homocigotos y de los alelos faltantes por individuo se pueden identificar muestras con altos niveles de amplificación diferencial (Morin *et al.* 2010b). Al graficar los valores obtenidos e identificar muestras fuera de los intervalos de la muestra global, puede procederse a evaluar de nueva cuenta el tamaño de los alelos o a procesar de nuevo la muestra desde la extracción del DNA. Cuando el nuevo análisis del genotipo continua produciendo resultados que indican una amplificación diferencial es recomendable excluirla de los análisis futuros (Morin *et al.*, 2010b).

Para el presente estudio, después de evaluar los tamaños de los alelos por locus (para datos de microsatélites) y/o los genotipos designados (en SNPs) se realizó la revisión de calidad de datos el cual incluyó eliminar los individuos del estudio con un porcentaje mayor al 50% de alelos no

identificados, calcular el porcentaje de homocigosidad en la muestra, evaluar la presencia de alelos nulos a través del programa MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004), la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el análisis Jackknife a través del programa R (Morin *et al.*, 2009a), evaluar la presencia de amplificación diferencial de los alelos (allelic drop-out; McKelvey y Schwartz, 2003) y la presencia de alelos nulos con ML-Relate (Kalinowski *et al.*, 2006). Para más detalles del control de calidad de datos y de análisis ver Morin *et al.*, 2009a y 2010b que se evalúa parte del juego de datos aquí empleados y se discuten los criterios para realizar un control de calidad exhaustivo que garantice la confiabilidad de los resultados.

Para el caso de los SNPs, aquellas muestras que produjeron un genotipo multilocus para menos del 72% de los marcadores analizados fueron eliminadas del estudio. Adicionalmente, debido a que 20 de los 36 SNPs se encontraban ligados en ocho loci, para cada set de SNPs ligados en un locus, se estimó la fase gamética de los alelos por cada muestra mediante el procedimiento Bayesiano implementado en el programa PHASE v. 2.1 (Stephens *et al.*, 2001). Para cada corrida del PHASE, se utilizaron 100 iteraciones iniciales conocidas como calentamiento que permiten reducir la dispersión de los datos, registrando solo las siguientes 1000 iteraciones con los parámetros predeterminados por el programa. Es así que para cada muestra un nuevo genotipo en fase por locus (conocido también como haplotipo SNP) fue seleccionado. Si ningún genotipo tuvo probabilidades mayores a 0.5, tales genotipos fueron considerados como desconocidos y tratados como genotipos faltantes (ver Mesnick *et al.* 2010).

Diversidad molecular y tasa de error por locus

Para los datos de DNA mitocondrial se calcularon la diversidad haplotípica (h ; Nei y Tajima 1981) y nucleotídica (π ; Nei 1987). Con los genotipos multilocus basados en los microsatélites, se estimó el número de alelos por locus y su frecuencia, el intervalo de tamaño de los alelos, la heterocigosidad

observada (H_o) y esperada (H_e), la presencia de muestras duplicadas y el contenido informativo del polimorfismo (PIC; Botstein *et al.*, 1980). Para ello se utilizó el macro de Excel Microsatellite Toolkit v.3.1.1 (Park, 2001), que además genera los archivos en formato Genepop (Raymond y Rousset, 1995) necesarios para análisis posteriores. Otro programa utilizado para la evaluación de diversidad genética fue GENALEX v.6.3 (Peakall y Smouse 2006), la utilidad de revisar la diversidad mediante diversos programas es evaluar la consistencia de los resultados obtenidos.

Para el caso de SNPs el número de alelos es conocido (marcadores bialélicos) y la evaluación se limita al alelo con la menor frecuencia (q), el cual solo puede poseer una heterocigosidad esperada y observada máxima de 0.5. Al igual que los microsatélites es posible que los SNPs sufran de alelos nulos y amplificación diferencial (Vignal *et al.*, 2002), por lo que los datos fueron sometidos a evaluaciones similares a las que se realizaron para los microsatélites.

Posterior al cálculo de diversidad, los datos nucleares fueron evaluados en el programa GIMLET v1.2.3 (Valière 2002) para calcular la tasa de error por locus la cual puede ser incluida en los análisis de parentesco y así obtener una evaluación de parentesco más eficiente.

Potencial informativo de marcadores nucleares para evaluar parentesco y probabilidad de identidad

Actualmente existen varios métodos disponibles para evaluar el parentesco y/o las relaciones de parentesco, utilizando los genotipos de los individuos evaluados así como también las frecuencias de estos en la población. Sin embargo, los esfuerzos para evaluar el potencial informativo de los marcadores utilizados en las inferencias de parentesco son escasos (Wang, 2006).

Dependiendo de los patrones de herencia, el número y la frecuencia de alelos, distintos marcadores pueden exhibir diferencias importantes con respecto a la cantidad de información explotable para inferir las relaciones de parentesco. Además, la calidad de datos puede variar entre los marcadores debido a causas como la cantidad y calidad de DNA, a los procedimientos utilizados para genotipar y a la tasa de mutación (Bonin *et al.*, 2004). Estas son diferencias en la calidad de los marcadores más que diferencias en su potencial informativo (capacidad para discriminar relaciones de parentesco); es por ello que un método apropiado que evalúe dicho potencial de los marcadores debe tomar en cuenta todas estas propiedades en cuenta. Es así como en el presente trabajo se utilizó el programa KININFO v.1.0 (Wang, 2006) ya que 1) puede determinar la cantidad de marcadores informativos requeridos para obtener un poder estadístico aceptable para inferencias de parentesco, 2) ayudar a la selección de marcadores altamente informativos y así minimizar el esfuerzo de genotipado y 3) una vez que se obtienen una cantidad de marcadores aceptables para la evaluación de parentesco, estos pueden ser usados para evaluar el poder estadístico para análisis alternativos y para elegir los métodos para el análisis de datos (Wang, 2006).

La probabilidad de identidad (PI) provee una estimación de la probabilidad promedio que tienen dos individuos sin parentesco extraídos de la misma población (con apareamiento azaroso), de tener el mismo genotipo multilocus. Ésta probabilidad indica el número mínimo de loci requeridos para tener una marca genética confiable.

En el presente trabajo el tamaño de muestra es pequeño ($N=39$), por lo que la posibilidad de re-muestrear un individuo ya muestreado es alta, y más entre los individuos asociados a los palangres ($n=13$). Para reducir la incertidumbre creada por el tamaño de muestra, se utilizó el macro GENALEX v.6.3 (Peakall y Smouse, 2006) y GIMLET v.1.2.3 (Valière, 2002) para evaluar PI.

Ambos programas utilizan la frecuencia alélica para alimentar las ecuaciones de: Paetkau *et. al.* (1994) y las modificaciones de Kendall *et. al.* (1977) para muestras pequeñas para una población donde los individuos se aparean azarosamente. Paralelamente, utilizan las ecuaciones para una población compuesta por hermanos y hermanas propuestas por Evett *et. al.* (1998) y Taberlet *et. al.* (1999). La principal diferencia entre ambos programas radica en que GIMLET proporciona la identidad para cada individuo, mientras que GENALEX la proporciona para la identidad global de la muestra.

Es importante aclarar que las estimaciones de PI se realizaron utilizando el set global de cachalote del Pacífico Norte, buscando con ello tener una representación más adecuada de las frecuencias reales de los alelos en la población y contar así con una menor incertidumbre.

Estrategias para evaluar la transmisión del comportamiento de depredación

Comparaciones entre las categorías de individuos

Inicialmente se realizó un análisis de la diversidad genética y parentesco presente dentro de la muestra (machos adultos del Pacífico Norte) y tratando de dilucidar la transmisión del comportamiento de depredación y la identidad genética de los machos adultos, los datos fueron evaluados y agrupados de diferentes formas.

Asociación de individuos por grupos: Para fines prácticos se agruparon a los individuos que fueron avistados viajando juntos, asociados a un mismo palangre o con periodos cortos de tiempo entre sus avistamientos (dentro de una misma área) fuera menor a una hora (Moreno-Medina *et al.* 2009). De esta forma se buscó identificar si existe una relación más estrecha de parentesco entre los individuos del mismo grupo que entre individuos de distinto grupo.

Machos dentro y fuera del área de depredación: Como primer paso para evaluar la forma en la que se podría estar transmitiendo el comportamiento de depredación, se evaluó el parentesco entre los machos dentro del área de depredación con respecto a los individuos fuera del área de depredación la cual esta delimitada por Singler *et al.* (2008). Esta evaluación presenta la perspectiva general de lo que se podría esperar en el análisis de individuos asociados y no asociados a los palangres además de presentar un panorama del uso diferencial del hábitat en dicha área.

Machos asociados y no asociados a los palangres: Se identificaron 13 individuos asociados a los palangres, por lo que con esta comparación se intentó determinar si los individuos asociados a los palangres presentaban relaciones de parentesco más estrechas que los no asociados a la pesquería. Un parentesco significativamente mayor entre estos individuos, aportaría evidencia de que la transmisión del comportamiento es vertical (familiar). En contraste, la ausencia de parentesco indicaría que la posible forma de transmisión es horizontal (aprendizaje social o cultural).

Evaluación de transmisión del comportamiento mediante DNA mitocondrial

Considerando la herencia matrilineal del DNA mitocondrial, como una primera aproximación de la forma en la cual pudiera evaluarse la transmisión del comportamiento de depredación, se calculó la distancia genética entre los linajes maternos presentes en la muestra para determinar si aquellos linajes en los que se ha observado el comportamiento de depredación exhibían algún patrón filogenético.

Para ello se calculó la distancia genética entre los 28 linajes identificados para la especie (NMFS 2009; Mesnick *et al.*, 2010) mediante el programa MEGA v3.0 (Kumar *et al.* 2004). La reconstrucción filogenética se efectuó con base en una distribución gamma igual a 1.413 obtenida del programa

JMODELTEST (Posada, 2008) y el método del vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987), obteniendo el árbol consenso a partir de 10000 remuestreos por bootstrap.

Evaluación de transmisión del comportamiento mediante marcadores nucleares

Actualmente, existe una amplia gama de estimadores de parentesco pareado (Grafen 1985; Thompson 1975; Queller y Goodnight 1989; Ritland 1996; Wang 2002; Wang, 2007) que utilizan datos de marcadores moleculares codominantes. Dependiendo de las características del juego de datos con el que se cuente, es recomendable evaluar varios de ellos para seleccionar así el que muestre un mejor desempeño. Sin embargo, todos estos estimadores se engloban en dos grandes grupos: los estimadores de método de momento (MM) y los de máxima verosimilitud (MV).

La evaluación de los niveles de parentesco entre cada par de individuos se realizó utilizando el programa COANCESTRY v.1 (Wang, 2010), el cual calcula siete estimadores de parentesco (R). De esta forma, se obtuvieron dos estimadores MV: TriadML¹⁷ y DyadML (Wang, 2010; Milligan, 2003); y cinco estimadores MM: Wang, LynchLi, LynchRd, Rd y QuellerGt (Wang, 2002; Lynch, 1988; Li *et al.*, 1993; Lynch y Ritland, 1999; Ritland, 1996; Queller y Goodnight, 1989). El programa permite además realizar simulaciones con las que es posible comparar la resolución de los datos y la eficiencia de los estimadores, así como una prueba estadística entre los valores promedio de parentesco de dos grupos de muestras.

Inicialmente se evaluó el parentesco presente en los 39 individuos del estudio, con el fin de tener el panorama global de R en la muestra. A continuación, se procedió a realizar comparaciones entre las categorías de individuos asociados y no asociados a palangres, así como entre individuos

¹⁷ Las siglas asignadas a los estimadores, son las empleadas en el programa Coancestry v. 1 (Wang, 2010)

muestreados dentro y fuera del área de depredación (ver Tabla 1). Tanto para la evaluación global, como para las comparaciones entre las distintas categorías, se utilizaron distintas aproximaciones en las que se incluyeron los genotipos multilocus obtenidos a partir de los microsatélites y los SNPs por separado, así como en forma combinada. Los marcadores nucleares fueron combinados siguiendo un esquema similar al reportado en el estudio de Mesnick *et al.* (2010) y que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Combinaciones de marcadores nucleares empleados para evaluar el parentesco (R). Se detalla el código de la combinación y el número total de marcadores en cada combinación (n). Microsatélites (Msats), polimorfismo de nucleótido simple (SNPs), loci sin desequilibrio de ligamiento (SL), haplotipos obtenidos mediante la evaluación de la fase gamética (HP).

Estimaciones	Loci (n)	Descripción
Msats	6	Todos los microsatélites
SNPs	36	Todos los SNPs
Msats + SNPs	42	Todos los marcadores nucleares
Msats + SNPs (16 SL + 8 HP)	30	Todos los microsatélites, los SNPs no ligados y los haplotipos SNPs resultantes del análisis Phase
Msats + SNPs (16 SL + 8 HP*)	30	Todos los microsatélites, los SNPs no ligados y el SNP con la frecuencia alélica más equilibrada dentro de cada haplotipo Phase
Msats + SNPs (8 HP)	30	Todos los microsatélites y los haplotipos SNPs resultantes del análisis Phase
Msats + SNPs (16 SL)	22	Todos los microsatélites y los SNPs no ligados
Msats + SNPs ($q \geq 0.2^{**}$)	15	Todos los microsatélites y los SNPs no ligados con frecuencias del alelo menor superiores al 20%

* Para este caso, se empleó solamente el locus con la frecuencia alélica más equilibrada para representar a cada uno de los 8 haplotipos SNP's obtenidos por el Phase. Aunque el análisis incluye el mismo número de marcadores SNP's que al usar los haplotipos, el número máximo de alelos es igual a dos.

** Para este caso se emplearon solo los 9 SNPs no ligados en los que las frecuencias para el alelo menor resultaron iguales o mayores a 0.2

Evaluación del tipo, número y polimorfismo de los marcadores en la estimación del parentesco: Simulaciones

Una forma de conocer la precisión y exactitud de las estimaciones y estimadores de parentesco es a través de la simulación de genotipos multilocus individuales con, valores de parentesco conocidos. A partir de las frecuencias alélicas observadas en la muestra, se llevo a cabo la construcción de parejas con relaciones de parentesco predeterminadas y, las cuales se usaron para llevar a cabo simulaciones en COANCESTRY v.1 (Wang, 2010).

Las simulaciones se realizaron para ambos marcadores en función del número de loci y las frecuencias alélicas observadas en la muestra global del Pacífico Norte, generando así 100 parejas de cada una de las siguientes

relaciones de parentesco: Padres-hijos (PH), hermanos completos (HC), medios hermanos (MH), primos de primer orden (PP) e individuos sin parentesco (SP). Dicha simulaciones emplearon como base 100 individuos de referencia y los intervalos de confianza para los valores de parentesco de cada relación se evaluó mediante 100 réplicas por bootstrap.

Paralelamente, se realizaron un par más de simulaciones en las cuales se consideraron frecuencias teóricas equilibradas para 16 marcadores tipo microsatélites con 10 alelos cada uno y 100 loci SNPs. En ambas simulaciones se generaron 100 parejas con las relaciones de parentesco antes mencionadas a partir de 100 individuos de referencia y 1000 réplicas por bootstrap.

Pruebas de asignación poblacional de los individuos evaluados

Para evaluar adecuadamente las posibles repercusiones del reciente aumento de las interacciones con la pesquería, es necesario explorar si existe alguna evidencia que permita determinar las poblaciones de origen de los individuos involucrados. Si se diera el caso de que la población de origen es única y además la de menor abundancia, el impacto por la pérdida de individuos por la interacción con la pesquería sería mayor.

Para asignar los individuos del presente estudio a alguna población putativa, se utilizó la subdivisión en tres estratos/áreas que analiza Mesnick *et al.* (2010): Corriente de California (CC), Pacífico central (PC), y Pacífico oriental tropical (POT). La asignación se realizó a través de los programas WHICHRUN (Banks y Eichert, 1999) y GENALEX 6 (Peakall, 2006), utilizando los dos marcadores nucleares (y las diferentes combinaciones descritas en la Tabla 1).

WHICHRUN asume que las frecuencias genotípicas en poblaciones a asignar se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg y que los loci utilizados son independientes (Peatkau *et al.* 1995; Waser y Strobeck 1998). Los valores de probabilidad para cada locus son multiplicados para obtener una serie de funciones de probabilidad multilocus que permite la asignación de cada individuo a una de las poblaciones putativas. Por su parte, el GENALEX v.6.4 realiza la asignación con base en las frecuencias alélicas en las poblaciones base (Paetkau *et al.* 1995, 2004). Así, para cada individuo, la frecuencia genotípica esperada de cada locus es calculada asumiendo apareamientos al azar en la población en cuestión.

RESULTADOS

DNA mitocondrial

Se identificaron 7 linajes maternos presentes en 39 cachalotes machos adultos del Pacífico Norte (tabla II). Los cuales representan el 41.2% de los linajes presentes en el Pacífico Norte y el 25% a nivel mundial. La frecuencia relativa de los haplotipos fue heterogénea, ya que los linajes *a*, *b* y *c* están representados por 87% de los individuos muestreados, mientras que los haplotipos *e*, *j*, *k* y *o* fueron menos frecuentes (Fig. 5).

Los linajes *a*, *b* y *c* representaron a los individuos asociados a embarcaciones de palangre. Mientras que los no asociados a palangres estuvieron representados por los siete haplotipos (Fig. 5). En la subdivisión dentro y fuera del área de depredación, los haplotipos *a*, *b*, *c* y *e* estuvieron presentes en los individuos muestreados dentro del área considerada como la de mayor depredación (Fig. 1 y 2, Tabla II) y en los individuos muestreados fuera del área de depredación estuvieron presentes los siete haplotipos dentro de la muestra. La distribución de los linajes entre los grupos fue heterogénea ya que en los nueve grupos identificados solo 3 se caracterizaron por poseer el mismo linaje materno (Tabla II); el resto de los grupos estuvieron representados por dos linajes maternos en los cuales un linaje dominaba más que el otro.

La diversidad haplotípica (H) y nucleotídica (π) de los machos asociados a palangres produjeron resultados equivalentes (Tabla III) a la diversidad entre los machos no asociados. Resultados similares fueron obtenidos para evaluación dentro y fuera del área de depredación.

Tabla II. Distribución de haplotipos dentro de los grupos. Las letras en paréntesis representan los haplotipos mitocondriales de cada individuo. No. Avis (número de avistamiento).

Zona	Comportamiento	No. Avis	ID
Dentro del área	Asociados a palangres	1	10339 (C), 10400 (A)
		2	34557 (A), 34558 (A), 34559 (A), 34562 (B)
		3	44015 (C), 44016 (C)
		4	52892 (A)
		5	60878 (C)
		6	60879 (B), 60880 (B)
		7	67880 (A)
	No asociados a palangres	8	4848* (A)
		9	28393 (A)
		10	28399 (A)
		11	41462 (E)
		12	41492 (C)
		13	43541 (B), 43542 (A), 43543 (A), 43544 (A)
		14	45756 (B), 45757 (B), 45758 (B)
		15	68973* (E)
Fuera del área	No asociados a palangres	16	28411 (A)
		17	28556 (A), 28557 (K)
		18	28559 (B)
		19	35340 (A)
		20	43749 (A), 43750 (A)
		21	57917 (C)
		22	70555 (B), 70556 (A)
		23	70558 (O)
		24	70559 (J)
		25	70560 (C)

*Representa los individuos varados.

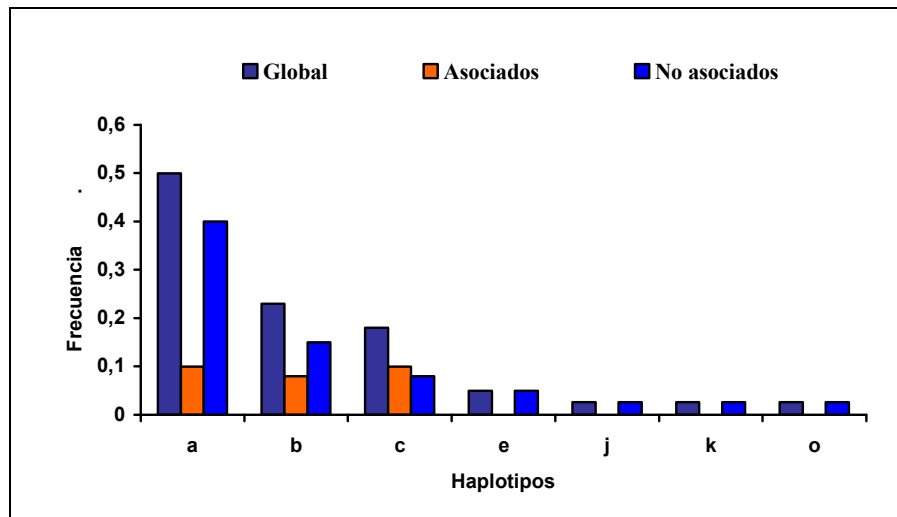


Figura 5. Frecuencia relativa de linajes mitocondriales presentes entre los cachalotes machos del Pacífico Norte (global). La suma de las frecuencias de Asociados (a palangres) y No asociados por linaje, es igual a la frecuencia global en la muestra.

Tabla III. Diversidad genética mitocondrial para las distintas categorías de evaluación. Número de individuos (n) en la agrupación, número de haplotipos (N_H), diversidad haplotípica (H) y nucleotídica (Π_n).

Agrupación	n	N_H	H	Π_n
Global	232	17	0.803	0.004 ± 0.003
Machos	39	7	0.720	0.003 ± 0.002
Asociados	13	3	0.710	0.003 ± 0.002
No asociados	26	7	0.730	0.003 ± 0.002
Dentro del área	13	4	0.699	0.002 ± 0.002
Fuera del área	26	6	0.782	0.005 ± 0.003

Diversidad molecular de marcadores nucleares

Usando el conjunto de 6 microsatélites y 36 SNPs descrito en la sección anterior, se logró evaluar una base de datos de 232 individuos entre los que se incluyen los machos de presente estudio ($n=39$). La subdivisión de machos asociados a palangres y no asociados fue igual a 13 y 26 individuos

respectivamente; mientras que para la subdivisión de dentro y fuera del área de depredación estuvieron representados por 26 y 13. Sin embargo, la evidencia de ligamiento de algunos SNPs y el potencial informativo de cada marcador permite diferentes combinaciones para el manejo de datos para parentesco descrito en la sección de métodos.

La diversidad genética obtenida para los marcadores nucleares, el número de alelos por locus para los microsatélites y la frecuencia de estos se pueden observar en el Tabla IV. El número de alelos por locus varió desde nueve hasta veintiséis; mientras que la descripción de datos de SNPs se centró en las frecuencias del alelo menor (q) para cada SNP variando desde 0.02 hasta 0.48. Los seis microsatélites utilizados estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$); mientras que en SNPs los loci fuera del equilibrio fueron F9Y80, PmABHD5R671, PmPHGDHR223 y PmPHGDHY321.

Se identificaron alelos raros en dos de los 39 machos evaluados; el alelo 145 en el locus SW10 estuvo representado por un solo individuo (34559), del mismo modo que el alelo 158 en el locus SW13 (34562). A excepción de los anteriores, los alelos por loci microsatélites dentro de la población estuvieron presentes en un 80% entre los cachalotes machos (Anexo 3)

La probabilidad de identidad multilocus de microsatélites y SNPs se describe en la tabla V. Para microsatélites la probabilidad de identidad más alta la presentó el locus SW19 mientras que para los SNPs la tuvo INTS368. En conjunto los microsatélites presentan una PI de 4.34×10^{-9} , lo que constituye que la probabilidad de que dos individuos sin parentesco presenten genotipos multilocus idénticos sea 1 en 230,000,000 individuos aproximadamente. En SNPs, CATR262 tiene una probabilidad individual de 5.325×10^{-2} , esto es, la probabilidad de que dos cachalotes compartan el mismo genotipo es uno de casi 2 individuos. Para obtener la misma resolución que seis microsatélites son necesarios 30 SNPs; usando el set completo de SNPs la probabilidad aumentó dos órdenes de magnitud, dando

una PI de 7.35×10^{-11} . Ahora bien, evaluando en conjunto los 42 marcadores nucleares, la probabilidad de identidad es mucho más baja ya que sobrepasa la probabilidad de 10 billones aproximadamente (Tabla V). Sin embargo, hay que tener en mente que 20 de los loci se encuentra ligados en 8 cromosomas distintos.

Tabla IV. Diversidad genética por locus para los marcadores nucleares. Se indica el número de alelos por locus (**N_a**), la heterocigosidad observada (**H_o**) y esperada (**H_e**) obtenida del programa MSTOOLS y el valor de significancia para la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (**P**). En negritas se destacan los locus fuera del equilibrio.

Locus	N_a	H_o	H_e	Valor P
D17*	21	0.911	0.911	ns
EV1*	13	0.638	0.641	ns
EV5*	9	0.739	0.738	ns
SW10*	14	0.872	0.872	ns
SW13*	13	0.835	0.835	ns
SW19*	26	0.922	0.923	ns
CATR262	2	0.302	0.302	ns
CATR456	2	0.318	0.318	ns
CHRNAR76	2	0.106	0.107	ns
CHRNA1Y111	2	0.320	0.320	ns
CKK273	2	0.496	0.496	ns
CSF2R278	2	0.076	0.076	ns
CSF2K552	2	0.483	0.484	ns
CSF2Y589	2	0.290	0.290	ns
DRD2Y679	2	0.500	0.500	ns
ELN40K209	2	0.476	0.477	ns
EPOR237	2	0.171	0.171	ns
EPOY292	2	0.354	0.352	ns
F9Y80	2	0.496	0.495	s
GRPY190	2	0.068	0.068	ns
IFNGY234	2	0.180	0.183	ns
INTS368	2	0.501	0.501	ns
PKMY237	2	0.295	0.295	ns
PmABHD5M274	2	0.088	0.092	ns
PmABHD5Y447	2	0.408	0.408	ns
PmABHD5R671	2	0.404	0.406	s
PmBH92S122	2	0.463	0.463	ns
PmBH92Y172	2	0.378	0.378	ns
PmCHYR304	2	0.043	0.043	ns
PmDDX5R109	2	0.442	0.442	ns
PmHSPA9Y220	2	0.137	0.137	ns
PmLAPTM4R553	2	0.248	0.251	ns
PmMYL4R358	2	0.447	0.448	ns
PmPHGDHS172	2	0.385	0.385	ns
PmPHGDHM200	2	0.158	0.162	ns
PmPHGDHR223	2	0.249	0.249	s
PmPHGDHY321	2	0.483	0.483	s
PNDR111	2	0.500	0.499	ns
RDSk456	2	0.235	0.235	ns
RYR2R327	2	0.450	0.451	ns
SPTBN1S279	2	0.303	0.303	ns
SPTBN1Y753	2	0.206	0.206	ns

* Representan los loci microsatélites

Tabla V. Probabilidad de identidad para cada tipo de marcador multilocus (PI_{MM}) y para la combinación de ambos marcadores nucleares (PI_{42MN}). Se hace referencia al potencial informativo individual de los loci (PIC) y su clasificación por importancia relativa (P_{IP}).

Locus	PI_{MM}	PI_{42MN}	P_{IP}	PIC
D17*	1.492×10^{-2}	1.492×10^{-02}	2	0.9018
EV1*	2.397×10^{-03}	2.397×10^{-03}	6	0.6109
EV5*	2.628×10^{-04}	2.628×10^{-04}	5	0.6967
SW10*	8.011×10^{-06}	8.011×10^{-06}	3	0.8566
SW13*	3.638×10^{-07}	3.638×10^{-07}	4	0.8153
SW19*	4.343×10^{-09}	4.343×10^{-09}	1	0.9149
CATR262	5.325×10^{-01}	2.313×10^{-09}	27	0.2559
CATR456	2.747×10^{-01}	1.193×10^{-09}	25	0.2666
CHRNAR76	2.208×10^{-01}	9.587×10^{-10}	38	0.1006
CHRNA1Y111	1.134×10^{-01}	4.924×10^{-10}	24	0.2681
CKK273	4.283×10^{-02}	1.860×10^{-10}	10	0.3726
CSF2R278	3.670×10^{-02}	1.594×10^{-10}	40	0.0727
CSF2K552	1.411×10^{-02}	6.130×10^{-11}	12	0.3663
CSF2Y589	7.706×10^{-03}	3.347×10^{-11}	29	0.2474
DRD2Y679	2.892×10^{-03}	1.256×10^{-11}	8	0.3746
ELN40K209	1.123×10^{-03}	4.877×10^{-12}	14	0.3624
EPOR237	7.877×10^{-04}	3.421×10^{-12}	35	0.1561
EPOY292	3.797×10^{-04}	1.649×10^{-12}	23	0.2893
F9Y80	1.434×10^{-04}	6.227×10^{-13}	11	0.3721
GRPY190	1.250×10^{-04}	5.427×10^{-13}	41	0.0652
IFNGY234	8.604×10^{-05}	3.737×10^{-13}	34	0.1661
INTS368	3.227×10^{-05}	1.402×10^{-13}	7	0.3749
PKMY237	1.745×10^{-05}	7.577×10^{-14}	28	0.2508
PmABHD5M274	1.457×10^{-05}	6.328×10^{-14}	39	0.0876
PmABHD5Y447	6.315×10^{-06}	2.742×10^{-14}	19	0.3244
PmABHD5R671	2.756×10^{-06}	1.197×10^{-14}	20	0.3231
PmBH92S122	1.093×10^{-06}	4.745×10^{-15}	15	0.3553
PmBH92Y172	5.005×10^{-07}	2.174×10^{-15}	22	0.3060
PmCHYR304	4.592×10^{-07}	1.994×10^{-15}	42	0.0416
PmDDX5R109	1.882×10^{-07}	8.175×10^{-16}	18	0.3439
PmHSPA9Y220	1.418×10^{-07}	6.159×10^{-16}	37	0.1275
PmLAPTM4R553	1.117×10^{-08}	3.669×10^{-16}	31	0.2193
PmMYL4R358	3.428×10^{-08}	1.489×10^{-16}	17	0.3473
PmPHGDHS172	1.549×10^{-08}	6.727×10^{-17}	21	0.3106
PmPHGDHM200	1.117×10^{-08}	4.851×10^{-17}	36	0.1481
PmPHGDHR223	6.648×10^{-09}	2.887×10^{-17}	30	0.2172
PmPHGDHY321	2.557×10^{-09}	1.111×10^{-17}	13	0.3658
PNDR111	9.612×10^{-10}	4.174×10^{-18}	9	0.3741
RDSk456	5.891×10^{-10}	2.559×10^{-18}	32	0.2067
RYR2R327	2.385×10^{-10}	1.036×10^{-18}	16	0.3490
SPTBN1S279	1.268×10^{-10}	5.506×10^{-19}	26	0.2564
SPTBN1Y753	8.255×10^{-11}	3.585×10^{-19}	33	0.1845

Formas de evaluar la transmisión de depredación

DNA mitocondrial

A pesar de que los haplotipos *a*, *b* y *c* fueron los únicos encontrados en los machos depredadores de palangres y los más abundantes dentro del área de depredación, estos haplotipos no fueron exclusivos de dichas categorías. Aunado a esto, los haplotipos mencionados fueron también los de mayor frecuencia en la categoría de no asociados a palangre y en la categoría de individuos fuera del área de depredación (Tabla II, Fig. 5).

El análisis filogenético intraespecífico a nivel mitocondrial, ubicó a estos linajes en distintas ramas (Fig. 6). En conjunto, las frecuencias haplotípicas y la topología del árbol filogenético no aportan evidencia de que los individuos que presentan el comportamiento de depredación pertenezcan a un clado en particular y de tal comportamiento pudiera haber sido transmitido matrilinealmente.

Niveles de parentesco con base en los marcadores nucleares

Utilizando el programa COANCESTRY v.1 se obtuvieron siete estimadores de parentesco usando como base las frecuencias de la muestra global del Pacífico Norte reportadas por Mesnick *et al.* (2010). Los intervalos de confianza se calcularon con base en 100 pares de individuos de referencia y 100 remuestreos por bootstrap.

La correlación entre los siete fue distinta para cada set de datos, mientras que los estimadores de máxima verosimilitud (TriolML y DyadML) tuvieron coeficientes de correlación arriba de 0.9, los de método de momento variaron entre ellos desde 0.41 hasta 0.99. En el Anexo 4 se presentan las matrices de correlación para los diferentes estimadores de parentesco y para las siguientes combinaciones de marcadores.

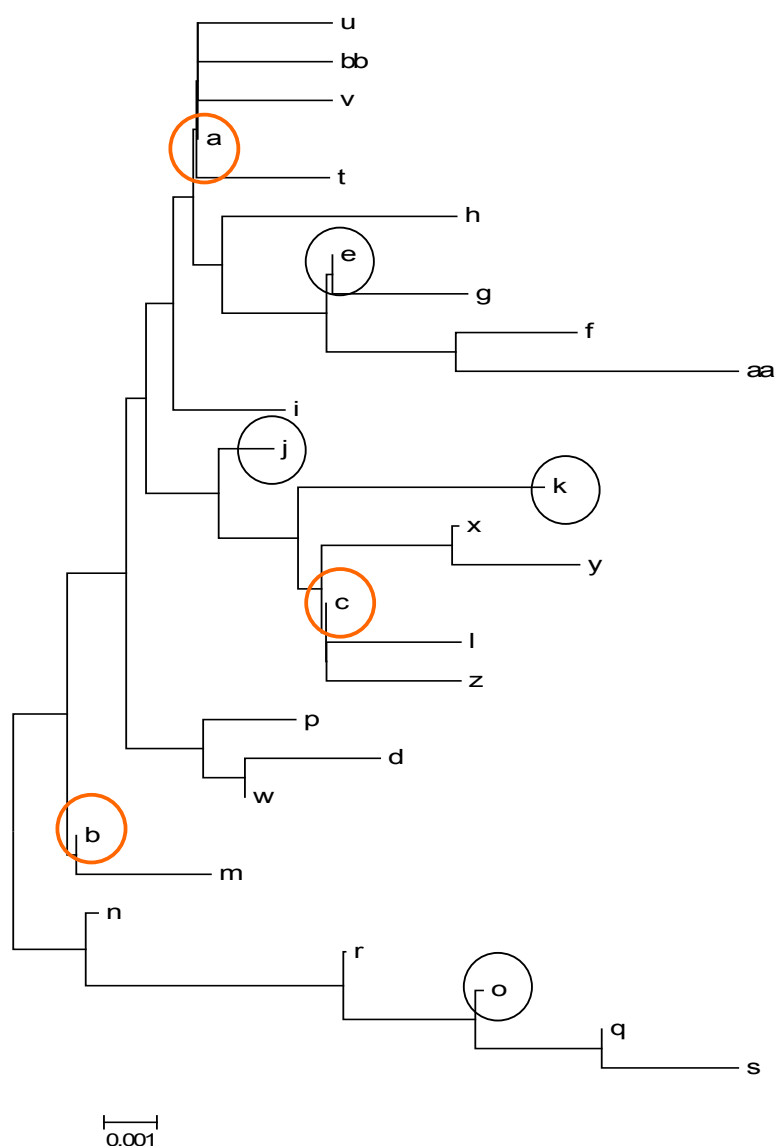


Figura 6. Relaciones filogenéticas intraespecíficas para los linajes maternos (representado con letras) de cachalote a nivel mundial (ver Mesnick 2001). Las letras en círculos representan los haplotipos presentes entre los cachalotes machos del Pacífico Norte. Los círculos en color naranja representan los linajes de los machos asociados a palangres.

A pesar de que el promedio de los valores de parentesco en todos los niveles evaluados dentro de los 7 estimadores mostraron valores de cero (que indica no parentesco), es importante recordar que esta es una unidad continua mientras que las relaciones, indican una relación puntual entre individuos (p.e. padres e hijos, hermanos completos, medios hermanos, primos, etc.).

Para las estimaciones de parentesco entre individuos asociados a palangre y no asociados, así como para individuos dentro y fuera del área de depredación, se utilizó el estimador de máxima verosimilitud TriolML debido a las características del estimador y a que su varianza fue la menor al comparar los estimadores (ver Anexo 4).

Comparación entre las categorías de asociación a palangres y ubicación geográfica con respecto al área de depredación

Con base en las categorías descritas en la tabla I, se compararon las estimaciones de parentesco promedio de los individuos que fueron observados asociados y no asociados a palangres, así como los observados dentro y fuera del área de depredación. Las comparaciones se realizaron en el programa COANCESTRY v.1. (Wang, 2010), utilizando 100 individuos de referencia, con 10000 remuestreos por bootstrap. Las medias y la significancia estadística para las comparaciones entre categorías de asociación a los palangres, así como de ubicación con respecto al área de depredación se presentan en la tabla VI.

No se observaron diferencias significativas entre las categorías comparadas, por lo que tampoco los marcadores nucleares aportaron evidencia de que parientes cercanos exhiban el comportamiento de depredación o de que los individuos dentro del área de depredación estuvieran más relacionados genéticamente que aquellos observados fuera de esta área.

El análisis de diferencias por área geográfica se llevo a acabo de la misma forma que el anterior, utilizando 100 individuos de referencia y 10000 bootstraps, en cada una de las aproximaciones realizadas. Con un intervalo de confianza al 95% no se encontraron diferencias significativas entre los valores de parentesco de los individuos dentro y fuera del área de depredación (tabla VI). Lo que corrobora que el parentesco no es la fuerza de cohesión entre los cachalotes avistados en el área.

Parentesco entre individuos dentro de un mismo grupo

Los individuos avistados en una misma área geográfica dentro de un intervalo de tiempo menor a una hora fueron colocados en grupos para evaluar el parentesco entre estos, debido a las habilidades de la especie para recorrer distancias durante su alimentación. De esta forma se identificaron 9 grupos (tabla II) en los cuales el parentesco entre los individuos dentro de estos fue evaluado. En cuatro de los 9 grupos los individuos (dentro de su grupo) compartieron el mismo haplotipo mitocondrial (tabla II), por lo que las probabilidades de parentesco podían estar presentes. Sin embargo, al realizar las 8 estimaciones, para cada grupo se observó, que un mismo par de individuos podía exhibir valores de parentesco desde cero hasta casi 0.5, valores correspondientes a individuos sin parentesco ($R=0$) hasta parientes de primer orden ($R=0.45$), respectivamente. En la tabla VII se detallan dos ejemplos de los valores de parentesco observados entre pares de individuos asociados y no asociados a palangres.

Por tal razón se procedió a realizar simulaciones que permitieran proporcionar un intervalo que delimitara la frontera entre los diferentes niveles de parentesco, utilizando los mejores escenarios y el número de marcadores necesarios para tener un menor traslape de intervalos entre niveles de parentesco.

Tabla VI. Valores promedio de parentesco y varianza dentro de los distintos grupos de cachalotes del Pacífico Norte evaluados en el presente estudio. Se detalla la clasificación de los machos con referencia a su comportamiento y área de muestreo, así como el valor de significancia para las pruebas pareadas entre categorías de machos para cada combinación de marcadores.

Estimación	Global (n=232)	Machos (n=39)	Comportamiento			Zona		Valor- P
			Asociados	No asociados	Valor-P	Dentro	Fuera	
Msats	0.052±0.008	0.055±0.008	0.054±0.055	0.054 ±0.008	ns	0.062±0.008	0.056±0.009	ns
SNPs	0.088±0.015	0.078±0.012	0.037±0.004	0.04±0.003	ns	0.081±0.013	0.063±0.009	ns
Msats + SNPs	0.043±0.005	0.038±0.003	0.080±0.014	0.077±0.011	ns	0.040±0.004	0.036±0.003	ns
Msats + SNPs (16 SL + 8 HP)	0.038±0.004	0.038±0.003	0.032±0.003	0.039±0.003	ns	0.040±0.004	0.036±0.003	ns
Msats + SNPs (16 SL + 8 HP*)	0.038±0.004	0.038±0.003	0.045±0.004	0.041±0.003	ns	0.041±0.004	0.035±0.003	ns
Msats + SNPs (8 HP)	0.041±0.004	0.041±0.004	0.043±0.004	0.045±0.004	ns	0.048±0.005	0.040±0.003	ns
Msats + SNPs (16 SL)	0.042±0.005	0.043±0.004	0.032±0.003	0.04±0.003	ns	0.045±0.005	0.041±0.004	ns
Msats + SNPs ($q \geq 0.2^{**}$)	0.044±0.006	0.045±0.004	0.038±0.003	0.044±0.005	ns	0.048±0.005	0.042±0.004	ns

Tabla VII. Valores de parentesco (R) estimados entre algunos individuos asociados a palangre dentro de un grupo y no asociados dentro de un grupo. Los valores de r para el primer caso van desde sin parentesco (SP) hasta medios hermanos (MH). Mientras que el en el segundo grupo los valores de r van desde hermanos completos HC hasta sin parentesco (SP). Se indican las estimaciones obtenidas a través de las ocho combinaciones de loci nucleares evaluadas. PP=Primos de primer orden, PS=Primos de segundo orden.

Estimación	Asociados	No asociados
	10399-10400	70555-70556
Msats	0.000 (SP)	0.461 (HC)
SNPs	0.279 (MH)	0.000 (SP)
Msats + SNPs	0.155 (PP)	0.060 (SP)
Msats + SNPs (16 SL + 8 HP)	0.124 (PP)	0.075 (SP)
Msats + SNPs (16 SL + 8 HP*)	0.134 (PP)	0.081 (SP)
Msats + SNPs (8 HP)	0.066 (SP)	0.156 (PP)
Msats + SNPs (16 SL)	0.125 (PP)	0.129 (PP)
Msats + SNPs ($q \geq 0.2^{**}$)	0.104 (PS)	0.239 (MH)

Simulación de escenarios para realizar la correcta asignación de parentesco

Con base a los resultados obtenidos en el apartado de parentesco, se realizaron diferentes simulaciones para las que se consideraron las frecuencias alélicas observadas en cada uno de los marcadores nucleares (ver Anexo 4) en la muestra global del Pacífico Norte. Construyéndose así los genotipos multilocus de 500 parejas de individuos, correspondientes a 100 pares de individuos de cada una de los siguientes niveles de parentesco: Padres e hijos (PH), hermanos completos (HC), medios hermanos (MH), primos de primer orden (PP) y sin parentesco (SP). La

simulación se efectuó utilizando 100 individuos de referencia y 100 réplicas por bootstrap para obtener los intervalos de confianza.

Se pudo observar que para datos de microsatélites fue posible distinguir entre relaciones de primer orden de los individuos sin relaciones de parentesco (Fig. 7). Las relaciones de primer orden, que incluyen a los PH y HC, se traslapan considerablemente debido a que el intervalo de confianza de HC resultó muy amplio. Dicha situación también se observó entre las relaciones de segundo orden (MH y PP), así como entre estas últimas de los SP, en donde los intervalos de confianza se sobreponen. Resultados similares se obtuvieron para la simulación del mismo número de parejas y parámetros con datos SNPs (Fig. 8).

Como puede apreciarse en las figuras 7-8, fue posible distinguir entre individuos con parentesco de primer orden y aquellos sin parentesco. Por esta razón, se simularon diferentes relaciones de parentesco. No obstante queda la duda de cuantos marcadores serían los necesarios para lograr distinguir diferencias más finas.

Para contestar la interrogante mencionada se realizó la construcción de 16 microsatélites con 10 alelos cada uno aproximadamente. Estos alelos con frecuencias iguales dentro de cada uno de los microsatélites en ausencia de error estándar, usando el mismo número de relaciones y parámetros mencionados anteriormente. Es así como se construyó la figura 9 que muestra los resultados de dicha simulación. La particularidad de esta simulación destaca que a pesar de utilizar un set ideal de microsatélites altamente polimórficos, 16 al parecer son insuficientes para lograr distinguir incluso los individuos sin parentesco de los individuos con parentesco. Pero, si fue posible distinguir entre las relaciones PH de SP, y en los intervalos de las relaciones de segundo orden los intervalos fueron menores.

El mismo diseño fue realizado para SNPs, sin embargo el número de estos, estuvo en función a los parámetros de Laval *et al.* (2002), para obtener distancias genéticas similares a las de los microsatélites utilizados (~90 SNPs). Con las simulaciones generadas para 100 SNPs, se evidenció que este número de SNPs no serían suficientes para detectar relaciones finas de parentesco (Fig. 10) y que el número de marcadores SNPs para discernir confiablemente dichas relaciones sería al menos tres veces mayor al aquí simulado. Lo que sí es evidente es la similitud de intervalos dentro de las relaciones de segundo orden.

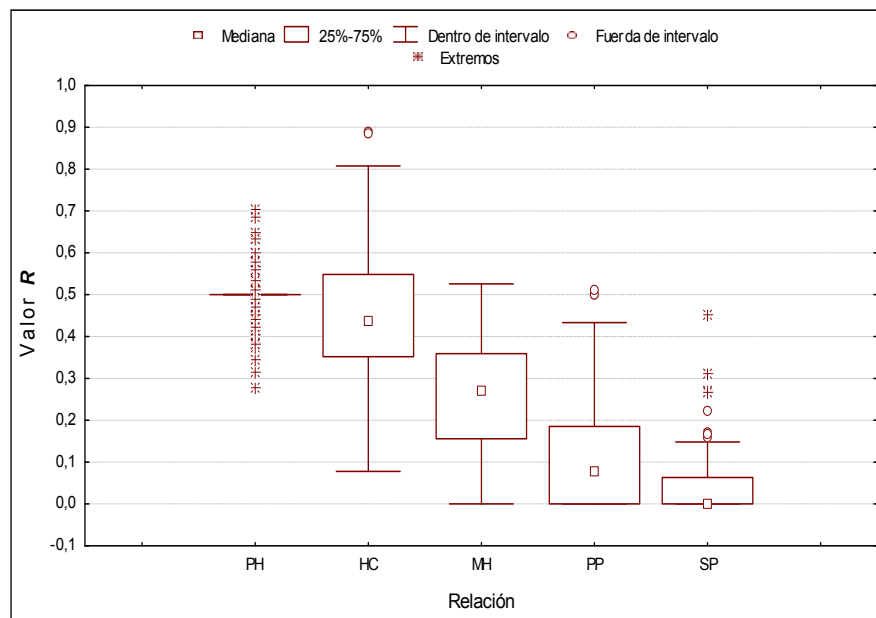


Figura 7. Distribución e intervalos de la muestra simulada usando las frecuencias alélicas de loci microsatélites en la muestra. PH = padres e hijos, HC = hermanos completos, MH = medios hermanos, PP = primos de primer orden y PS = sin parentesco.

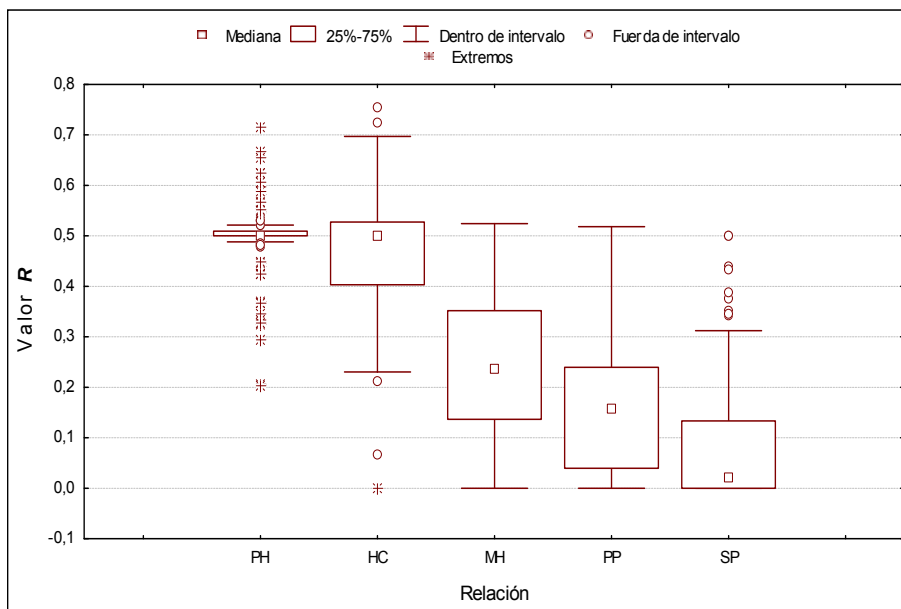


Figura 8. Distribución e intervalos de la muestra simulada usando las frecuencias alélicas de loci SNPs en la muestra.

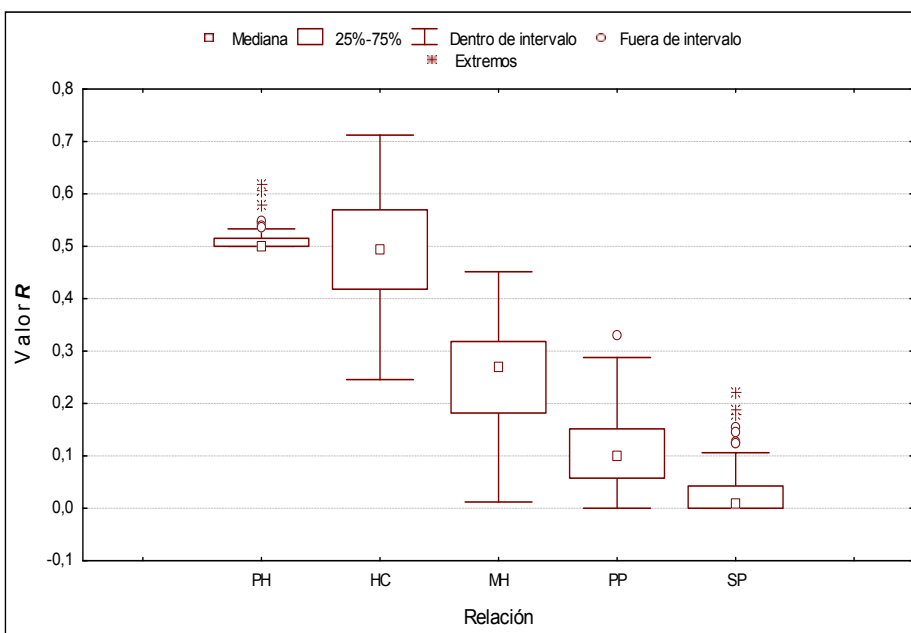


Figura 9. Distribución e intervalos de relaciones de parentesco observados en la simulación de 16 microsatélites independientes con alelos equi-frecuentes.

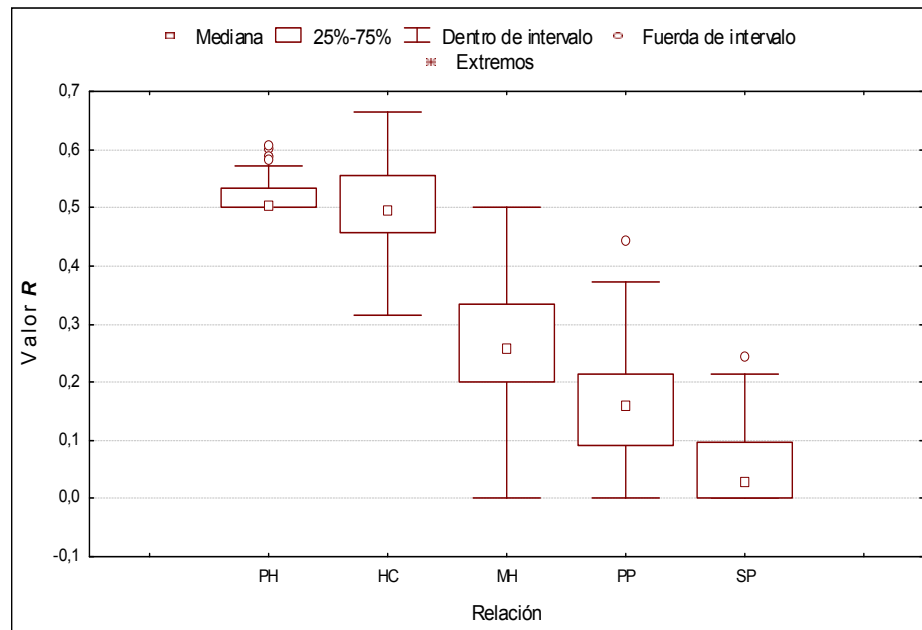


Figura 10. Distribución e intervalos de relaciones de parentesco observados en la simulación de 100 SNPs independientes con frecuencias alélicas equilibradas.

Asignación de la población

Empleando como base los estratos geográficos recientemente evaluados para el análisis de la estructura poblacional de cachalotes en el Pacífico Norte (Mesnick *et al.*, 2010), se realizó el análisis de asignación poblacional para los 39 machos adultos a cada uno de las siguientes poblaciones putativas: Corriente de California (CC), Pacífico Central (PC) y Pacífico Oriental Tropical (POT).

Los resultados de la asignación generados para cada una de las diferentes combinaciones de marcadores moleculares se consensuaron en función del mayor número de coincidencias a alguna población putativa (Tabla VIII, Anexo 5). Un 38.46% de la muestra fue asignada a la población CC, mientras que el 30.76 y 20.51% estuvieron asignadas a PC y POT respectivamente. Cerca del 10% de la muestra no fue asignada con una mayor probabilidad a ninguna población debido a la inconsistencia de las distintas combinaciones de marcadores genéticos.

Proporciones muy similares de los individuos fueron asignados a cada una de las tres poblaciones o estratos geográficos putativos al considerar las categorías de asociados y no asociados a palangres, así como para las de dentro y fuera del área de depredación (Tabla VIII).

En conjunto, estos resultados sugieren que los individuos asociados a palangre no pertenecen a una población en particular, con lo que no parece haber evidencia de que el comportamiento de depredación se encuentre asociado a una población o a un estrato geográfico específico.

Tabla VIII. Porcentajes de asignación de individuos en las clasificaciones realizadas. CC, PC y POT corresponden a los estratos de: la Corriente de California, Pacífico Central y Pacífico Oriental Tropical respectivamente. En algunos individuos no fue posible asignar población (S/A) debido a las inconsistencias en las 8 estimaciones realizadas.

Estrato	Total (n=39)	Comportamiento		Zona	
		Asociados	No asociados	Dentro	Fuera
CC	38.46	38.46	38.46	38.46	38.46
PC	30.76	30.77	30.77	30.77	30.76
POT	20.51	30.77	15.38	23.08	15.38
S/A	10.25	0.000	15.38	7.69	15.38

DISCUSIÓN

Tamaño de muestra e incertidumbre para evaluar parentesco

Para el presente trabajo se evaluaron 39 cachalotes machos adultos que fueron observados entre el sureste de Alaska hasta las Islas Kuril en Rusia. De estos, solamente 13 se consideraron asociados a actividades de depredación, por lo que la primera limitante metodológica en la evaluación es el tamaño de muestra. Sin embargo, dado que la mayor parte de los estudios realizados en esta especie se han enfocado en los grupos de hembras e inmaduros, esta pequeña muestra tiene un gran valor por el hecho de que el conocimiento que se tiene sobre los machos adultos es escaso. La importancia de la muestra biológica aquí analizada es aún mayor, tomando en cuenta que representa el primer estudio con marcadores moleculares que centra su atención en los machos adultos de la especie.

Aunque, estadísticamente una muestra de 39 casos no es lo suficientemente grande para realizar estimaciones no sesgadas de las relaciones de parentesco (Milligan, 2003; Wang, 2002), para reducir la incertidumbre estadística asociada con el reducido tamaño de muestra, se evaluaron adicionalmente 192 individuos (grupos de hembras e inmaduros y otros machos adultos), distribuidos desde Ecuador y Perú hasta la Corriente de California y Archipiélago de Hawai. De esta forma, a partir de una muestra de 232 individuos se calcularon las frecuencias alélicas que fueron la base para las estimaciones de parentesco y la evaluación de la posible forma de

transmisión del comportamiento de depredación. Una muestra grande, permite reducir la dispersión de los datos y por tanto la varianza muestral, aumentando con ello la confiabilidad en las estimaciones.

Marcadores moleculares y su poder informativo para la asignación de relaciones de parentesco reales

El análisis del pedigrí en especies silvestres solo ha sido posible gracias a intensos estudios de éxito reproductivo en poblaciones con una alta fidelidad a un área específica a través del tiempo (Pemberton, 2008); por lo que en estos estudios su mayoría se encuentra mayormente limitados a organismos terrestres con bajas tasas de dispersión. En contraste, en especies como los mamíferos marinos que exhiben una amplia dispersión, el seguimiento del pedigrí está limitado a las breves observaciones en superficie, al registro de sus actividades durante el día y a estudios a largo plazo basados en foto-identificación.

Aunque con el desarrollo y uso de marcadores moleculares altamente variables y neutrales, se cuenta actualmente con una poderosa alternativa para obtener una aproximación del pedigrí, el poder de los distintos marcadores depende en gran medida de su naturaleza y sus niveles de polimorfismo. El DNA mitocondrial ha sido un marcador recurrente para evaluar genealogías maternas (matrilíneas), pero posee limitaciones inherentes que nos permite ver solo una parte la historia. Por ejemplo, en este trabajo se observaron 7 linajes maternos, de los cuales solo 3

estuvieron asociados a los individuos asociados a palangres. Sin embargo, al ser estos linajes los más abundantes a nivel mundial y al no exhibir un patrón filogeográfico (Mesnick, 2003; 2010), las evaluaciones e inferencias sobre el parentesco basadas en este marcador fueron muy limitadas.

Durante los últimos 15 años, los marcadores nucleares microsatélites han sido los marcadores de elección para estudios de parentesco cuando los conocimientos de pedigrí son escasos o difíciles de llevar a cabo (Ritland, 1996; Van de la Castele *et al.*, 2001; Wang, 2002, Pemberton, 2008). Características como su variabilidad individual (multialélicos) y por tanto poder de discriminación para evaluar el parentesco han permitido dilucidar patrones de sistema de apareamiento, estructura poblacional y comportamiento (entre otros). A pesar de la variedad de microsatélites disponibles para especies de mamíferos marinos (Bourrert *et al.*, 2008) y en particular para cachalotes (Richard *et al.*, 1996; Lyrhon *et al.*, 1999; Bond, 1999), debido a las inconsistencias al evaluar el control de calidad del genotipado, solo fue posible evaluar 6 microsatélites altamente polimórficos (Morin *et al.*, 2009a; 2010b).

En este sentido, se optó por evaluar marcadores alternativos que permitiesen reducir la manipulación humana e inconsistencias de genotipado; es así como se caracterizan 36 SNPs para ser evaluados en la especie (Morin *et al.*, 2007b; Morin *et al.*, 2009b; Mesnick *et al.*, 2010).

Aunque el costo del descubrimiento y desarrollo de los SNPs puede llegar a ser elevado, la gran ventaja de estos radica en los avances tecnológicos actuales que permiten la detección y evaluación de cientos de SNPs a la vez (Vignal *et al.*, 2002), reduciendo la manipulación de las muestras (automatización). No obstante, su poder de discriminación individual es limitado a presentar solo dos alelos por locus, lo que puede compensarse incrementando el número de loci a evaluar (Narum *et al.*, 2008; Santure *et al.*, 2010). Por otro lado, la presencia de loci ligados es un factor persistente en los SNPs, por lo que en ocasiones es necesario evaluar la fase gamética (Morin *et al.*, 2010b).

Dadas las características y limitaciones de ambos marcadores (DeWoody, 2005), fue necesario evaluar el contenido informativo individual y multilocus de cada marcador, así como también su potencial para evaluar parentesco entre los individuos analizados. El elevado número de alelos observados en loci microsatélites reflejó claramente una baja probabilidad de identidad (4.34×10^{-9}) y un alto poder informativo (ver Tablas IV y V); en otras palabras, los microsatélites mostraron el poder suficiente para reconocer a nivel individual a los cachalotes. Sin embargo, para obtener PI_{MM} similar en SNPs fue necesaria la evaluación de 30, mientras que la evaluación del set completo arrojó valores de PI_{MM} de 8.25×10^{-11} , dos órdenes de diferencia entre ambos, pero con un mayor polimorfismo de los 6 microsatélites (ver Tabla II). Los valores del contenido informativo (PIC) para SNPs fueron bajos (0.37 a 0.0416) y ninguno de estos alcanzó el valor más bajo obtenido en

microsatélites (EV01 = 0.696). Reflejo de la limitación que puede tener el uso de marcadores bialélicos en estudios de parentesco.

Considerando todo lo anterior, se optó por realizar las estimaciones de parentesco obtenidas con el conjunto de marcadores nucleares a través de diversas combinaciones alternativas que permitieran evaluar la congruencia de las mismas. De las ocho combinaciones de marcadores realizadas dos se realizaron usando la fase gamética, pero la reconstruidas en forma teórica a través de un programa, debe tomarse con ciertas reserva hasta que de forma empírica se demuestre que los marcadores efectivamente se encuentran en fase. Evaluar de forma individual las aproximaciones solo con SNPs reduce su poder informativo, ya que se observó que un mismo genotipo multilocus estaba representado por más de un individuo en la muestra, los cuales en la mayoría de las ocasiones presentaron un haplotipo y una identificación molecular del sexo distinta (datos no presentados). Así, se decidió evaluar estas combinaciones de SNPs asociadas a los loci microsatélites.

Con base a los resultados obtenidos en esta tesis se sugiere: que a pesar de que los SNPs puedan substituir a los microsatélites en términos de reproducibilidad en el laboratorio e interpretación de los datos; la diversidad alélica de un SNP es limitada (Krawczak, 1999; Glaubitz *et al.*, 2002; Anderson y Garza, 2006), lo que implica que la heterocigosidad esperada o diversidad génica de un SNP no pueda exceder el 75%, aunque normalmente será menor del 50% (Krawczak, 1999). Este nivel

comparativamente bajo de H_E puede hacer que las ventajas metodológicas y analíticas de SNPs, comparadas con las de los microsatélites, se vean disminuidas por su baja eficiencia en la discriminación de las distintas categorías de parentesco.

Un factor importante a considerar para la elección de los SNPs en estudios de parentesco es la frecuencia del alelo menor (q). A través de simulaciones se ha observado que con valores de q del 10% no es posible distinguir entre las relaciones de primos de primer orden de hermanos completo; y que disminuyendo estos valores al 5% el poder de discriminación disminuye a tal grado que se puede distinguir hermanos completos de pares de individuos sin parentesco (Glaubitz *et al.*, 2002). Por lo anterior, se ha recomendado el uso de SNPs con q iguales o mayores al 20%, valores con los que el error de una mala clasificación es del 10% para las relaciones de hermanos completos de los medios hermanos, porcentaje de error es aceptable de acuerdo con varios estudios (Glaubitz *et al.*, 2002; Anderson y Garza, 2006).

La baja reproducibilidad de los microsatélites puede ser minimizada si se realiza un control de calidad exhaustivo y se estandariza el uso del mismo conjunto de muestras de control positivo de amplificación entre laboratorios, mientras que la baja eficiencia de los SNPs conlleva a un mayor esfuerzo en el descubrimiento cientos de SNPs para evaluar las relaciones de parentesco (Santure *et al.*, 2010); en consecuencia, una mayor inversión en tiempo, esfuerzo y costos.

En mi opinión, a pesar de que los SNPs parecen estar en el camino, los microsatélites siguen siendo la mejor alternativa para evaluar las relaciones de parentesco siempre y cuando se lleve a cabo el estricto control de calidad antes mencionado. Por otro lado, aunque el uso de diferentes combinaciones de marcadores es una forma válida de evaluación, se ha demostrado que en el mejor de los casos el incrementar el número de SNPs no aumenta de manera considerable el poder de discriminación de las estimaciones realizadas mediante microsatélites (Santure *et al.*, 2010).

Estimadores de parentesco

Existen varios métodos para estimar el parentesco entre individuos, estos pueden basarse desde el porcentaje de alelos compartidos hasta la coancestría (Lynch 1988; Queller y Goodnight 1989; Ritland 1996; Lynch y Ritland, 1999; Wang 2002; Milligan 2003; Fernández y Toro 2006; Wang 2007); sin embargo, estos tienen limitaciones inherentes (Van de Casteele *et al.*, 2001; Wang 2002; Thomas 2005; Fernández y Toro 2006; Horn *et al.*, 2008) que se deben a la precisión y eficacia de los estimadores genéticos de parentesco que son influenciados por las características de los marcadores moleculares empleados y el tamaño de la muestra de individuos (Horn *et al.*, 2008) dejando la interrogante: ¿Cuál estimador utilizar?

Es por ello que se utilizó el programa COANCESTRY (Wang, 2010) mediante el cual se evalúan siete estimadores de parentesco, dos de máxima verosimilitud y cinco estimadores de método de momento. De estos los

estimadores de máxima verosimilitud mostraron entre ellos tener una mejor correlación y menor varianza (Anexo 4). El estimador de máxima verosimilitud propuesto por Wang (2007); el cual usa un tercer individuo de referencia en las estimaciones de r entre cada par de individuos, con lo cual reduce la probabilidad de que genes idénticos solo por estado sean erróneamente inferidos como idénticos por descendencia fue seleccionado para el estudio.

Los estimadores de método de momento fueron descartados de las evaluaciones debido a que incluso entre ellos hubo inconsistencias. Es sabido, que algunos estimadores de momentos (p.e. Lynch y Ritland, 1999; Queller y Goodnight, 1989) tienen uso limitado para marcadores bialélicos como los SNPs (Wang, 2007) dado que bajo ciertas circunstancias las evaluaciones son indefinidas (denominador igual a cero). Además todos los estimadores MM asumen la ausencia de endogamia y errores de genotipado. En contraste, los estimadores MV pueden ser aplicados a marcadores con cualquier número y frecuencia de alelos por locus, pueden manejar endogamia y errores de genotipado (Weir *et al.*, 2006; Wang, 2007). Y en la mayoría de los casos, los estimador MV tienen errores cuadráticos medios más bajos; Y estimaciones de los coeficientes de idénticos por descendencia y parentesco están naturalmente constreñidos a los intervalos biológicamente válidos (0-1), haciendo la interpretación y los subsecuentes análisis más sencillos (Milligan, 2003).

Con las estimaciones realizadas al usar el método de Wang (2007), los valores de parentesco promedio de individuos asociados a palangre no fueron significativamente diferentes de aquellos no asociados a palangres (Tabla VI), lo cual indica que el parentesco no es la fuerza de cohesión a actividades de depredación. Sin embargo, no se sabe si los individuos que no estuvieron asociados a palangres en algún momento pudieron estarlo, es por ello que se evaluó el parentesco promedio entre los individuos dentro del área de depredación y fuera de esta, no obstante, los resultados fueron similares a la primera evaluación (sin diferencias significativas, ver Tabla VI), lo que continúa apoyando que la transmisión no se da de forma vertical, sino de alguna forma horizontal.

Factores como el tipo de marcador molecular, el número de loci evaluados, número de alelos por locus y sus frecuencias, el tamaño de muestra y presencia de individuos con lazos fuertes de parentesco pueden llegar a limitar las estimaciones (Milligan, 2003; Wang, 2002), es por ello que en una alternativa factible para evaluar el correcto rendimiento de los estimadores es usar individuos con lazos de parentesco conocidos, ya que así al efectuar las estimaciones estos deben salir con un valor de parentesco que sea reflejo del real. Si fuese lo contrario, se podrían tomar medidas a la hora de elegir el estimador.

En el estudio, no fue posible incluir individuos con lazos conocidos de parentesco y las inconsistencias en las 8 evaluaciones (ver tabla VII)

realizadas dejan la duda de la correcta asignación de relación de parentesco de los individuos evaluados y del adecuado número de marcadores usados para realizar una correcta discriminación. Es en este sentido, que se decide realizar distintas simulaciones para verificar los patrones de parentesco obtenidos.

¿Cuántos marcadores microsatélites o SNPs son necesarios para estimar confiablemente los niveles de parentesco?

A pesar de que en promedio no se encontraron diferencias significativas entre las estimaciones realizadas, se observaron pares de individuos con valores de parentesco de primer y segundo orden, que pudieran ser reflejo de una cohesión genética. No obstante, en varias ocasiones la estimación de parentesco obtenida a través de los 8 diferentes juegos de marcadores moleculares resultó ambigua entre parejas de individuos (p.e. microsatélites indicando un fuerte parentesco, mientras que los SNPs indicaban que no había relación de parentesco).

En este sentido se llevan a cabo simulaciones con las frecuencias alélicas de la muestra (n=232) para SNPs y microsatélites en la cual se observó que el poder de discriminación de los 36 SNPs fue ligeramente limitada en comparación con los microsatélites (ver Figuras 7 y 8). Y solo es posible discernir entre las relaciones de parentesco de primer orden de aquellos sin parentesco. Por lo que sigue sin contestarse la pregunta de ¿Cuántos marcadores son suficientes?

Se realizan nuevas simulaciones de cuatro categorías de parentesco y de individuos sin parentesco para ambos marcadores, incrementando el número de cada uno de estos, su número de alelos (en el caso de microsatélites) y sus frecuencias. Dado que en la mayoría de los estudios el número de microsatélites varía de 6 hasta 50 SNPS (Blounin et al., 1996; Seddon et al., 2005; Wilkening et al., 2006; Mesnick et al., 2010; Santure et al., 2010), se realizaron simulaciones usando 16 microsatélites. Los resultados indicaron que usando 16 para distinguir entre las relaciones: PH, HC, MH y PP, solo es posible distinguir entre las relaciones más altas de parentesco de los individuos sin parentesco alguno, ya que los intervalos de parentesco entre las relaciones intermedias se traslapa con los de aquellos sin relación de parentesco. Esta mismo traslape es observado entre las relaciones más altas de PH y HC. Estos resultados han sido observados en otros estudios como el de Blounin *et al.* (1996) al evaluar 54 *Mus musculus* utilizando 20 loci polimórficos, observando que del 2-3% de hermanos completos pueden ser mal clasificados como individuos sin parentesco, o viceversa por la dispersión entre las relaciones intermedias, por lo que concluye que la habilidad para discriminar entre parientes de primer orden de aquellos sin parentesco usando 20 microsatélites es suficiente.

Para el caso de los SNPs, con base al método de Laval (citado por Hamblin *et al.* 2007) para determinar un número aproximado de SNPs con el que se obtendrían distancias genéticas similares a las del conjunto de microsatélites utilizados, sería necesario evaluar 90 SNPs. En la simulación realizada, para la que se incluyeron 100 SNPs con alelos equi-frecuentes, se observó que al

igual que en las simulaciones de microsatélites no era posible distinguir claramente la subdivisión entre parientes de primer y segundo orden, ni estos últimos con los de los individuos sin relación de parentesco; esto debido a los amplios intervalos de confianza para cada relación de parentesco. Sin embargo, a diferencia de las simulaciones realizadas con microsatélites la dispersión de las estimaciones de SNPs fue más amplia, lo que apoya de nueva cuenta el uso de microsatélites como la mejor alternativa de marcador molecular en estudios de parentesco.

Trabajos realizados para evaluar parentesco mediante SNPs, incluyen simulaciones y evaluaciones de cientos de SNPs, sin embargo, en su mayoría concluyen que la frecuencia de q es un factor importante para las evaluaciones, ya que el incrementar el número de SNPs no garantiza que ofrecer un mayor poder de discriminación entre las relaciones intermedias (Santure *et al.*, 2010)

Parentesco entre los cachalotes machos adultos evaluados en el estudio y su relación con el comportamiento de depredación.

Como se mencionó en apartados anteriores, no se observaron diferencias entre las comparaciones realizadas dentro y fuera del área así como también entre los asociados y no asociados (ver tabla VI), usando las diferentes combinaciones de los marcadores.

Apoyados de los resultados encontrados, así como también de las simulaciones, es un hecho que solo es posible distinguir entre las categorías extremas (PH de SP), que indica que el comportamiento no se encuentra asociados a los niveles de parentesco más alto (PH), esto es, que el comportamiento de depredación no es adquirido en su unidad familiar a diferencia de otros estudios (Krützen *et al.*, 2005). A pesar de que en este estudio no es posible determinar el origen del aprendizaje social fuera de su unidad, ya que el aprendizaje social puede estar dado por: imitación, enseñado, dependiente de atención, mediante instrucción entre otros, etc. (Laland, 2004; Galef y Laland, 2005)

En la muestra se observaron dos organismos depredadores (34559 y 34563) con alelos raros para cada uno en diferentes loci. Estos alelos no estuvieron presentes en ningún individuo de la población, lo que nos hace preguntarnos: ¿Hubo algún error de genotipado?, ¿A caso los padres de estos individuos no fueron muestreados? o ¿La ausencia de estos alelos, indica que vienen de otros sitios para alimentarse en los palangres? Si la respuesta a la última pregunta fuese si, nos deja la incógnita de: ¿Fueron estos individuos los que dieron origen a la depredación de palangre en Alaska? Ya que estos fueron muestreados en asociación a palangres y más aún dentro de un mismo grupo (ver Tabla II).

La evaluación de la asignación de poblacional a estos 39 individuos reflejó que el posible origen de cada uno de ellos es diferente, y que en particular la

de los individuos depredadores también. Las proporciones de los 39 individuos asignados a las distintas poblaciones fueron congruentes con los tamaños de muestra de estas y la de los 13 machos depredadores también, lo cual es reflejo y apoya la evidencia de que el origen de la depredación no es por vía familiar. Los individuos con alelos raros fueron asignados a poblaciones distintas, pero las posibilidades siguen abierta del origen de estos individuos. Ya que es importante destacar que los análisis de asignación no sobrepasa las estimaciones que se puedan realizar mediante la probabilidad de exclusión.

La depredación, la conservación e implicaciones económicas

Con base a los análisis realizados con los datos reales, las simulaciones y la asignación de las poblaciones de origen, la transmisión del comportamiento no es de origen vertical. Si hubiese sido el caso, los individuos depredadores pertenecerían a una sola población haciendo que la interacción con las embarcaciones sea mucho más arriesgada ya que los daños a causa de la interacción y posible muerte de un cachalote por esta ejercerían una mayor presión a la diversidad genética si se hubiesen asignado a una de la población, con lo cual la salud genética de esta se vería mermada. Pero también desde el punto de vista económico, el valor comercial del bacalao negro bajaría, así como también es posible que el número de permisos y toneladas de pesca se viera reducida, causando pérdidas económicas sustanciales a los pescadores que se dedican enteramente de esta actividad.

Si la transmisión fuese horizontal, la propagación del comportamiento crecería exponencialmente con lo cual la interacción incrementaría, haciendo de este problema incontrolable e incrementando la competencia con la pesca demersal palangrera por bacalao. Lo que implica mayores probabilidades de muerte de cachalotes por la pesquería y el posible cierre de ésta debido a que es una especie protegida. No obstante con la evaluación realizada de la asignación poblacional de estos machos, indica sus diversos orígenes y con ello un escenario intermedio entre la primera y segunda posibilidad, lo que señala que a pesar de que pueda haber presión, esta no es mayor en comparación si los cachalotes hubiesen sido asignados a una misma población. Y a pesar de que la interacción pueda incrementar, entonces es necesario llevar a cabo medidas de mitigación que limiten la interacción entre ambos.

SUGERENCIAS Y CONSIDERACIONES FINALES

Dado que son varios los factores que pueden afectar el rendimiento relativo de los estimadores de parentesco, diferentes conjuntos de marcadores moleculares promueven el uso de diferentes estimadores. No existe un estimador universal que se desempeñe eficientemente bajo todos los escenarios, por lo que es recomendable evaluar varios estimadores y realizar simulaciones para decidir el estimador más adecuado para estudios particulares de parentesco en cada especie (Milligan, 2003; Wang, 2007).

En este estudio se evaluaron individuos observados asociados y no asociados con los palangres. No obstante, no sabemos, si los individuos asociados estaban necesariamente involucrados en la depredación y tampoco sabemos si los machos no asociados a los palangres podrían, en otras ocasiones, estar involucrados en la actividad. Lo que deja claro la necesidad de aumentar el esfuerzo de muestreo y las observaciones en el campo.

Para poder determinar con mayor certeza la forma de transmisión es necesario incrementar el número de muestra de los individuos depredando, así como incluir individuos de pedigrí conocido. Aparentemente el incremento en el número de marcadores no siempre incrementa la resolución en el parentesco (Santure *et al.*, 2010). Las estimaciones de parentesco serían mejor abordadas con cierta verificación sobre la base de individuos de relación conocida para detectar diversos grados de parentesco y conocer el pedigrí.

Aunque las evidencias obtenidas del presente estudio apoyan la hipótesis de que el parentesco no es la forma de transmisión del comportamiento de depredación (transmisión vertical), la hipótesis alternativa de que la conducta se ha diseminado en el Golfo de Alaska a través de alguna forma de aprendizaje social (transmisión horizontal) deberá ser explorada con más

detalle debido a las diferentes alternativas o estrategias de transmisión horizontal.

Tradicionalmente, los machos adultos se cree que son solitarios en las zonas de alimentación. La presencia de cachalotes cerca de varias embarcaciones de palangre y los resultados presentados, sugieren que el aprendizaje social podría desempeñar un papel en la propagación de la conducta de depredación en los machos adultos dentro de la región.

La depredación sobre palangres por parte de los cachalotes se presenta en diferentes partes del mundo y aparentemente ha aumentado en frecuencia. Aunque esto podría considerarse evidencia de que este comportamiento se ha estado esparciendo rápidamente, aun se desconoce la tasa a la cual dicho comportamiento ha incrementado. Por ello, es necesaria una evaluación conjunta a través de la cual se pueda determinar si los machos depredando palangres en Alaska son los mismos depredando en costas de Chile o si de alguna forma existe un parentesco entre ellos.

A pesar de la incertidumbre asociada con la evaluación de las relaciones de parentesco y la transmisión de comportamiento de depredación en los cachalotes machos adultos, los estudios de parentesco y comportamiento ofrecen una ventana para el estudio de la estructura social, las interacciones y la comunicación entre los machos de esta especie, aspectos que hasta la fecha se desconocían y se creía que no se presentaban.

Debido a que es más probable que un nuevo comportamiento se difunda más rápidamente cuando hay fuertes vínculos sociales, independientemente del nivel de parentesco entre los individuos, sería de esperarse que la depredación sobre los palangres que realizan los cachalotes aumente en frecuencia e impacte en mayor medida a la pesquería.

Tomando en cuenta que bajo dicho escenario tanto la pesquería como los cachalotes se verían afectados, el hecho de que los individuos depredadores aparentemente provienen de los tres estratos geográficos (stocks) putativos reconocidos actualmente (ver Mesnick et al., 2010), el impacto sobre los stocks de cachalote sería menor en comparación al escenario alterno en el que los individuos tuvieran un origen común.

Así pues, aunque es indispensable trabajar en torno a las medidas de mitigación para evitar tanto las pérdidas económicas y la decertificación del estatus de calidad ecológica de la pesquería, como los potenciales daños que pudieran sufrir los cachalotes al interactuar con esta, las evidencias en cuanto a la forma en que se trasmite y se puede difundir el comportamiento sitúan a ambos actores en un punto intermedio entre el peor y el mejor escenario. Por lo mismo, en el corto plazo, deberán implementarse y evaluarse las medidas de mitigación que permitan reducir la interacción de la especie con esta pesquería.

CONCLUSIONES

Dado que los haplotipos más frecuentes a nivel mundial estuvieron representados entre los individuos asociados a palangre. El DNA mitocondrial no aportó suficiente evidencia sobre la forma de transmisión del comportamiento de depredación.

Los niveles de parentesco entre los machos asociados y no a palangre no aportan evidencia de que el parentesco este asociado con la transmisión del comportamiento de depredación.

Los microsatélites en la mayoría de los casos exhibieron un mejor rendimiento sobre los SNPs, por lo que se considera que los microsatélites al exhibir un mayor polimorfismo, siguen siendo la mejor alternativa para estudios de parentesco.

Dado que las estimaciones de parentesco sugieren que la transmisión no es vertical y los resultados del análisis de asignación indican que los individuos depredadores pertenecen a poblaciones diferentes, es probable que este comportamiento se transmita horizontalmente. Ya que esto podría llevar a un aumento considerable de la interacción, es necesario poner en acción estrategias de mitigación para reducirla.

Con el tamaño de muestra evaluado y el reducido número de individuos por grupo, no es posible realizar estimaciones precisas del nivel de parentesco entre los cachalotes depredadores y extrapolar la tasa del incremento del comportamiento, por lo que es necesario incrementar el esfuerzo de muestreo dentro y fuera de la zona de depredación.

REFERENCIAS

- AITKEN, N. S. Smith, C. Schwarz y P. A. Morin. 2004. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted-gene approach. *Molecular Ecology* 13: 1423-1431.
- ALASKA DEPARTMENT OF FISH AND GAME. 2010. Select state-managed Southeast Alaska sablefish fishery regulations. http://www.cf.adfg.state.ak.us/region1/finfish/grndfish/sablefish/sable_reg.php.
- ALLENDORF, F. W., y G. Luikart. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Wiley-Blackwell Publishing. 642 p.
- ANDERSON, E. C. y J. C. Garza. 2006. The power of single-nucleotide polymorphisms for large-scale parentage inference. *Genetics* 172: 2567-2582.
- BANKS, M. A., y W. Eichert. 1999. WHICHRUN (version 3.2) a computer program for population assignment of individuals based on multilocus genotype data. *Journal of Heredity* 91:87-89.
- BLOUIN, M. S., M. Parsons, V. Lacaille y L. Lotz. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393-401.
- BOND, J. 1999. Genetical Analysis of the Sperm Whale Using Microsatellites. Ph.D. Dissertation. Cambridge University.
- BONIN, A., E. Bellemain, P. Bronken Eidesen, F. Pompanon, C. Brochmann y P. Taberlet. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13:3261-73.
- BOTSTEIN, D., K. L. White, M. Skolnick y R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- BOURRET, V., M. Macé, M. Bonhomme y B. Crouau-Roy. 2008. Microsatellites in cetacean: An overview. *The Open Marine Biology Journal* 2:38-42.
- BRUMFIELD, R. T., P. Beerli, D.A. Nickerson, y S.V. Edwards. 2003. The utility of the single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology and Evolution* 18:249-256.

- BUCHANAN, F. C., Friesen, M. K., Littlejohn, R. P. y J. A. Clayton. 1996. Microsatellites from beluga whale *Delphinapterus leucas*. *Molecular Ecology* 5: 571-575.
- CHRISTAL, J., H. Whitehead, y E. Lettevall. 1998. Sperm whale social units: variation and change. *Canadians Journal of Zoology* 76:1431-1440.
- CHRISTAL, J. y H. Whitehead. 2001. Social affiliations within sperm whale (*Physeter macrocephalus*) groups. *Ethology* 107:323-40.
- COATES, B. S., D. V. Sumerford, N. J. Miller, K. S. Kim, T. W. Sappington, B. D. Siegfried y L. C. Lewis. 2009. Comparative performance of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for population genetics analysis. *Journal of Heredity* 100(5):556-564.
- DEWOODY J. A. 2005. Molecular approaches to the study of parentage, relatedness and fitness: practical applications for wild animals. *Journal of Wildlife Management* 69:1400-1418.
- DILLON, M. C. 1996. Genetic structure of sperm whale populations assessed by mitochondrial DNA sequence variation. Ph.D. Thesis, Dalhousie University. Halifax, Nova Scotia.
- DONOGHUE, M., R. R. Reeves y G. S. Stone, editores. 2002. Report of the workshop on interactions between cetacean and longline fisheries. New England Aquarium Press. 49 p.
- ENGELHAUPT, D., A. R. Hoelzel, C. N., A. Frantzis, S. Mesnick, S. Gero, H. Whitehead, L. Rendell, P. Miller, R. de Stephanis, A. Cañadas, S. Airoldi y A. A. Mignucci-Giannoni. 2009. Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine species, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Molecular Ecology* 18:4193–4205
- EVETT, I. W., y B. S. Weir. 1998. Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists. Sinauer Associates, Sunderland, MA. p. 278.
- FAIN S. R., J. P. LeMay. 1995. Gender identification of humans and mammalian wildlife species from PCR amplified sex-linked genes. *Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences* 1:34.
- FRANZ, M. y C. L. Nunn. 2009. Network-based diffusion analysis: A new method for detecting social learning. *Proceedings of the Royal Society B* 276(1663):1829-1836.

- FERNÁNDEZ, J., M. A. Toro. 2006. A new method to estimate relatedness from molecular markers. *Molecular Ecology* 15:1657-1667.
- FRENTIU, F. D., S. M. Clegg, J. Chittock, T. Burke, M. W. Blows y I. P. F. Owens. 2008. Pedigree-free animal models: the relatedness matrix reloaded. *Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences*. 275: 639-647.
- GALEF Jr, B. G. y K. N. Laland. 2005 Social learning in animals: empirical studies and theoretical models. *BioScience* 55:489–499.
- GEMMELL, N. J. y S. Akiyama. 1996. An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics* 12:338–339.
- GERO, S., D. Engelhaupt, y H. Whitehead. 2008. Heterogeneous social associations within a sperm whale, *Physeter macrocephalus*, unit reflect pairwise relatedness. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63:143-151.
- GRAFEN, L. 1985. A geometric view of relatedness. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 2:62
- GLAUBITZ, F. C., O. E. Rhodes JR y J. A. Dewoody. 2003. Prospects for inferring pairwise relationships with single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology* 12:1039-1047.
- HAMBLIN, M. T., M. L. Warburton y E. S. Buckler. 2007. Empirical comparison of single sequences repeats and single nucleotide polymorphisms in assessment of maize diversity and relatedness. *Public Library of Science ONE* 2(12): e1367
- HAMILTON, W. D. 1964. The genetical evolution of social behaviour. *Journal of Theoretical Biology* 7: 1-52.
- HEATON M. P., G.P. Harhay, G.L. Bennet, R.T. Stone, W.M. Grosse, E. Casas, J.W. Keele, T.P.L. Smith, C.G. Chitko-McKown y W.W. Laegreid. 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome* 13:272-281.
- HILL, P. S., J. L. Laake, y E. Mitchell. 1999. Results of a pilot program to document interactions between sperm whales and longline vessels in Alaska waters. U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum. NMFS-AFSC-108, 42 p.

- HORN R. C., J. Altmann y S. C. Alberts, 2008. Can't get there from here: inferring kinship from pairwise genetic relatedness. *Animal Behavior* 75: 1173-1180
- HUCKE-GAETE, R., C. A. Moreno y J. Arata. Operational interactions of sperm whales and killer whales with the patagonian toothfish industrial fishery off southern Chile. *CCAMLR Science* 11:127-140.
- HUEBINGER, R. M., J. C. Patton, J. C. George, R. Suydam, E. E. Louis, y J. W. Bickham. 2008. Characterization of twenty-five microsatellite loci in bowhead whales (*Balaena mysticetus*). *Molecular Ecology Resources* 8:612-615.
- KALINOWSKI, S. T., A. P. Wagner y M. L. Taper. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576-579.
- KANDA, N., M. Goto y L. A. Pastene. 2009. Genetic characteristics of sperm whales sampled during JAPRNI from 2000 to 2007 as revealed by mitochondrial DNA and microsatellite analyses. Report SC-J09-JR33 to the International Whaling Commission
- KRAWCZAK, M. 1999. Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms. *Electrophoresis* 20:1676-1681.
- KENDALL, M. y A. Stewart. 1977. The advanced Theory of statistics. Volume 1. Macmillan, New York.
- KRÜTZEN, M. J. Mann, M. R. Heithaus, R. C. Connor, L. Bejder y W. B. Sherwin. 2005. Cultural transmission of tool use in bottlenose dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(25):8939-8943
- KUMAR, S., K. Tamura y M. Nei. 2004 MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* 5:150–163.
- LALAND, K. N. 2004. Social learning strategies. *Learning and Behavior* 32: 4-14.
- LAVAL, G. M., San Cristobal y C. Chevalet. 2002. Measuring genetic distances between breeds: use of some distances in various short term evolution models. *Genetics Selection Evolution* 34: 481–507.
- LEE H. Y., M. J. Park, J.E. Yoo, U. Chung, G.R. Han y K.J. Shin. 2005. Selection of twenty-four highly informative SNP markers for human identification and paternity analysis in Koreans. *Forensic Science International* 148: 107–112.

- LI, C. C., D. E. Weeks y A. Chakravarti. 1993. Similarity of DNA fingerprints due to change and relatedness. *Human Heredity* 43: 45-52.
- LYNCH, M. 1988. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution* 5(5): 584-599.
- LYNCH, M. y K. Ritland. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152: 1753-1766.
- LYONS, L. A., T. F. Laughlin, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. E. Womack y S. J. O'Brien. 1997. Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nature Genetics* 15: 47-56.
- LYRHOLM, T. y U. Gyllensten. 1998. Global matrilineal population structure in sperm whales as indicated by mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society* 265: 1679-1684.
- LYRHOLM, T., O. Leimar, B. Johanneson, y U. Gyllensten. 1999. Sex-biased dispersal in sperm whales: contrasting mitochondrial and nuclear genetic structure of global populations. *Proceedings of Royal Society* 266:347-354.
- MATHIAS, D., A. M. Thode, J. Straley, J. Calambokidis, G. Schorr y B. Burgess. 2009. Depth, orientation, and acoustics of sperm whale (*Physeter macrocephalus*) under natural and depredation foraging conditions in the Guls of Alaska. En 18va. Reunión Bienal de Biología de Mamíferos Marinos. Libro de resúmenes. p. 156-157.
- MCKELVEY, K. y Schwartz, M.K. 2005. DROPOUT: a program to identify problem loci and samples for noninvasive genetic samples in a capture-mark-recapture framework. *Molecular Ecology Notes* 5: 716-718.
- MESNICK, S. L., Taylor, B.L., Le Duc, R.G., Escorza Treviño, S., O'Corry-Crowe, G.M., and Dizon, A.E. 1999. Culture and Genetic Evolution in Whales. *Science* 284:2055a
- MESNICK, S. L. 2001. Genetic relatedness in sperm whales: evidence and cultural implications. *Behavioral and Brain Science* 24(2):346-347
- MESNICK, S. L., K. Evans, B. L. Taylor, J. Hyde, S. Escorza-Treviño, y A. E. Dizon. 2003. Sperm Whale Social Structure: Why it Takes a Village to Raise a Child? p.170-174, En: *Animal Social Complexity: Intelligence, Culture and Individualized Societies*. de Waal F.B.M. y P.L. Tyack, editors. Harvard University Press. 616 pp.

- MESNICK, S. L., Taylor, E. I. Archer, K. K. Martien, S. Escorza-Treviño, B. L. Hanckok, S. C. Moreno-Medina, V. L. Pease, K. M. Robertson, J. M. Straley, R. W. Baird, J. Calambokidis, G. S. Schorr, P. Wade, V. Burkanov, C. R. Lunsford, L. Rendell y P. A. Morin. 2010. Sperm whale population structure in the Eastern North Pacific Inferred by the use of single nucleotide polymorphisms (SNPs), microsatellite and mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Resources* (Aceptado).
- MILLER, S. A., D. D. Dykes y H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Research* 16:1215.
- MILLIGAN, B. G. 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 163:1153-1167.
- MORENO-MEDINA, S., S. Mesnick, P. Morin, J. Straley, V. Burkanov, K. Robertson, Z. Schakner y N. Warner. 2009. A comparison of genetic relatedness among adult male sperm whales associated and not associated with longline vessels in the North Pacific: Implications for the transmission of depredation behaviour. En 18th Biennial conference of the Biology of Marine Mammals, abstracts book. 172 pp.
- MORIN, P. A., G. Luikart, R. K. Wayne, y SNP workshop group 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 19:208-216.
- MORIN, P. A., A. Nestler, N. T. Rubio-Cisneros, K. M. Robertson y L. S. Mesnick. 2005. Interfamilial characterization of a region of the ZFX and ZFY genes facilitates sex determination in cetaceans and other mammals. *Molecular Ecology* 14:3275-3286.
- MORIN, P. A., N. Aitken, N. Rubio-Cisneros, A.E. Dizon y S. Mesnick. 2007b. Characterization of 18 SNP markers for sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Molecular Ecology Notes* 7: 626-630.
- MORIN, P. A., y M. McCarthy. 2007. Highly accurate SNP genotyping from historical y low-quality samples. *Molecular Ecology Notes* 7:937-946.
- MORIN, P. A., R.G. LeDuc, F. I. Archer, K. K. Martien, R. Huebinger, J. W. Bickham y B. L. Taylor. 2009a. Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors. *Molecular Ecology Resources* 9:498-504.
- MORIN, P. A., K. K. Martien, y B.L. Taylor. 2009b Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. *Molecular Ecology Resources* 9: 66-73

- MORIN P. A., V.L. Pease, B.L. Hancock, K.M. Robertson, C.W. Antolik, y R.M. Huebinger. 2010a. Characterization of 42 single nucleotide polymorphism (SNP) markers for the bowhead whale (*Balaena mysticetus*) for use in discriminating populations. *Marine Mammal Science* 26 (3):716–732.
- MORIN, P. A., Martien, KK, Archer, FI, Cipriano, F, Steel, D, Jackson, J, Taylor, BL. 2010b. Applied conservation genetics and the need for quality control and reporting of genetic data used in fisheries and wildlife management. *Journal of Heredity* 10: 1-10.
- NARUM, S. R., M. Banks, T. D. Beacham, M. R. Bellinger, M.R. Campell, J. Dekoning, A. Elz, C. M. Guthrie III, C. kozkay, K. M. Miller, P. Moran, R. Phillins, L. W. Seeb, C.T. Smith, K. Warheit, S.F. Young y J.C. Garza. 2008. Differentiating salmon populations at broad and fine geographical scales with microsatellites and single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology* 17: 3464-3477.
- NATIONAL MARINE FISHERIES SERVICE. 2009. Sperm whale (*Physeter macrocephalus*), 5 year review: Summary and evaluation. Office of Protected Resources. 44 pp.
- NEI, M, y F. Tajima, 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York. Columbia University Press. 512 pp.
- NOLAN, C. P. y G. M. Liddle. 2000. Interactions between killer whales (*Orcinus orca*) and sperm whales (*Physeter macrocephalus*) with a longline fishing vessel. *Marine Mammal Science* 16(3): 658-664.
- O'CONNELL, V., J. Straley y D. Curran. 2006. The Southeast Alaska sperm whale avoidance project (SEASWAP): background and history. Proceedings from the symposium: Fisheries Depredation by Killer and Sperm Whales: Behavioural Insights, Behavioural Solutions. Pender Island, British Columbia 2-5 Oct 2006.
- PAETKAU, D. y C. Strobeck. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3:489–495.
- PAETKAU, D., W. Calvert, I. Stirling, y C. Strobeck. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4:347-354.
- PAETKAU, D., R Slade, M Burden y A. Estoup. 2004. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a

- simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13:55–65.
- PEAKALL, R. y P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- PEMBERTON, J. M. 2008. Wild pedigrees: the way forward. *Proceedings of the Royal Society of London, Series Biology* 275:613–621
- PINELA, A. M., S. Quérquil, S. Magalhães, M. A. Silva, R. Prieto, J. A. Matos y R. S: Santos. 2009. Population genetics and social organization of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) in the Azores inferred by microsatellite analyses. *Canadian Journal of Zoology* 87: 802-813.
- POSADA D. 2008. JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253-1256
- PURVES, M. G., D. J. Agnew, E. Galguerías, C. A. Moreno y B. Watkins. 2004. Killer whale (*Orcinus orca*) and sperm whale (*Physeter macrocephalus*) interactions with longline vessels in the Patagonia toothfish fishery at South Georgia, South Atlantic. *Convention on the Conservation of Antarctic Marine Living Resources* 11:111-126.
- QUELLER, D. C y K. F. Goodnight. 1989. Estimating relatedness using molecular markers. *Evolution* 43: 258-275.
- RAYMOND, M. y Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86:248-249.
- RICHARD, K. R., S. W. McCarry, J. M. Wright. 1994. DNA-sequence from SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. *Canadian Journal of Zoology* 873-877.
- 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
- RITLAND, K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetics Research* 67:175-186.
- RITLAND, K. 1999. Detecting inheritance with inferred relatedness in nature, in *Adaptive Genetic Variation in the Wild*, edited by T. Mousseau. Oxford University Press, Oxford (En prensa).

- SAITOU 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., T. Maniatis, E.F. Fritsch. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2da. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANTURE, A. W., J. Stapley, A. D. Ball, T. R. Birkhead, T. Burke y J. Slate. 2010. On the use of large marker panels to estimate inbreeding and relatedness: empirical and simulation studies of a pedigreed zebra finch population typed at 771 SNPs. *Molecular Ecology* 19:1439-1451.
- SEDDON, J. M., H. G. Parker, E. A. Ostrander y H. Ellegren. 2005. SNPs in ecological and conservation studies: a test in the Scandinavian wolf population. *Molecular Ecology* 14:503-511.
- SIGLER, M. F., C. R. Lunsford, J.M. Straley y J.B. Liddle. *Sperm whale depredation of sablefish longline gear in the northeast Pacific Ocean. Proceedings from the symposium: Fisheries Depredation by Killer and Sperm Whales: Behavioural Insights, Behavioural Solutions. Pender Island, British Columbia 2-5 Oct 2006.*
- SIGLER, M. F., C. R. Lunsford, J. M. Straley. 2008. Sperm whale depredation of sablefish longline gear in the Northeast Pacific Ocean. *Marine mammal science* 24(1):16-27.
- STEPHENS, M., N. J. Smith, y P. Donnelly. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68:978-989.
- STRALEY, J., V. O'Connell, L. Behenken, A. Thode, J. Liddle, y S. Mesnick. 2006. Sperm whale and longline fisheries interactions in the Eastern Gulf of Alaska. *Proceedings from the symposium: Fisheries Depredation by Killer and Sperm Whales: Behavioural Insights, Behavioural Solutions. Pender Island, British Columbia 2-5 Oct 2006.*
- STRALEY, J., A. M. Thode, K. Kendall, V. O'Connell, L. Behnken, D. Mathias y J. Liddle. 2009. Testing low-cost methods to reduce sperm whale depredation in the Gulf of Alaska: Is avoidance a viable strategy? En: 18va Conferencia Biental de Biología de Mamíferos Marinos, Libro de resúmenes. p. 247-248
- TABERLET P, L. P. Waits y G. Luikart. 1999. Noninvasive genetic sampling: Look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14(8):323-327.

- THOMAS, S. C. 2005. The estimation of genetic relationships using molecular markers and their efficiency in estimating heritability in natural populations. *Philosophical Transactions of The Royal Society of Biological Science* 360:1457-1467.
- THOMPSON, E. A. 1975. The estimation of pairwise relationships. *Annals of Human Genetics* 39:173-188.
- TIXIER, P., N. Gasco y G. Duhamel. 2009. Interactions of killer and sperm whales with the Patagonian toothfish fishery off the Crozet Islands: An assessment of depredation levels and impacts on the cetacean population. En 18va. Conferencia Biannual de Biología de Mamíferos Marinos. Libro de resúmenes. p. 258.
- VALIÈRE N. 2002. GIMLET: A computer program for analyzing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2:377-379
- VALSECCHI E. y W. Amos. 1996. Microsatellite markers for study of cetacean populations. *Molecular Ecology* 5:151-156.
- VAN DE CASTEELE, T., P. Galbusera y E. Matthysen. 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology* 10:1539-1549.
- VAN OOSTERHOUT, C. W. F. Hutchinson, D. P. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-38.
- VIGNAL, A., D. Milan, M. San Cristobal y A. Eggen. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34:275-305.
- WANG, J. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203-1215.
- WANG, J. 2006. Informativeness of genetic markers for pairwise relationship and relatedness inference. *Theoretical Population Biology* 70:300-321.
- WANG, J. 2007. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetics Research* 89:135-153.
- WANG, J. 2010. COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* (En prensa).

- WASER, P. M. y C. Strobeck. 1988. Genetics signature of interpopulation dispersal. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 43-44.
- WERNER, F. A., O. G. Durstewitz, F. A. Habermann, G. Thaller, W. Kramer, S. Kollers, J. Buitkamp, M. Georges, G. Brem, J. Mosner, y R. Fries. 2004. Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. *Animal Genetics* 35: 44-49.
- WEIR, B. S., A. D. Anderson y A. B. Hepler. 2006. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Review. Genetics* 7:771-780.
- WHITEHEAD, H. 2003. *Sperm Whale: Social evolution in the ocean*. Chicago: University of Chicago Press. 431pp.
- WILKENING, S., B. Chen, K. Hemminki y A. Försti. 2006. STR Markers for kinship analysis. *Human Biology* 78(1):1-8.
- WILSON, A. J. y M. M. Ferguson. 2002. Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications and practical considerations. *Canadian Journal Fishery and Aquatic Sciences* 59:1696-1707.

ANEXO 1

Lista de SNPs evaluados en el estudio en el que se denota la concentración de $MgCl_2$ y cebadores, temperaturas de amplificación, así como también el número de SNPs por locus.

Locus	SNP	Temperatura de amplificación °C	Concentración de cebador alelos específico	Concentración $MgCl_2$	Número de loci ligados y nombre de ensayo
CATR 456	A/G	62	0.25 μ M A 0.50 μ M G	1.8	(2) CATR262-R456
CATR 262	A/G	58	0.5 μ M ambos	1.8	
CHRNA1Y 111	C/T	58	0.5 μ M ambos	2.5	(2) CHRNAR78-Y111
CHRNAR 76	A/G	62	0.5 μ M ambos	2.5	
CKK 273	G/T	58	0.5 μ M ambos	1.8	
CSF2R 278	A/G	58	0.50 μ M A 0.25 μ M G	2.5	(3) CSF2K552-R278-Y589
CSF2K 552	G/T	58	0.5 μ M ambos	1.5	
CSF2Y 589	C/T	58	0.5 μ M ambos	1.8	
DRD2Y 679	C/T	58	0.5 μ M ambos	1.8	
ELN40K 209	G/T	58	0.5 μ M ambos	1.8	
EPOY 292	C/T	58	0.5 μ M ambos	1.8	(2) EPOR237-R292
EPOR 237	A/G	58	0.5 μ M ambos	2.5	
F9Y 80	C/T	62	0.5 μ M ambos	1.5	
GRPY 190	C/T	62	0.5 μ M ambos	1.8	
IFNGY234	C/T	58	0.5 μ M ambos	1.8	
INTS 368	C/G	58	0.5 μ M ambos	1.8	
PKMY 237	C/T	58	0.5 μ M ambos	1.8	
PNDR 111	A/G	58	0.5 μ M ambos	1.5	
RDSK 456	G/T	58	0.5 μ M ambos	1.8	
RYR2R 327	A/G	58	0.50 μ M A 0.25 μ M G	1.8	
SPTBN1S 279	C/G	58	0.5 μ M ambos	2.5	(2) SPTBN1S279-Y753
SPTBN1Y 753	C/T	58	0.5 μ M ambos	1.8	
PmABHD5M 274	A/C	58	0.5 μ M ambos	2.5	(3) PmABHD5M274-Y447-R671
PmABHD5Y 447	C/T	58	0.5 μ M ambos	2.5	
PmABHD5R 671	A/G	62	0.5 μ M ambos	2.5	
PmBH92S 122	C/G	58	0.5 μ M ambos	2.5	(2) PmPH92S122-Y172
PmBH92Y 172	C/T	60	0.5 μ M ambos	1.8	
PmCHYR 304	A/G	60	0.5 μ M ambos	1.8	
PmDDX5R 109	A/G	58	0.5 μ M ambos	1.5	
PmHSPA9Y 220	C/T	58	0.5 μ M ambos	1.5	
PmLAPTM4R 553	A/G	58	0.5 μ M ambos	1.5	
PmMYL4R 358	A/G	60	0.5 μ M ambos	1.8	
PmPHGDHS 172	A/C	58	0.5 μ M ambos	2.5	(4) PmPHGDHS1/2-M200-R223-Y321
PmPHGDHM 200	A/G	58	0.5 μ M ambos	1.8	
PmPHGDHR 223	C/G	58	0.5 μ M ambos	1.5	
PmPHGDHY 321	C/T	58	0.5 μ M ambos	1.5	

ANEXO 2

Lista de cebadores usados en la preamplificación (cebadores usados en PCR múltiplex y cebador común reverse) y los usados en el qPCR. 1 Presentes en el PCR múltiplex de 28 SNPs, 2 Presente en el PCR múltiplex de 4 SNPs y 3 presente en el PCR múltiplex de 2 SNPs.

Nombre del ensayo	Cebadores alelo específicos	Cebador común reverse	Cebador externo usado en PCR múltiplex
CATR262	*GCAACTAATTAAAAAATTGGTCAAGCA #GCAACTAATTAAAAAATTGGTCAAGCG	CCCTCATTACAGGCTAGGAAA	TGTTTTCTTTTAAAGTGCTTTGC1
CATR456	#TTTGCCAGGGAAGACTCAA *TGCCAGGGAAGACTCAGT	GTGAGTGCATTGTTGAACTTT	TCCCTTCCAGTTCCTGTTG1
CHRNA1Y111	*GTTTGGCTTGATGGGAAGGC #GGTTTGGCTTGATGGGAAGGT	GGCACATCTTACGTAGTAGCT	GTGAGACCAGGAGTCCATAACG1
CHRNAR76	*CAAGCCAAACCCATCCCTCTGTGCTC #CAAGCCAAACCCATCCCTCTGTGCTT	GTGAGACCAGGAGTCCAATAACG	GGCACATCTTACGTAGTAGCT1
CKK273	*TTAAGAACGCGCCTTCCCG *CTAAGAACGCGCCTTCCCT	ACAGGTGGTGGCAGGATT	CCACCCCTATGTTCAAGCAC3
CSF2K552	*CATGGCTGGTCACTAATAAAGG #CATGGCTGGTCACTAATAAAGT	CTTTGCCCTGTGGTAGT	CCCCTGAATGCTAGGTCTG1
CSF2R278	*GAGGACAGTGACCTCTGTTTCT *AGGACAGTGACCTCTGTTTCC	AGCACAGCCACATTCCCTT	CTTTGCTCACAGCAGGTC1
CSF2Y589	#AGAAGGAGGGTTGCTCAGGAG *AGAAGGAGGGTTGCTCAGGAA	GACTACCACAGGGGCAAA	GCCAGAAGGAGGGTTGCT1
DRD2Y679	*TGTAATTGTTTATGATGCCACACG #ATGGTAATTGTTTATGATGCCACACA	TACACCTTTGCCGGATTCTT	GGGTTAGGTCTCGTTACGA1
ELN40K209	#GTCCTGACCCCATCCG *CGTCTGACCCCATCCT	AGCGGCACCTGAGAAGAG	TCCCTTAACTGTGGCTCGT1
EPOR237	*GGGACCACCACTCTTATTACTTTACT #GGGACCACCACTCTTATTACTTTACC	AAGATCCAGGAACCTGGAGT	GAAATGCACAAGCCTGGAGT1
EPOY292	*TGAAGCTAGGTAAGGGGC #GGAAGCTAGGTAAGGGGT	GAAATGCACAAGCCTGGAGT	AAGATCCAGGAACCTGGAGT3
F9Y80	*TCGATTTGATTCCTCTCTATTGTAACATTC *CGATTTGATTCCTCTCTATTGTAACATTT	GGGAACCATACTTGCCTTTGGAA	CGAAAAAAGACAGGTTAATGG1
GRPY190	#TCCTTTCAAGGTTGACCTGGTCT *CCTTTCAAGGTTGACCTGGTT	CCCCCCCCCACTTTCTTTTTT	TGCAGCAGGACATCAAGTTC1
IFNGY234	#GCCCTGAGATAAAGCCTTGT *TTGGCCCTGAGATAAAGCCTTA	ACTCACTAGGCAAGTCTATGTGATT	CCTAGTTGGCCCTGAGATA1
INTS368	*GCACAGAGGAAGGGAGGG #GCACAGAGGAAGGGAGGC	CAATCTCTGCGGGACAGTT	GAACCTCAGCAAGGGCCC1
PKMY237	#CTTTTGGACATGCTCTGTACAA *CTTTTGGACATGCTCTGTACAG	AGACTTGGCCAGCCCTCTAT	CTTCCTTAGCAGAGCGTCTCA1
PmABHD5M274	*ACAGACAGGTCCAATAGCACTGA #TAGACAGGTCCAATAGCACTGC	ACCTCTAACAATAGGGCCAACA	TCTGTCTAGAGCCACAGCA1
PmABHD5R671	#GATCTGTGACACTGTGGACTGAA *ATCTGTGACACTGTGGACTGAG	GGAACGTATTAGCCATGTGCAT	AGGAGATCTGTGACACTGTGGA1
PmABHD5Y447	*ACAGATCAGTATTGCTTTTCTTTTATGTTTAC #ACAGATCAGTATTGCTTTTCTTTTATGTTTAT	CACAATGACACACAAAGACAT	ACTACAGATCAGTATTGCTTTTCTTTT1
PmBH92S122	*CTGTCTGTGAGTGTCATTAGCAC #GTCTGTGAGTGTCATTAGCAG	TGACTGTATTTCACTTTACTTGCACT	GGCCTATGGTAGGTATCCTGTC1
PmBH92Y172	*GTCAACTGATAGAAGTGTTTATAGTAC #TACAGTCAACTGATAGAAGTGTTTATAGTAT	GCTCAACCAATAAAAAAAGCTA	
PmCHYR 304	#TAGCAGCCTGGGAGGGATAGTT *TAGCAGCCTGGGAGGGATAGTC	ACTGTCCCTGTCTGATCAT	CACCCCATGACCCTGTGTA2
PmDDX5R109	*CTGTTCCGACAGTCATCCTTT #CTGTTCCGACAGTCATCCTTC	ACAGAGGTTACAGTCGTTCC	CCCCTTTTGCCAACAGAGTA2
PmHSPA9Y220	#TCTCTACATAGCCATTATGGAACCTCA *TCTCTACATAGCCATTATGGAACCTCG	GTAGTCAAGAAGGGAGGAAGAA	CTGTCACTGATGGCTCCTACA1
PmLAPTM4R553	#GGTGGTCTGTTGAGTTTCGCA	CCAAACACAGTTGATTAGATAAGCCTA	GAGCAGGTGGTCTGTTGAGTT2

ANEXO 3

Frecuencia alélica de cada locus en la muestra total (n = 232) y entre los cachalotes machos del Pacífico Norte (n = 39). Frecuencia alélica para los 6 microsatélites y 36 SNPs de cachalotes del Pacífico Norte. Para el caso de microsatélites el tamaño de alelos esta en pares de bases (pb) y se muestran en negritas. Los alelos subrayados denotan alelos privados para los machos del estudio. Para los SNPs 1, 2, 3 y 4 denotan: Adenina, Guanina, Citosina y Timina respectivamente.

Locus	Frecuencia global	Frecuencia en machos	Locus	Frecuencia global	Frecuencia en machos
D 17			SW 10 continuación		
143	0,059	0,051	156	0,205	0,192
150	0,011	0,000	158	0,151	0,179
154	0,007	0,000	160	0,112	0,141
160	0,009	0,026	162	0,060	0,026
161	0,098	0,090	164	0,041	0,038
163	0,172	0,179	166	0,022	0,026
165	0,107	0,128	168	0,004	0,000
167	0,146	0,154	170	0,002	0,000
169	0,028	0,000			
171	0,061	0,038	SW 13		
173	0,033	0,000	152	0,002	0,000
175	0,041	0,051	154	0,011	0,013
177	0,037	0,038	158	0,002	0,013
179	0,059	0,051	160	0,007	0,000
181	0,007	0,013	163	0,089	0,090
182	0,015	0,013	165	0,084	0,103
184	0,020	0,026	167	0,307	0,282
186	0,039	0,026	169	0,171	0,141
188	0,030	0,026	171	0,076	0,077
190	0,013	0,064	173	0,120	0,103
192	0,011	0,026	175	0,082	0,141
			177	0,022	0,026
			179	0,027	0,013
EV 1			SW 19		
115	0,002	0,000	93	0,018	0,013
123	0,004	0,000	100	0,071	0,053
125	0,566	0,513	108	0,009	0,000
127	0,050	0,066	110	0,009	0,013
129	0,013	0,026	117	0,013	0,000
131	0,009	0,000	119	0,033	0,066
133	0,031	0,026	121	0,002	0,000
135	0,059	0,013	123	0,009	0,026
137	0,022	0,053	125	0,078	0,079
140	0,048	0,079	127	0,078	0,118
142	0,183	0,211	130	0,062	0,039
144	0,011	0,013	132	0,098	0,118
146	0,002	0,000	134	0,107	0,079
			136	0,100	0,092
EV 5			138	0,120	0,092
153	0,013	0,013	140	0,096	0,066
159	0,368	0,408	142	0,036	0,053
161	0,117	0,105	145	0,027	0,053
163	0,320	0,263	147	0,004	0,000
166	0,052	0,092	149	0,013	0,013
170	0,015	0,026	151	0,002	0,000
172	0,084	0,066	153	0,004	0,013
174	0,022	0,026	166	0,002	0,000
176	0,009	0,000	167	0,002	0,000
			169	0,004	0,013
SW 10			171	0,002	0,000
143	0,009	0,013	CATR262		
145	0,002	0,013	1	0,185	0,115
148	0,030	0,013	2	0,815	0,885
150	0,097	0,103			
152	0,159	0,231			
154	0,106	0,026			

Continuación

Locus	Frecuencia global	Frecuencia en machos	Locus	Frecuencia global	Frecuencia en machos
CATR456			INTS368		
1	0,197	0,141	1	0,489	0,564
2	0,803	0,859	4	0,511	0,436
CHRNAR76			PKMY237		
1	0,056	0,051	3	0,821	0,846
2	0,944	0,949	4	0,179	0,154
CHRNA1Y111			PmABHD5M274		
3	0,801	0,808	2	0,046	0,064
4	0,199	0,192	4	0,954	0,936
CKK273			PmABHD5Y447		
1	0,549	0,513	3	0,715	0,756
3	0,451	0,487	4	0,285	0,244
CSF2R278			PmABHD5R671		
3	0,961	0,962	1	0,280	0,205
4	0,039	0,038	2	0,720	0,795
CSF2K552			PmBH92S122		
1	0,595	0,577	1	0,638	0,641
3	0,405	0,423	4	0,362	0,359
CSF2Y589			PmBH92Y172		
3	0,175	0,167	3	0,252	0,295
4	0,825	0,833	4	0,748	0,705
DRD2Y679			PmCHYR304		
3	0,480	0,397	1	0,978	0,987
4	0,520	0,603	2	0,022	0,013
ELN40K209			PmDDX5R109		
1	0,389	0,321	1	0,671	0,742
3	0,611	0,679	2	0,329	0,258
EPOR237			PmHSPA9Y220		
1	0,906	0,903	3	0,074	0,090
2	0,094	0,097	4	0,926	0,910
EPOY292			PmLAPTM4R553		
3	0,229	0,231	1	0,145	0,179
4	0,771	0,769	2	0,855	0,821
F9Y80			PmMYL4R358		
3	0,551	0,487	1	0,665	0,654
4	0,449	0,513	2	0,335	0,346
GRPY190			PmPHGDHS172		
3	0,965	0,949	1	0,260	0,237
4	0,035	0,051	4	0,740	0,763
IFNGY234			PmPHGDHM200		
3	0,100	0,132	2	0,914	0,923
4	0,900	0,868	4	0,086	0,077
PmPHGDHR223			PNDR111		
1	0,145	0,179	1	0,527	0,513
2	0,855	0,821	2	0,473	0,487
PmPHGDHY321			RDSk456		
3	0,405	0,397	1	0,865	0,808
4	0,595	0,603	3	0,135	0,192

Continuación

Locus	Frecuencia global	Frecuencia en machos
RYR2R327		
1	0,340	0,351
2	0,660	0,649
SPTBN1S279		
1	0,185	0,179
4	0,815	0,821
SPTBN1Y753		
3	0,116	0,141
4	0,884	0,859

ANEXO 4

Resúmenes estadísticos para las ocho estimaciones realizadas, contrastando las estimaciones generadas por cada uno de los estimadores presentes en COANCESTRY v.1. (Wang, 2010). En cada cuadro se puede observar el promedio y varianzas por estimadores y los coeficientes de correlación entre cada par de estimadores.

Msats							
n=26796	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Media	0.052	-0.004	0.000	-0.004	-0.004	-0.005	0.064
Varianza	0.008	0.028	0.033	0.014	0.011	0.030	0.011
Coeficientes de correlación	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
TrioML	1						
Wang	0.711	1					
LynchLi	0.683	0.874	1				
LynchRd	0.786	0.753	0.695	1			
Ritland	0.690	0.601	0.645	0.870	1		
QuellerGt	0.705	0.816	0.941	0.729	0.686	1	
DyadML	0.976	0.740	0.705	0.807	0.703	0.721	1
SNPs							
n=26796	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Media	0.088	-0.028	-0.028	-0.004	-0.004	-0.004	0.096
Varianza	0.015	0.079	0.079	0.035	0.035	0.050	0.017
Coeficientes de correlación	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
TrioML	1						
Wang	0.640	1					
LynchLi	0.644	0.998	1				
LynchRd	0.830	0.697	0.699	1			
Ritland	0.781	0.687	0.690	0.972	1		
QuellerGt	0.745	0.817	0.821	0.841	0.814	1	
DyadML	0.991	0.643	0.647	0.839	0.791	0.750	1
Msats + SNPs							
n=26796	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Media	0.043	-0.007	-0.016	-0.004	-0.004	-0.004	0.053
Varianza	0.005	0.025	0.032	0.009	0.026	0.028	0.006
Coeficientes de correlación	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
TrioML	1						
Wang	0.590	1					
LynchLi	0.590	0.705	1				
LynchRd	0.740	0.657	0.620	1			
Ritland	0.652	0.416	0.646	0.683	1		
QuellerGt	0.651	0.622	0.840	0.668	0.793	1	
DyadML	0.977	0.622	0.607	0.794	0.652	0.662	1

Msats + SNPs (16 SL + 8 HP)							
n=26796	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Media	0.038	-0.009	-0.010	-0.004	-0.004	-0.004	0.050
Varianza	0.004	0.022	0.026	0.009	0.023	0.024	0.006
Coeficientes de correlación	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
TrioML	1						
Wang	0.598	1					
LynchLi	0.608	0.739	1				
LynchRd	0.726	0.675	0.640	1			
Ritland	0.578	0.387	0.622	0.624	1		
QuellerGt	0.636	0.619	0.871	0.661	0.765	1	
DyadML	0.972	0.642	0.637	0.793	0.583	0.658	1
Msats + SNPs (16 SL + 8 HP*)							
n=26796	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Media	0.038	-0.009	-0.010	-0.004	-0.004	-0.004	0.050
Varianza	0.004	0.022	0.026	0.009	0.023	0.024	0.006
Coeficientes de correlación	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
TrioML	1						
Wang	0.598	1					
LynchLi	0.608	0.739	1				
LynchRd	0.726	0.675	0.640	1			
Ritland	0.578	0.387	0.622	0.624	1		
QuellerGt	0.636	0.619	0.871	0.661	0.765	1	
DyadML	0.972	0.642	0.637	0.793	0.583	0.658	1
Msats + SNPs (8 HP)							
n=26796	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Media	0.041	-0.008	-0.007	-0.004	-0.004	-0.004	0.055
Varianza	0.004	0.024	0.029	0.010	0.017	0.026	0.007
Coeficientes de correlación	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
TrioML	1						
Wang	0.635	1					
LynchLi	0.630	0.798	1				
LynchRd	0.745	0.706	0.652	1			
Ritland	0.597	0.427	0.622	0.684	1		
QuellerGt	0.651	0.692	0.908	0.672	0.716	1	
DyadML	0.975	0.675	0.659	0.794	0.611	0.674	1
Msats + SNPs (16 SL)							
n=26796	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Media	0.042	-0.005	-0.007	-0.004	-0.004	-0.004	0.059
Varianza	0.005	0.027	0.035	0.011	0.036	0.033	0.008
Coeficientes de correlación	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
TrioML	1						
Wang	0.609	1					
LynchLi	0.595	0.709	1				
LynchRd	0.710	0.683	0.623	1			
Ritland	0.543	0.358	0.620	0.555	1		
QuellerGt	0.619	0.589	0.862	0.630	0.777	1	
DyadML	0.964	0.659	0.631	0.785	0.542	0.643	1

Msats + SNPs ($q \geq 0.2^{**}$)							
n=26796	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Media	0.044	-0.006	-0.008	-0.004	-0.005	-0.004	0.062
Varianza	0.006	0.028	0.037	0.012	0.046	0.035	0.009
Coeficientes de correlación							
TrioML	1						
Wang	0.629	1					
LynchLi	0.606	0.712	1				
LynchRd	0.715	0.703	0.634	1			
Ritland	0.510	0.372	0.692	0.519	1		
QuellerGt	0.634	0.579	0.856	0.643	0.886	1	
DyadML	0.967	0.674	0.641	0.781	0.519	0.655	1

