



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**DEMOGRAFÍA HISTÓRICA Y SALUD GENÉTICA DE LA POBLACIÓN  
DE BALLENA GRIS *Eschrichtius robustus* DEL PACÍFICO  
NORORIENTAL CON BASE EN SECUENCIAS DE ADN  
MITOCONDRIAL Y NUCLEAR.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**CRISTINA GONZÁLEZ RUBIO SANVICENTE**

**Ensenada, Baja California, México**

**Octubre del 2010**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**DEMOGRAFÍA HISTÓRICA Y SALUD GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE  
BALLENA GRIS *Eschrichtius robustus* DEL PACÍFICO NORORIENTAL CON  
BASE EN SECUENCIAS DE ADN MITOCONDRIAL Y NUCLEAR.**

**TESIS QUE PRESENTA**

**Cristina González Rubio Sanvicente**

**Aprobada por**

Dr. Luis Manuel Enriquez Paredes  
Director de tesis

M. C. Adrian Munguía Vega  
Sinodal de tesis

Dra. Yolanda Schramm Urrutia  
Sinodal de tesis

## **DEDICATORIA**

A mi familia, en particular a mis abuelos y padres, quienes me inspiran, motivan y acompañan en cada momento de mi vida. Porque gracias a ustedes estoy aquí, y con su ejemplo me motivan a superarme. A mi abue Bertha, ser humano extraordinario y guerrera de vida; a mi papi Jando, por ser el mejor papa del mundo, y enseñarme día a día que vida solo hay una y hay que disfrutarla, y verla siempre con optimismo; a mi mami Alejandra, por enseñarme que todo es posible, que ninguna puerta está cerrada, simplemente porque yo puedo abrirla; a Agustín, porque desinteresadamente y con todo cariño, te convertiste en otro padre para mí; a mí tía Andrea, quien por amor y gran nobleza, ha cumplido con múltiples papeles en mi vida: madre, padre, y amiga. LOS AMO.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de personas y de circunstancias, que directa o indirectamente, me llevaron al lugar y momento indicado.

En primer lugar, quiero agradecerle a mi querido director de tesis, el Dr. Luis M. Enríquez Paredes (El Dire), quien no solo merece mi más profundo y sincero agradecimiento, sino la mayor de las admiraciones. Una admiración, que más allá del aspecto profesional y académico, recae en la calidad de un ser humano noble, comprometido y lleno de valores y principios. Gracias, a ese momento en el que tal vez, sin tanto pensar, decidiste “arriesgarte” y aceptarme como tu estudiante. Agradezco enormemente las circunstancias que me llevaron a formar parte de tu trabajo, y más aun, tu confianza, invaluable consejos, apoyo incondicional, extrema paciencia y dedicación, y por supuesto, tu amistad.

Al M.C. Adrian Munguía Vega, sinodal de tesis, quien a pesar de no conocerme, gracias a su entusiasmo, comprensión, nobleza, y su enorme pasión por la labor científica, no solo accedió a formar parte de mi comité de tesis, sino que además, me brindo su confianza y apoyo incondicional. Adrian, muchas gracias por tu tiempo, y por tu invaluable participación.

A la Dra. Yolanda Schramm Urrutia, sinodal de tesis, quien en último momento accedió a formar parte del comité, muchas gracias por tu tiempo, interés hacia este trabajo, y por tu apoyo y preocupación durante la maestría.

Al Dr. Sergio Flores Ramírez, por haberme invitado a formar parte de este proyecto, que me llevó a vivir, uno de los momentos más satisfactorios y plenos de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyar económicamente mi formación académica (Beca CONACyT-208525).

A UC-MEXUS, por el apoyo económico brindado para la realización del proyecto titulado “A Tale of three species: Adaptive Genetic Variation in three Cetacean species with Contrasting Historical Demography and Life History Traits”, coordinado por el Dr. Sergio Flores Ramírez, dentro del cual se desarrollo el presente trabajo de tesis de maestría.

Al Dr. Alexei F. Licea Navarro y Dra. Edna Sánchez Castrejón del laboratorio de Inmunología Molecular y Toxinas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por permitirnos el acceso a su laboratorio, y por el apoyo técnico para la clonación de individuos de ballena gris.

A la Dra. Joan Chen y la técnico Felis Wolven del Microchemical Core Facility Lab de la Universidad de San Diego State (SDSU), por sus servicios para el análisis de los SSCP's, así como por la asesoría para la interpretación de los resultados, y la clonación de individuos de ballena gris.

A la Dra. Melanie Culver del Conservation Genetics Lab (School of Natural Resources and Environment) de la Universidad de Arizona, Tucson AZ., por brindarme todas las facilidades para realizar la estancia de investigación en su laboratorio, por su interés en mi trabajo de tesis, preocupación y constante apoyo durante mi estancia. A todos los compañeros de laboratorio, Ashwin, Susan, Robert, Anna, y por supuesto Adrian.

Al Dr. Christian Ortega Ortiz de la Universidad de Colima, por su desinteresado apoyo y colaboración con los modelos no genéticos (SOLVER y ADMB).

Al personal administrativo de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, en particular a Angélica Arce, por su gran apoyo, disposición y paciencia, con los trámites y papeleo durante el periodo de maestría.

Un agradecimiento muy especial a Dalila, Mis tíos Pepe, Rudy y familia, así como a Ricardo Thompson Ramírez, Lissette de Thompson y familia, quienes me abrieron las puertas de su casa, estuvieron al pendiente de mi llegada a Ensenada, y nunca dejaron de estarlo.

A Billy y Cinny Hall, Tami y Grant Hall, Laura y el resto de la familia y amigos, porque durante mi estancia de investigación en Tucson AZ., me brindaron la hospitalidad de su hogar, y me hicieron parte de su familia. Hoy, siguen siendo parte de mi familia.

A mis más queridas “roomies”. Maby, porque sin ti, el inicio de esta etapa no hubiera sido tan divertida, aventurada y extrovertida. Yuyus, porque definitivamente sin ti, la maestría no hubiera sido la misma. Gracias por ser mi compañera en este viaje, mi amiga, mi hermana, mi confidente. Gracias por aguantarme, apoyarme y regañarme, en las buenas, en las malas, y en las peores. Simplemente las adoro.

A mis compañeros, amigos y hermanos del Laboratorio de Ecología Molecular y del postgrado de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, y de CICESE. A Miki, Sandy (peque), Jimena, Nelva (balle), Michelle, Karlita, Lalito, Ricardo y Santiago, mis hermanos gracias por su compañía, apoyo y colaboración durante el trabajo de laboratorio y toda la maestría. Este trabajo, también es de ustedes. A Paola, Polo, Raque, Denise, Aaron, Emyr, Vanessa, Alethia, e Isaura, por los momentos compartidos, las risas regaladas, su confianza, compañerismo, y desinteresada amistad. A George, Dany, y Abraham (tocayo-hijo-hermano), por su constante animo y buenas vibras, por nunca dejar de estar al pendiente. A Fernando, por haber formado parte importante, de esta etapa de vida.

Muy especial a Gris, Alan, Carlos, La china, Obed, quienes agregaron un toque de “salsa” y más diversión a Ensenada. Los quiero y extraño.

A mis amigos y hermanitos de años, Normita, Alejandra, Marisol, Pau Martínez, Pau Pérez, Marcia, Pita, Abril, Mirella, Edith, Daniela, Memo, Polo Arreola, Miguel Tripp (mi flaquito), Mario (muñeco), Mario Díaz, Faby, Macarena, Tita, Ivette, Lulú (soul mate), quienes a pesar del paso de los años y la distancia, siguen siendo compañeros de viaje. Lulipop, gracias por ser quien eres, por estar a mi lado siempre, por tener tanto que decir sin necesidad de hablar, y por encontrarnos en esta vida.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a quienes tal vez, no forman parte integral de esta etapa, pero si esencial para su término. Lulú Jáuregui y Juan Fierro, gracias por permitirme entrar en su familia, por confiar y creer en mí. Walther, gracias por ser parte de un motivo que me impulso a mirar hacia adelante.

A todos ustedes, y a quienes no mencione por olvido o descuido, muchas gracias. Aprendí mucho de ustedes, y espero seguir aprendiendo.

## RESUMEN

El estado actual de recuperación y de salud genética de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental (PNO) fue evaluado mediante el análisis de la diversidad genética neutral (ADNmit) y la diversidad genética adaptativa (DQB exón 2 *Mhc-II*). El análisis de 93 individuos, permitió la identificación de 30 haplotipos mitocondriales. Los niveles de diversidad genética neutral, resultaron relativamente altos al compararlos con aquellos reportados en poblaciones de misticetos; así mismo, no se observaron evidencias que indiquen que la captura comercial haya provocado un severo cuello de botella. Por otra parte, al comparar el tamaño poblacional histórico obtenido a partir del modelo genético tradicional ( $\theta = 2Ne \mu$ ) y de un modelo genético corregido que incorpora dos parámetros derivados de la reconstrucción filogenética (número de haplotipos/tasa de mutación intraespecífica), se observó que la estimación a través del modelo corregido (28,583 individuos), es similar a los reportados por la IWC (18,000 – 28,000), y por los modelos no genéticos (SOLVER = 21,638 y ADMB = 21,642). En cuanto al estado actual de recuperación, los resultados generados de las simulaciones demográficas del modelo corregido (24,966), y los modelos no genéticos (SOLVER = 17,379, ADMB = 19,668), coinciden con los reportados para esta población mediante censos demográficos (20,110 individuos). Lo anterior, sugiere que la población actual representa más del 80% de su tamaño original. En cuanto a la diversidad genética adaptativa, los genes del sistema inmune han sido estudiados para comprender como la selección puede actuar para mantener el polimorfismo adaptativo de las poblaciones naturales. Este trabajo, representa la primera caracterización molecular del *locus* DQB exón 2 *Mhc-II* de la población de ballena gris. Los niveles de diversidad alélica son altos comparados con otras especies de cetáceos. Además, la especie presenta evidencias de los efectos de la presión de selección sobre los patrones de variación adaptativa, tales como duplicación génica, presencia de alelos no funcionales (pseudogenes) y altas tasas de sustituciones no sinónimas. La explicación más plausible para esta alta diversidad, es la peculiar historia de vida de la ballena gris (hábitos costeros, modo de apareamiento, tipo de alimentación, entre otros), la cual propicia el encuentro con variedad de patógenos que favorecen nuevas variantes alélicas, aumentando la diversidad adaptativa y su capacidad de respuesta ante cambios ambientales. En conclusión, las altas diversidades tanto neutral como adaptativa observadas, en conjunto con las estimaciones de abundancia histórica y actual, sugieren que la población de ballena gris del PNO presenta una buena salud genética, con un potencial de respuesta ante cambios ambientales y una considerable recuperación de los niveles de abundancia previos a las capturas comerciales.

## ABSTRACT

The current status of recovery and genetic health of the Eastern North Pacific gray whale Population (ENP) was assessed through the analysis of the neutral genetic diversity (mitDNA), and the adaptive genetic diversity (*Mhc-II* exon 2 DQB). Thirty mitochondrial haplotypes were depicted from the analysis of 93 individuals. The neutral genetic diversity levels were found to be relatively high when compared with other mysticetes; likewise, were not observed evidences that indicate that whaling should have provoked a severe bottleneck. To otherwise, to compared the historic population size obtained from the traditional genetic model ( $\theta = 2Ne \mu$ ), and a modified genetic model which incorporates two parameters derived from the phylogeny reconstruction (the number of haplotypes and the species/population mutation rate), the estimation through the modified model (28,583 individuals) was similar to reported by the IWC (18,000 - 28,000), and by the non genetic models (SOLVER = 21,638 and ADMB = 21,642). For the current status of recovery, the results through the demographic simulations of the modified model (24,966) and non genetic models (SOLVER = 17,376 and ADMB = 19,668), were similar to reported for this population through demographic censuses (20,110 individuals). The previous thing suggests that the current population represent more than 80% of the original size. For the adaptive genetic diversity, the immune system genes have been studied to understand how the selection acts to maintain the adaptive polymorphism of natural populations. This study represents the first molecular characterization of *Mhc-II* exon 2 DQB locus of the gray whale population. The allelic diversity levels are high to compare with other cetaceans; in addition, the allelic diversity present evidences of the effects of selection pressure on the adaptive variation pattern, like gene duplication, non functional genes (pseudogenes), and high non synonymous rate substitutions. The explanation more possible to this high diversity is the life history of gray whale (i.e. coastal habits, mating system, feeding, etc.), which promotes the encounter with various pathogens that favor new allelic variants, increasing the adaptive diversity and their response to environmental changes. In conclusion, the high neutral and adaptive diversity, together with the historical and current abundance estimates, suggest that the ENP gray whale population has a good genetic health, with a potential of response to environmental changes and a considerable recovery from commercial catches.

# CONTENIDO

## ÍNDICE GENERAL

|                                                               |              |
|---------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>DEDICATORIA.....</b>                                       | <b>i</b>     |
| <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>                                   | <b>ii</b>    |
| <b>RESUMEN.....</b>                                           | <b>vi</b>    |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                          | <b>vii</b>   |
| <b>CONTENIDO.....</b>                                         | <b>viii</b>  |
| <b>ÍNDICE GENERAL.....</b>                                    | <b>viii</b>  |
| <b>LISTA DE TABLAS.....</b>                                   | <b>xii</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                  | <b>xv</b>    |
| <b>LISTA DE ANEXOS.....</b>                                   | <b>xviii</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>                                   | <b>1</b>     |
| Diversidad Genética:                                          |              |
| Reflejo de la capacidad de recuperación de una población..... | 1            |
| <b>2. ANTECEDENTES.....</b>                                   | <b>8</b>     |
| Marcadores Moleculares                                        |              |
| ADN mitocondrial.....                                         | 8            |
| Complejo Principal de Histocompatibilidad.....                | 9            |
| <b>3. HIPÓTESIS.....</b>                                      | <b>18</b>    |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>                                      | <b>19</b>    |
| Objetivo General.....                                         | 19           |
| Objetivos Particulares.....                                   | 19           |

|                                                                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>                                                                                  | <b>21</b> |
| <b>5.1 Métodos Generales.....</b>                                                                                  | <b>21</b> |
| 5.1.1 Obtención de muestras.....                                                                                   | 21        |
| 5.1.2 Extracción del ADN total.....                                                                                | 22        |
| 5.1.3 Identificación Molecular del Sexo.....                                                                       | 23        |
| Amplificación.....                                                                                                 | 23        |
| <b>5.2 Métodos dirigidos a objetivos específicos.....</b>                                                          | <b>24</b> |
| 5.2.1 Análisis de la Diversidad de la Región Control del<br>ADN Mitocondrial.....                                  | 24        |
| Amplificación.....                                                                                                 | 24        |
| Secuenciación.....                                                                                                 | 25        |
| Edición y alineación de Secuencias.....                                                                            | 26        |
| 5.2.1.1 Diversidad genética y estructura genética.....                                                             | 26        |
| 5.2.1.2 Relaciones Filogenéticas.....                                                                              | 27        |
| 5.2.1.3 Historia Demográfica.....                                                                                  | 29        |
| 5.2.1.4 Estimación del tamaño histórico poblacional.....                                                           | 30        |
| 5.2.1.5 Simulación de Tendencias Demográficas:<br>Comparación de las estimaciones de abundancia<br>histórica ..... | 33        |
| 5.2.1.6 Modelos No Genéticos.....                                                                                  | 34        |
| a) Solver.....                                                                                                     | 34        |
| b) ADMB.....                                                                                                       | 35        |
| 5.2.2 Análisis de la Diversidad de DQB exón 2 <i>Mhc</i> – II.....                                                 | 36        |
| Amplificación.....                                                                                                 | 36        |
| Polimorfismo conformacional de cadena sencilla<br>(SSCP) automatizado.....                                         | 37        |
| Clonación de alelos DQB exón 2 <i>Mhc</i> – II.....                                                                | 39        |
| PCR de colonia y secuenciación de alelos DQB.....                                                                  | 40        |
| Edición y alineación de Secuencias.....                                                                            | 41        |
| 5.2.2.1 Diversidad Alélica.....                                                                                    | 41        |

|                                                                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.2.2 Relaciones Filogenéticas.....                                                                           | 42        |
| a) Análisis filogenético intra-específico de alelos<br>DQB de ballena gris.....                                 | 42        |
| b) Análisis filogenético inter-específico de<br>secuencias <i>Mhc-II</i> de mamíferos.....                      | 43        |
| 5.2.3 Segregación de alelos DQB por linajes<br>mitocondriales de ballena gris.....                              | 44        |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>                                                                                       | <b>45</b> |
| <b>6.1 Identificación molecular del sexo.....</b>                                                               | <b>45</b> |
| <b>6.2 Análisis de la Diversidad de la Región control del<br/>    ADNmit.....</b>                               | <b>46</b> |
| 6.2.1 Diversidad Genética.....                                                                                  | 49        |
| 6.2.2 Estructura Genética.....                                                                                  | 49        |
| 6.2.3 Relaciones Filogenéticas.....                                                                             | 51        |
| 6.2.4 Historia Demográfica.....                                                                                 | 56        |
| 6.2.5 Estimación del Tamaño Histórico.....                                                                      | 59        |
| 6.2.6 Simulación de Tendencias Demográficas:<br>Comparación de las estimaciones de abundancia<br>histórica..... | 64        |
| 6.2.7 Modelos No genéticos.....                                                                                 | 67        |
| <b>6.3 Análisis de la Diversidad del <i>locus</i> DQB exón 2 <i>Mhc-II</i>....</b>                              | <b>69</b> |
| 6.3.1 Naturaleza Histocompatible y Diversidad Alélica.....                                                      | 69        |
| 6.3.2 Relaciones Filogenéticas.....                                                                             | 85        |
| a) Análisis filogenético intra-específico de alelos DQB<br>de ballena gris.....                                 | 85        |
| b) Análisis filogenético inter-específico de secuencias<br><i>Mhc-II</i> de mamíferos.....                      | 89        |
| <b>6.4 Segregación de alelos DQB por linajes<br/>    mitocondriales de ballena gris.....</b>                    | <b>93</b> |
| <b>7. DISCUSIÓN.....</b>                                                                                        | <b>95</b> |
| <b>7.1 Identificación Molecular del Sexo.....</b>                                                               | <b>95</b> |
| Proporción de Sexos.....                                                                                        | 95        |

|                                                                           |            |
|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>7.2 Análisis de la Diversidad de la Región Control del ADNmit.....</b> | <b>98</b>  |
| 7.2.1 Diversidad Genética.....                                            | 98         |
| 7.2.2 Estructura Genética.....                                            | 99         |
| 7.2.3 Relaciones Filogenéticas.....                                       | 101        |
| 7.2.4 Historia Demográfica.....                                           | 104        |
| 7.2.5 Estimación del Tamaño Histórico.....                                | 107        |
| 7.2.6 Simulación de Tendencias Demográficas:                              |            |
| Comparación de las Estimaciones de Abundancia                             |            |
| Histórica entre Modelos Genéticos y No Genéticos.....                     | 111        |
| <b>7.3 Análisis de la Diversidad de DQB exón 2 <i>Mhc-II</i>.....</b>     | <b>115</b> |
| Consideraciones Metodológicas.....                                        | 115        |
| 7.3.1 Caracterización, Naturaleza Histocompatible y                       |            |
| Diversidad Alélica.....                                                   | 116        |
| 7.3.2 Diversidad Alélica por duplicación de genes.....                    | 120        |
| 7.3.3 Relaciones Filogenéticas.....                                       | 125        |
| a) Análisis filogenético intra-específico de alelos DQB                   |            |
| de ballena gris.....                                                      | 125        |
| b) Análisis filogenético inter-específico de secuencias                   |            |
| <i>Mhc-II</i> de mamíferos.....                                           | 126        |
| <b>7.4 Segregación de alelos DQB por linajes</b>                          |            |
| <b>    mitocondriales de ballena gris.....</b>                            | <b>128</b> |
| <b>7.5 Re-análisis de la demografía histórica e historia de</b>           |            |
| <b>    vida para evaluar el estado actual de salud</b>                    |            |
| <b>    genética de la población de ballena gris del</b>                   |            |
| <b>    Pacífico Nororiental.....</b>                                      | <b>130</b> |
| <b>8. CONCLUSIONES.....</b>                                               | <b>133</b> |
| Diversidad Neutral a nivel de la Región Control del ADNmit                |            |
| de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental.....             | 133        |
| Diversidad Adaptativa a nivel del gen DQB exón 2 <i>Mhc-II</i>            |            |
| de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental.....             | 134        |
| <b>9. LITERATURA.....</b>                                                 | <b>136</b> |
| <b>10 ANEXOS.....</b>                                                     | <b>146</b> |

## LISTA DE TABLAS

|                    |                                                                                                                                                                                                             |    |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>TABLA I.</b>    | Proporción de sexos por laguna y total.....                                                                                                                                                                 | 45 |
| <b>TABLA II.</b>   | Sitios variables entre los 30 haplotipos de ballena gris. Frecuencias de ocurrencia en las lagunas San Ignacio (LSI), Bahía Magdalena (BM) y Ojo de Liebre (LOL).....                                       | 48 |
| <b>TABLA III.</b>  | Índices de Diversidad Genética de las lagunas: San Ignacio, Bahía Magdalena y Ojo de Liebre.....                                                                                                            | 49 |
| <b>TABLA IV.</b>   | Análisis de varianza genética ( $F_{ST}$ ) y varianza Molecular ( $\Phi_{ST}$ ) mitocondrial entre los individuos de ballena gris de las lagunas de B.C.S.....                                              | 50 |
| <b>TABLA V.</b>    | Prueba de Neutralidad Selectiva ( $D^*_{Tajima}$ ) y descriptores demográficos del modelo de expansión para las tres lagunas (LSI, BM y LOL) y la población Total (bootstrap de 1000 réplicas).....         | 57 |
| <b>TABLA VI.</b>   | Parámetros empleados para la estimación del tamaño histórico con base en datos genéticos para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental.....                                                    | 62 |
| <b>TABLA VII.</b>  | Parámetros empleados en la simulación Monte Carlo (100,000 remuestreos) para la estimación del tamaño histórico de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental con base en modelos genéticos..... | 63 |
| <b>TABLA VIII.</b> | Estimaciones de abundancia histórica y actual a partir de modelos genéticos y no genéticos.....                                                                                                             | 67 |
| <b>TABLA IX.</b>   | Sitios variables a nivel nucleotídico entre los 25 alelos de DQB exón 2 encontrados en 15 individuos clonados de ballena gris.....                                                                          | 71 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>TABLA X.</b>    | Secuencias histocompatibles clase II homólogas a las secuencias de DQB exón 2 <i>Mhc</i> -II de ballena gris (EsroENP-DQB*01 – 25). Se muestran las identidades y el porcentaje de homología.....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 73 |
| <b>TABLA XI.</b>   | Secuencias de aminoácidos de alelos de DQB exón 2 MHC-II de ballena gris (EsroENP), ballena jorobada (Meno), ballena de aleta (Baph), ballena azul (Bamu), el tursion (Tutr), y el cerdo (Susc). Las posiciones sombreadas corresponden a las sustituciones de aminoácidos de ballena gris de importancia en la PBR; las posiciones que interactúan con el péptido están señaladas con •, y las que además forman parte de las cadenas laterales de la PBR están señaladas con ↓.... | 75 |
| <b>TABLA XII.</b>  | Sitios donde se dan las sustituciones de los aminoácidos de las secuencias aisladas. Los renglones en gris corresponden a posiciones donde los cambios son no conservativos, y renglones en blanco a cambios conservativos.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 77 |
| <b>TABLA XIII.</b> | Tasas de sustitución no sinónimas ( $d_N$ ) y sinónimas ( $d_S$ ) para el total de las secuencias, y dentro y fuera de la PBR, estimadas para ballena gris ( <i>Eschrichtius robustus</i> ), ballena de aleta ( <i>Balaenoptera physalus</i> ) y ballena azul ( <i>B. musculus</i> ).....                                                                                                                                                                                            | 78 |
| <b>TABLA XIV.</b>  | Tasas de sustitución no sinónimas ( $d_N$ ) y sinónimas ( $d_S$ ) dentro y fuera de la PBR, para las secuencias con codones de paro (pseudogenes), y el resto de las secuencias con marcos de lectura abiertos para ballena gris ( <i>Eschrichtius robustus</i> ).....                                                                                                                                                                                                               | 79 |
| <b>TABLA XV.</b>   | Tasas de sustitución no sinónimas ( $d_N$ ) y sinónimas ( $d_S$ ) dentro y fuera de la PBR, para cada locus asignado de los alelos DQB exón 2 de ballena gris ( <i>Eschrichtius robustus</i> ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 80 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>TABLA XVI.</b>  | Promedio de las tasas de sustitución no sinónimas ( $d_N$ ) y sinónimas ( $d_S$ ), y la proporción ( $d_N/d_S$ ), en a) Región de Unión del Péptido (PBR) de DQB exón 2 <i>Mhc-II</i> , para la ballena gris ( <i>Eschrichtius robustus</i> ), ballena de aleta ( <i>Balaenoptera physalus</i> ), ballena azul ( <i>B. musculus</i> ), el baiji ( <i>Lipotes vexillifer</i> , Yang <i>et al.</i> 2005), ballena franca del sur ( <i>Eubalaena australis</i> , Baker <i>et al.</i> 2006), ballena jorobada ( <i>Megaptera novaeangliae</i> , Baker <i>et al.</i> 2006) y la marsopa sin aleta ( <i>Neophocoena phocaenoides</i> , Xu <i>et al.</i> 2007); y b) Total de la secuencia de los <i>loci</i> DQB exón 2 <i>Mhc-II</i> (este trabajo), y exón 2 <i>Mhc-I</i> (Flores-Ramírez <i>et al.</i> 2000) para ballena gris..... | 82  |
| <b>TABLA XVII.</b> | Aproximación de la diversidad alélica del locus DQB exón 2 <i>Mhc-II</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 84  |
| <b>TABLA XVIII</b> | Características importantes de la evolución del <i>locus</i> DQB exón 2 en cetáceos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 122 |

## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 1.</b> | Mapa genético de los genes <i>Mhc</i> clase I (a) y clase II (b), exones y dominios proteicos (Modificado de Edwards <i>et al.</i> 2000).....                                                                                                                                                                                                            | 12 |
| <b>FIGURA 2.</b> | Principales Lagunas Costeras de reproducción y localidades de muestreo de la Población de Ballena gris del Pacífico Nororiental: Laguna Ojo de Liebre (LOL), Laguna San Ignacio (LSI), y Bahía Magdalena (BM) (Modificado de Alter <i>et al.</i> 2009).....                                                                                              | 21 |
| <b>FIGURA 3.</b> | Reconstrucción filogenética por Máxima Verosimilitud para los linajes mitocondriales de ballena gris. Modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei – Proporción de Sitios Invariantes (0.8493) – Distribución Gamma (1.0011). Sobre las ramas se indican los valores de remuestreo (10,000 replicas) que las sustentan.....                          | 53 |
| <b>FIGURA 4.</b> | Reconstrucción filogenética obtenida a través de Inferencia Bayesiana MCMC para los linajes mitocondriales de ballena gris. Modelo de sustitución nucleotídica GTR, con Proporción de Sitios Invariantes (0.05409), y Distribución Gamma (1.0). Sobre las ramas se indican los valores de probabilidad a posteriori durante 10,000,000 generaciones..... | 54 |
| <b>FIGURA 5.</b> | Reconstrucción filogenética por Neighbor-Joining para los linajes mitocondriales de ballena gris. Modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei, con proporción de sitios no variables (0.8493) y distribución Gamma (1.0011). Sobre las ramas se indican los valores de remuestreo (10,000 replicas) que las sustentan.....                          | 55 |
| <b>FIGURA 6.</b> | Distribución de la frecuencia del número de diferencias pareadas de los haplotipos mitocondriales de ballena gris. La curva simulada se obtuvo a partir de 1000 replicas por bootstrap,                                                                                                                                                                  |    |

mientras que la curva modelada corresponde al estimador de la prueba. A) Total de la población; B) Laguna San Ignacio; C) Bahía Magdalena; D) Laguna Ojo de Liebre.....58

- FIGURA 7.** Red de Mínima Separación de los 30 haplotipos de ballena gris. Cada círculo representa un haplotipo, mientras que el tamaño representa su frecuencia. Las conexiones, representan el número de diferencias nucleotídicas entre los haplotipos. LSI = Laguna San Ignacio, BM = Bahía Magdalena y LOL = Laguna Ojo de Liebre.....60
- FIGURA 8.** Trayectoria demográfica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental con base en los modelos genéticos. Las líneas en rojo representan el valor medio del intervalo de confianza de cada estimación; las líneas en grises corresponden a los límites del intervalo al 95% de confianza.....65
- FIGURA 9.** Trayectoria demográfica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental con base en las estimaciones de abundancia histórica obtenidas a partir de modelos genéticos. La línea en rojo representa el total de capturas por año desde 1600 hasta el 2008 (ver Anexo 2).....66
- FIGURA 10.** Tendencia demográfica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental a través del modelo genético corregido y de los modelos no genéticos.....68
- FIGURA 11.** Subárboles filogenéticos para la segregación de alelos DQB exón 2 *Mhc-II* en los *loci* supuestos para un solo individuo de ballena gris. Modelo de sustitución nucleotídica GTR, con proporción  $Ts/Tv$  de 0.5822. Se utilizó como grupo externo una secuencia de hipopótamo (*Hippopotamus amphibius*; no. acceso EF017819, Yang *et al.* 2006).....87

- FIGURA 12.** Reconstrucción filogenética por Neighbor – Joining de las secuencias aisladas de DQB exón 2 de ballena gris. Modelo de sustitución nucleotídica TVM, con distribución gamma de 0.97435, y una proporción Ts/Tv de 0.7310. Sobre las ramas se indican los valores de remuestreo (1,000 replicas) que las sustentan. Los \* indican los alelos correspondientes a un solo individuo. Se utilizó como grupo externo una secuencia de hipopótamo (*Hippopotamus amphibius*; HiamDQ, no. acceso EF017819, Yang *et al.* 2006).....88
- FIGURA 13.** Reconstrucción filogenética de la historia evolutiva de secuencias *Mhc-II* de ballena gris y otros cetartiodáctilos. Modelo de sustitución nucleotídica GTR con Distribución Gamma (0.6144). Sobre las ramas se indican los valores de remuestreo (10,000 replicas) que las sustentan.....92
- FIGURA 14.** Segregación de alelos DQB exón 2 MHC-II por linajes mitocondriales de ballena gris.  
A) Reconstrucción filogenética para los alelos DQB, con su respectivo haplotipo materno;  
B) MSN para los haplotipos mitocondriales de ballena gris.....94
- FIGURA 15.** Modelos de Evolución de familias de multigenes. Círculos claros representan genes funcionales; círculos oscuros corresponden a pseudogenes (tomado de Nei y Rooney 2005).....123

## LISTA DE ANEXOS

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>ANEXO 1.</b> | Datos de los individuos analizados de las lagunas de reproducción:                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|                 | a) LSI.....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 146 |
|                 | b) BM.....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 147 |
|                 | c) LOL.....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 148 |
| <b>ANEXO 2.</b> | Simulación de Trayectorias Demográficas de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental con base en el Modelo Logístico Generalizado de Dinámica Poblacional (IWC, 1999).....                                                                                                               | 149 |
| <b>ANEXO 3.</b> | Perfiles SSCP para la segregación de alelos DQB exón 2 <i>Mhc-II</i> de ballena gris del Pacífico Nororiental.....                                                                                                                                                                                   | 152 |
| <b>ANEXO 4.</b> | Perfiles SSCP poco frecuentes y exclusivos de las Lagunas de Reproducción de ballena gris del Pacífico Nororiental.....                                                                                                                                                                              | 156 |
| <b>ANEXO 5.</b> | Total de individuos clonados, y número de clonas secuenciadas para el locus DQB exón 2 <i>Mhc-II</i> :                                                                                                                                                                                               |     |
|                 | a) Ballena gris del Pacífico Nororiental.....                                                                                                                                                                                                                                                        | 157 |
|                 | b) Ballena azul del Golfo de California.....                                                                                                                                                                                                                                                         | 157 |
|                 | c) Ballena de aleta del Golfo de California.....                                                                                                                                                                                                                                                     | 158 |
| <b>ANEXO 6.</b> | Secuencias utilizadas para la reconstrucción filogenética de la historia evolutiva de secuencias <i>Mhc-II</i> de mamíferos:                                                                                                                                                                         |     |
|                 | a) Secuencias para el gen DQB exón 2.....                                                                                                                                                                                                                                                            | 159 |
|                 | b) Secuencias para el gen DRB exón 2.....                                                                                                                                                                                                                                                            | 162 |
|                 | c) Secuencias de cDNA para el gen DQB exón 2.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 163 |
| <b>ANEXO 7.</b> | Reconstrucción filogenética de la historia evolutiva de secuencias DQB exón 2 MHC-II de ballena gris y otros cetartiodáctilos. Modelo de sustitución nucleotídica GTR con Distribución Gamma (0.6144). Sobre las ramas se indican los valores de remuestreo (10,000 replicas) que las sustentan..... | 164 |

|                 |                                                                                                                                                                        |     |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>ANEXO 8.</b> | Asignación del sexo, haplotipo, patrón SSCP y<br>alelos DQB por individuo clonado. SI = Laguna<br>San Ignacio, BM = Bahía Magdalena, OL = Laguna<br>Ojo de Liebre..... | 165 |
| <b>ANEXO 9.</b> | Características relevantes de la Demografía e<br>Historia de Vida, Diversidad neutral y Diversidad<br>Adaptativa de algunas especies de mamíferos<br>Marinos.....      | 166 |

## 1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se desarrolló como parte del proyecto: **“La historia de tres especies: Variación genética adaptativa en tres especies de cetáceos con demografía histórica e historias de vida contrastantes”**, y tuvo como objetivo entender como la demografía e historia de vida de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, han moldeado el polimorfismo de los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (*Mhc*), como un enfoque para evaluar la salud genética de esta población de misticetos.

### **Diversidad Genética:**

#### **Reflejo de la capacidad de recuperación de una población**

La diversidad genética es un concepto central en el ámbito de la biología evolutiva y de la biología de la conservación, ya que al estar intrínsecamente ligada a la complejidad del organismo y a la habilidad de las poblaciones y especies de responder a los cambios ambientales, es reflejo de la capacidad de recuperación de un ecosistema (Bazin *et al.* 2006). Es por ello que en el estudio de esta diversidad resulta crucial comprender como han interactuado la selección natural, la deriva génica, la mutación y la migración en la historia de vida de las especies, moldeando las características que han permitido su adaptación local y su permanencia en el ecosistema (Meyers y Bull 2002).

El nivel de variación genética dentro de una especie o población, representa un balance entre las fuerzas evolutivas. La diversidad genética, es generada por las mutaciones, modificada por el efecto de la selección natural (eficacia biológica), la deriva génica (estocasticidad

genética y demográfica) y la migración. El balance entre la selección y la deriva génica depende del tamaño poblacional y de la intensidad de la selección. Cuando ambos factores están actuando, la selección predomina en las poblaciones grandes y la deriva en las poblaciones pequeñas (Frankham *et al.* 2009).

Una alta diversidad genética comúnmente refleja un buen estado de salud genética y, por consiguiente, es un indicador del potencial adaptativo de los individuos a responder a las fluctuaciones ambientales como las que producen el calentamiento global y otros factores que alteran el equilibrio de los ecosistemas (p.e. la sobrepesca) (Meyers y Bull 2002, Baker y Clapham 2004). En contraste, una baja diversidad genética se traduce en una salud genética deprimida que puede alterar la respuesta dinámica de recuperación de los individuos, lo que podría traer como consecuencia una disminución en los niveles de abundancia de las poblaciones (Baker y Clapham 2004).

La importancia de la diversidad genética, se hace más evidente en especies donde las condiciones de su hábitat o distribución, pueden llevar a una división en poblaciones locales genéticamente diferenciadas; la sobrevivencia y evolución de las especies, dependerán de la variabilidad potencial almacenada en los individuos que pueda ser disponible. Más aun, el potencial adaptativo entre distintas poblaciones, estará determinada no solo por la cantidad de diversidad disponible, sino por las combinaciones potenciales de dicha variación (Wright 1945).

Estudios ecológicos en poblaciones marinas, sugieren que muchos de los ecosistemas actuales, están muy lejos de sus estados naturales debido a los cambios provocados por la actividad antropogénica, y a la

alteración y exposición a nuevos factores biológicos incluyendo depredadores no nativos, competidores y patógenos (Hedrick 2004). Detectar y medir el impacto de tales cambios es complicado debido a que la información sobre el pasado de las poblaciones (p.e. abundancia poblacional histórica) es difícil de obtener (Alter *et al.* 2007). El conocimiento de los niveles ancestrales y recientes de abundancia poblacional es sumamente útil en el estudio de la historia evolutiva de las poblaciones, particularmente en aquellas poblaciones que fueron intensamente cazadas (p.e. Jackson *et al.* 2008). Los datos genéticos proveen un medio para examinar las fluctuaciones históricas de la abundancia en respuesta a procesos que alteran el tamaño efectivo poblacional (p.e. Rooney *et al.* 2001, Jackson *et al.* 2008).

Aunque la relación entre la diversidad genética y el tamaño poblacional se ve alterada por la subdivisión poblacional (p.e. estructura genética), por la varianza en el número efectivo de reproductores (p.e. debido a la captura desmedida de la población), por los niveles de endogamia, por la selección natural (p.e. presión patogénica), por el ciclo de vida, y por los sistemas de apareamiento (ver Bazin *et al.* 2006, Alter *et al.* 2007), bajo la teoría de evolución neutral, la diversidad genética neutral se incrementa, mantiene o disminuye, solo en respuesta a procesos estocásticos, y no por su valor adaptativo, por lo que se pueden explorar las tendencias poblacionales a través del tiempo ecológico profundo; además, la variación genética incrementa con el tamaño poblacional (Marayuma y Kimura 1980, Roman y Palumbi 2003). Así, estimaciones del tamaño efectivo histórico de una población basadas en datos de diversidad genética neutral, ofrecen una alternativa para conocer los niveles de abundancia previos a la explotación de determinada especie, lo que a su vez permite evaluar el estado actual de

las poblaciones, y establecer con bases sólidas, las estrategias de manejo y conservación, así como de las consideraciones para la reactivación de su explotación comercial (Baker y Clapham 2004, Jackson *et al.* 2008).

Pese a que algunos autores no coinciden con la idea de que existe relación entre la diversidad a nivel del ADN mitocondrial (ADNmit) y el tamaño poblacional (p.e. Bazin *et al.* 2006), o de que la diversidad del ADNmit es un pobre indicador del tamaño poblacional actual y de salud (p.e. Nabholz *et al.* 2008), diversos estudios (p.e. Roman y Palumbi 2003, Baker y Clapham 2004, Mulligan *et al.* 2006, Alter *et al.* 2007, Jackson *et al.* 2008), han demostrado que la diversidad genética neutral, es sumamente útil para hacer inferencias sobre el pasado de las poblacionales naturales, y por consiguiente sobre el estado actual de salud genética. En particular, Mulligan *et al.* (2006), encontraron evidencia de que especies con poblaciones pequeñas de algunos mamíferos, exhiben correlación positiva entre la variación a nivel del ADNmit y alozimas, sugiriendo que la diversidad mitocondrial si se correlaciona con el tamaño poblacional en estas especies de vertebrados. Aunado a lo anterior, y contrario al estudio realizado por Bazin *et al.* (2006) a nivel de los metazoarios, el análisis detallado de la diversidad genética entre una gran muestra de especies de mamíferos (ver Nabholz *et al.* 2008), reveló que el ADNmit se ajusta al modelo de neutralidad, donde solo la deriva génica es la principal fuerza determinante de la diversidad genética de las especies de este grupo, promoviendo así, el uso del ADNmit como marcador demográfico.

Sin embargo, por otra parte, los procesos adaptativos, y el potencial de respuesta de los individuos ante las fluctuaciones

ambientales dentro y entre las poblaciones, solo puede ser reflejada mediante estudios de diversidad genética no neutral, que comprende genes codificantes (Sommer 2005). La pérdida de variación genética no neutral puede provocar una reducción a corto plazo de los componentes de la adecuación (p.e. la capacidad de supervivencia, ventajas reproductivas, tasas de crecimiento y la habilidad de adaptarse a los cambios ambientales), factores importantes para la biología de la conservación (Sommer 2005, Piertney y Oliver 2006). Así, el estudio de los patrones de variación adaptiva, es crucial para la sobrevivencia de especies en peligro. Si no hay variación adaptativa en una población, ante la presencia de nuevos cambios ambientales como nuevas enfermedades o la introducción de especies, no habrá potencial de respuesta adaptativa (Hedrick 2004).

La población de ballena gris (*Eschrichtius robustus*) del Pacífico Nororiental estuvo sujeta a una cacería intensa que la llevo, de acuerdo con varios autores, al borde de la extinción durante el siglo pasado (Reeves y Mitchell 2006). De acuerdo con diversos estudios demográficos, sustentados mediante el análisis detallado de los registros de captura de esta especie, los niveles de abundancia previos a la captura comercial se han recuperado y la población se encuentra actualmente a su máxima capacidad de carga (Rugh *et al.* 2005, Reeves y Mitchell 2006, IWC 2008). No obstante, los modelos poblacionales dinámicos utilizados por la Comisión Ballenera Internacional (IWC, International Whaling Commission), requieren de datos de las capturas comerciales, así como de estimaciones de la tasa intrínseca del crecimiento poblacional y de la abundancia actual; aspectos para los que existe una considerable incertidumbre (ver Butterworth *et al.* 2002).

De forma alterna, algunos parámetros genéticos poblacionales pueden ser utilizados para obtener estimaciones independientes de la abundancia histórica (Baker y Clapham 2004).

Aunque los niveles de diversidad genética en la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, se consideran relativamente altos (p.e. Steeves *et al.* 2001, Alter *et al.* 2009), y son congruentes con la idea de una población genéticamente saludable, estimaciones recientes que están basadas en modelos genético-poblacionales proporcionan un escenario diametralmente opuesto al de los modelos basados en los datos de captura, el cual sugiere que los niveles de abundancia actual de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental representan menos del 50% del tamaño original de esta población (Atler *et al.* 2007).

Bajo este panorama es evidente, que después de aproximadamente 70 años desde que la especie fue protegida por el “Acuerdo Internacional para la Regulación para la Caza de Ballenas” y posteriormente por la “Comisión Ballenera Internacional”, no existe una estimación confiable de los niveles de abundancia previos a la explotación que permita evaluar los niveles de recuperación de esta y otras especies de grandes cetáceos (Enriquez-Paredes 2005).

Por otro lado, pese a la controversia sobre el nivel de recuperación de la abundancia de esta especie, actualmente la población del Pacífico Nororiental enfrenta otros factores que podrían impactar negativamente a los individuos de la población, afectando el potencial de respuesta ante todos los impactos sobre su hábitat. El estudio de la diversidad adaptativa es importante para establecer no solo el estado actual de salud genética de las poblaciones naturales, sino su potencial

adaptativo ante los cambios ambientales (Hedrick 2004). Para ballena gris, este último aspecto no ha sido explorado, por lo que no se tiene conocimiento sobre su capacidad adaptativa.

Dentro de los misticetos, la ballena gris es la especie de hábitos más costeros, y por consiguiente con mayores interacciones con la actividad humana. Durante su ruta migratoria por la costa Norte Americana, la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, pasa por áreas en desarrollo o exploración de aceite y gas, por líneas de embarque y tráfico de navios, pesquerías comerciales, pruebas militares, ciudades cercanas a la costa, y por zonas turísticas de observación de ballenas e investigación científica; los niveles de ruido producido por cada una de estas actividades, se consideran como la principal fuente de disturbio de esta población (Moore y Clarke 2002). Todos estos factores hacen que la población de ballena gris del Pacífico Nororiental se considere actualmente bajo cierto nivel de riesgo, ya que la mortalidad incidental en las pesquerías comerciales o por los choques con las líneas de embarque o con navios (ver Moore y Clarke 2002) podrían estar afectando significativamente los niveles de abundancia de la especie.

En el presente estudio, se contrastan los niveles de diversidad genética y la reconstrucción filogenética de dos marcadores genéticos en la población de ballena gris del Pacífico Nororiental; uno de naturaleza neutral (la región control del ADNmit) y uno no neutral (el gen DQB exón 2 del *Mhc-II*). Lo anterior con el objeto de obtener información adicional que permita evaluar los niveles de recuperación y el estado actual de salud genética de esta población.

## **2. ANTECEDENTES**

### **Marcadores Moleculares**

#### **ADN mitocondrial**

Los marcadores moleculares neutrales, como el ADNmit, han sido usados para estimar la cantidad de variación genética presente en los individuos y comprender la dinámica poblacional de diversas especies de vertebrados silvestres (Awise *et al.* 2002, LeDuc *et al.* 2002, Jackson *et al.* 2008). Ya que la variación genética neutral está relacionada con la demografía histórica de una población, la diversidad genética estimada a partir del polimorfismo del ADNmit, aporta información que permite estimar el tamaño del stock previo al periodo de caza (Rooney *et al.* 2001, Roman y Palumbi 2003).

Diversos estudios han utilizado valores de diversidad genética para estimar las abundancias de poblaciones de ballenas que fueron intensamente cazadas (p.e. *Balaena mysticetus*, Rooney *et al.* 2001; *Megaptera novaeangliae*, *Balaenoptera physalus*, *Balaenoptera acutorostrata*, Roman y Palumbi 2003; *Balaenoptera musculus*, Enríquez-Paredes 2005; *Eschrichtius robustus*, Alter *et al.* 2007, 2009; *Eubalaena australis*, Jackson *et al.* 2008). Sin embargo, la mayoría de estas estimaciones sobrepasan por mucho a aquellas basadas en datos obtenidos de las bitácoras de captura. Por ejemplo, para la ballena gris, Alter *et al.* (2007) calcularon un promedio de 96,400 individuos para la población del Pacífico Nororiental, valor 5 veces mayor al obtenido por el censo más actual, entre 18,000 y 29,000 individuos (Rugh *et al.* 2005).

## **Complejo Principal de Histocompatibilidad**

El ADNmit y en particular la región control han sido ampliamente utilizados en estudios de diversidad genética para inferir el tamaño efectivo poblacional, la dinámica de una población incluyendo divergencia, migración, crecimiento/declive de las subpoblaciones y el cuello de botella poblacional; sin embargo, son secuencias neutrales por lo que no están sujetas a selección y no pueden dar información en cuanto al potencial adaptativo de los individuos a su ambiente o a un posible cambio en éste, asunto relevante para establecer estrategias de conservación y manejo sustentable (Meyers y Bull 2002).

En contraste, el complejo principal de histocompatibilidad (*Mhc*, Major Histocompatibility Complex), es un conjunto de genes codificantes altamente polimórficos sujetos a selección. La función de estos genes, es iniciar la respuesta inmune, al unir a las proteínas MHC péptidos de patógenos y presentarlos a los linfocitos T. Las variantes del complejo MHC, influyen en muchos aspectos biológicos importantes, incluyendo reconocimiento inmune, susceptibilidad a enfermedades infecciosas, selección de pareja, entre otros. Estas diversas funciones y características, colocan a los genes *Mhc* entre los mejores candidatos para el estudio de mecanismos de adaptación molecular en vertebrados (Sommer 2005); además, datos de un gran número de trabajos sugieren que este sistema es el mejor para el estudio de cómo la selección natural interactúa con otras fuerzas evolutivas como la migración y la deriva génica para moldear la adaptación local (p.e. Bernatchez y Landry 2003).

La mayoría de los mamíferos, exhiben un alto grado de variación genética a nivel de *Mhc clase I* y *II*, el cual supone ser una adaptación resultado de un gran número de patógenos a los que están expuestas las poblaciones naturales (p.e. Hedrick 2003, Xu *et al.* 2007). La variabilidad de genes *Mhc* es un indicador de la resistencia a parásitos y patógenos, variabilidad que resulta en una mayor probabilidad de supervivencia de los individuos; esto es particularmente importante para especies acuáticas, cuyo ambiente químico y microbial esta constantemente afectado por la actividad antropogénica, incrementando así el riesgo de exposición a nuevos patógenos (Hedrick 2003, Xu *et al.* 2007). Se ha sugerido que especies o poblaciones con bajo nivel de diversidad *Mhc*, pueden ser particularmente vulnerables a enfermedades infecciosas (O'Brien y Yuhki 1999).

Los genes *Mhc* son característicos de los vertebrados y constituyen una familia que codifica glicoproteínas que presentan péptidos propios y extraños (p.e. patogénicos) a las células T, para iniciar la respuesta inmune (Brown *et al.* 1993, Stern *et al.* 1994, Edwards *et al.* 2000). Estudios realizados en humanos, primates y otras especies terrestres, indican que la característica principal del sistema *Mhc* es su alto polimorfismo nucleotídico y polipeptídico (p.e. Brown *et al.* 1993, Stern *et al.* 1994, Edwards *et al.* 2000), el cual es mantenido por la selección balanceadora (p.e. Gu y Nei 1999, Bernatchez y Landry 2003, Hedrick 2003). Existen tres evidencias, que soportan la hipótesis de la acción de la selección sobre estos genes (p.e. Gu y Nei 1999, Bernatchez y Landry 2003, Hedrick 2003):

a) La distribución de las frecuencias alélicas no corresponde a lo esperado bajo el esquema de evolución neutral, favoreciendo una mayor frecuencia de heterocigotos que homocigotos.

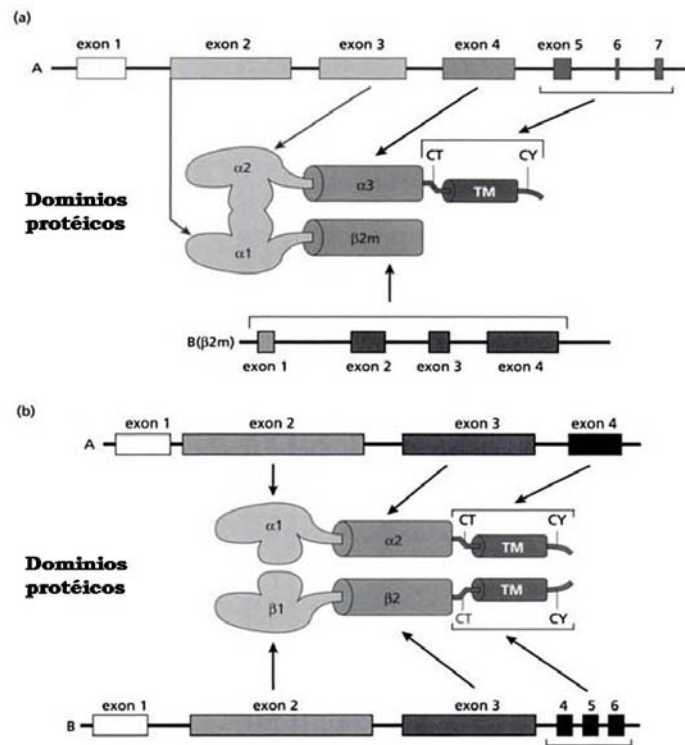
b) Una tasa de sustitución no sinónima ( $d_N$ ) mayor a la sinónima ( $d_S$ ) en los codones que codifican para la región de unión del péptido (PBR, Peptide Binding Region).

c) Algunos alelos permanecen presentes a lo largo de períodos de tiempo que incluso sobrepasan eventos de especiación (polimorfismo trans-específico).

El *Mhc*, representa un grupo de genes que incluye los *loci* más polimórficos que se conocen en vertebrados, incluyendo al hombre (Hedrick 2003). En humanos, los genes más conocidos, y probablemente los más importantes, son las clases *Mhc-I* y *Mhc-II*, que fueron inicialmente descubiertos por su importancia en el transplante de órganos, y su implicación en enfermedades autoinmunes (Hedrick 2003); estos genes codifican proteínas muy variables en la PBR, las cuales fijan péptidos propios y extraños, y los presentan a las células T, que a su vez generan la respuesta inmune contra los mismos (p.e. Brown *et al.* 1993, Edwards *et al.* 2000).

Las proteínas *Mhc-I* están presentes en todas las células y están compuestas por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ 2-microglobulina. El gen que codifica la cadena  $\alpha$ , comprende siete u ocho exones, de los cuales, solo el 2 y 3 codifican la mayor parte de la variación funcional de los dominios proteicos  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 que corresponden a la PBR (Figura 1a, Edwards *et al.* 2000). En contraste, solo las células especializadas en

presentar antígenos, expresan proteínas codificadas en genes *Mhc*-II, los que comprenden seis exones, siendo el exón 2 el que codifica gran parte de la variación funcional de la PBR (dominios  $\alpha$ -1 ó  $\beta$ -1, Figura 1b) (Edwards *et al.* 2000).



**Figura 1. Mapa genético de los genes *Mhc* clase I (a) y clase II (b), exones y dominios proteicos (Modificado de Edwards *et al.* 2000).**

Considerando lo anterior, se han propuesto varios modelos evolutivos para explicar el efecto de la selección balanceadora en el mantenimiento de la variación genética en el MHC (ver Hedrick 2003):

- a) La sobredominancia, cuando en una población resulta ventajoso ser heterocigoto, pues confiere al individuo la capacidad de

presentar mayor variedad de antígenos a las células T y generar respuestas inmunes contra una mayor diversidad de patógenos, aumentando así la adecuación de los individuos (ver Klein *et al.* 1993).

- b) Selección dependiente de la frecuencia, cuando ciertos alelos en baja frecuencia otorgan mayor protección que los alelos en alta frecuencia (ver Klein *et al.* 1993).
- c) La presión patogénica diversificadora, que favorece la diversidad de alelos como consecuencia de la presión selectiva de diversos patógenos (Klein *et al.* 1993).
- d) La selección de parejas reproductivas con alelos *Mhc* distintos (Penn y Potts 1999).
- e) Interacciones materno-fetales, que favorecen el desarrollo de fetos con alelos *Mhc* distintos a los de la madre (Hedrick 1994).

Numerosos estudios respecto al polimorfismo *Mhc*, resaltan la ventaja adaptativa que aporta la variación del *Mhc*, y la importancia de ciertos alelos para generar respuestas inmunes eficientes (ver Brown *et al.* 1993, Klein *et al.* 1993, Edwards *et al.* 2000). En concordancia, estudios realizados en poblaciones reducidas de especies de mamíferos indican que la escasa variación en el *Mhc* determina una gran susceptibilidad a enfermedades infecciosas, y se relaciona a un mayor riesgo de extinción (ver Hedrick 2003, Sommer 2005). Por lo anterior, el estudio del polimorfismo y patrones evolutivos de los genes *Mhc* de

poblaciones silvestres y en cautiverio, se considera importante para inferir los niveles de variación genética adaptativa, y analizar la susceptibilidad a enfermedades y viabilidad de diversas especies (Sommer 2005). Estos estudios indican que el *Mhc* es hoy por hoy el sistema más idóneo para estudiar como la selección natural interactúa con fuerzas evolutivas como la deriva génica, al moldear la adaptación de poblaciones (Bernatchez y Landry 2003).

Comprender la variación del *Mhc* en mamíferos marinos cobra mayor importancia, en particular en poblaciones que fueron drásticamente reducidas, para desarrollar un plan de manejo efectivo para la conservación, y también para la retención de la diversidad genética adecuada para la salud futura de las poblaciones (Hayashi *et al.* 2003; Hedrick 2003).

Los primeros estudios enfocados a conocer la variación de los genes *Mhc* en mamíferos marinos evaluaron la variación *Mhc*-I y II con sondas humanas heterólogas y Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP's). Estos encontraron poca variación en la ballena de Sei (*Balaenoptera borealis*) y ballena de aleta (*B. physalus*), indicando que ésta podría ser resultado de una presión patogénica relativamente débil, debida a la menor probabilidad de contagio en el medio marino (Trowsdale *et al.* 1989, Slade 1992). Estudios posteriores de secuenciación automática, revelaron una variabilidad moderada del gen *DQB-1* en belugas (*Delphinapterus leucas*) y narvales (*Monodon monoceros*) (Murray *et al.* 1995), y en balaenoptéridos (*B. bonaerensis*, Hayashi *et al.* 2003; *B. physalus*, Nigenda-Morales *et al.* 2008).

Así mismo, en poblaciones reducidas, endémicas y en peligro de extinción (p.e. la vaquita *Phocena sinus*; Munguía-Vega *et al.* 2007), se observó variabilidad nula en la vaquita, pero con evidencia de selección donde las tasas de sustitución no sinónimas superan a las sinónimas, lo que resulta en variabilidad adaptativa. Por el contrario, se ha observado que otras poblaciones consideradas en peligro de extinción, o que fueron severamente reducidas e impactadas por el hombre, presentan altos niveles de diversidad genética *Mhc*; tal es el caso del extinto delfín de río (*Lipotes vexillifer*; Yang *et al.* 2005), o el elefante marino del sur (*Mirounga leonina*; Hoelzel *et al.* 1999), cuya población fue severamente reducida, pero que actualmente se ha recuperado en número, y tiene alta diversidad *Mhc* comparable a la observada en poblaciones humanas.

Así, se coincide en señalar que el polimorfismo del *Mhc* es fuertemente determinado por selección, aunque es más común detectar que la misma ha operado en algún punto a lo largo de la historia evolutiva, más que en las generaciones recientes (Garrigan y Hedrick, 2003).

Por otro lado, respecto al gen DQB exón 2 *Mhc*-II, recientemente se documentó la presencia de más de dos alelos por individuo en varias especies de cetáceos (p.e. Hayashi *et al.* 2003, Baker *et al.* 2005, Yang *et al.* 2005, Xu *et al.* 2007), evidenciando la presencia de un *locus* duplicado. Este patrón de evolución por duplicación de genes, ha sido explicado como una estrategia adaptativa en la que se favorece la aparición de nuevas variantes alélicas, incrementando con ello la probabilidad de supervivencia de los individuos (Zhang 2003). Por ejemplo, la población de la marsopa sin aletas (*Neophocaena*

*phocaenoides*; Xu *et al.* 2007), considerada en peligro de extinción por ser una población pequeña y en declive poblacional, presenta bajos niveles de diversidad neutral (p.e región control mitocondrial y microsatelites), pero presenta eventos de duplicación con altos niveles de diversidad alélica a nivel del *Mhc*.

En particular, la población de ballena gris del Pacífico Nororiental fue la primera población de mamífero removido de la lista ESA (Endangered Species Act) y se ha considerado como un ejemplo de éxito en el manejo y la recuperación de especies (ver Keller y Gerber 2004). De acuerdo con diversos autores, esta población posee actualmente niveles de abundancia poblacional que se encuentran en su máxima capacidad de carga (Rugh *et al.* 2005, Reeves y Mitchell 2006, IWC 2008), presenta altos niveles de diversidad genética neutral (Steeves *et al.* 2001, LeDuc *et al.* 2002, Goertliz *et al.* 2003, Alter *et al.* 2009) y algunos resultados preliminares indican variación histocompatible en clase I con eventos de duplicación (Flores-Ramírez *et al.* 2000, 2004).

Dada la controversia e incertidumbre que existe sobre el estado actual de recuperación de la ballena gris debido a las diferencias entre las estimaciones de abundancia obtenidas a partir de los registros en bitácoras (ver Rugh *et al.* 2005, IWC 2008), y modelos genéticos (ver Alter *et al.* 2007), resulta relevante obtener una estimación confiable que permita conciliar las estimaciones de abundancia.

Por su parte, la IWC ha hecho varias recomendaciones con respecto al análisis de los datos genéticos en la inferencia del tamaño histórico de las poblaciones (ver Alter *et al.* 2007). Una de ellas está

relacionada con el uso de: a) utilizar múltiples *loci* nucleares no ligados, b) confirmar la tasa de sustitución por *locus*, c) estimar la varianza total en las estimaciones de abundancias, d) considerar la naturaleza temporal de las estimaciones poblacionales, y e) analizar el efecto de los individuos no incluidos en la muestra. Aunque todos los aspectos mencionados, de manera conjunta pueden ayudar a obtener niveles de abundancia más confiables, en estas recomendaciones no se incluye información sobre genes adaptativos, lo cual es relevante para hacer inferencias sobre el estado actual, la conservación y el manejo de una población (ver Hayashi *et al.* 2003, Hedrick 2003, Sommer 2005).

Bajo el Teorema Fundamental de la Selección Natural, “La tasa de incremento en la adecuación de cualquier organismo atribuible a la selección natural actuando sobre los cambios de las frecuencias génicas, es exactamente igual a la varianza génica de la adecuación” (Edwards 2000), resulta interesante conocer como los cambios demográficos y las presiones selectivas asociadas a los aspectos de historia de vida de la ballena gris, han interactuado para moldear la varianza adaptativa de la especie a nivel de su sistema inmune.

Por lo anterior, en este trabajo se propone analizar la diversidad génica neutral (ADNmit) para reconstruir la historia demográfica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, y complementar esta información para evaluar como la demografía y características de su historia de vida, han moldeado su polimorfismo adaptativo a nivel del *Mhc*. Así, en conjunto los marcadores neutrales y no neutrales permitirán evaluar los niveles de recuperación y de salud genética, aportando las bases para adecuar las estrategias de manejo y conservación de esta especie.

### 3. HIPÓTESIS

Dadas las características únicas de la historia de vida de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, como cuidado parental extenso, edad de madurez tardía, larga migración estacional, distribución costera, hábitos alimenticios (por dragado de fondo marino, y succión de alimento principalmente de anfipodos bénticos), comportamiento gregario, y sistema de apareamiento promiscuo (Rice *et al.* 1984), permite suponer que la especie, se encuentra bajo mayores presiones ambientales que el resto de las poblaciones de misticetos, lo cual espera verse reflejado en la variabilidad del *Mhc*.

Por otro lado, la interacción entre la demografía de la ballena gris, y los factores de su historia de vida, permite suponer dos escenarios alternativos respecto a la diversidad genética, tanto a nivel de la región control del ADNmit, como del gen DQB exón 2 *Mhc*-II de esta población:

1. Que la reducción de la población al  $\approx 12\%$  de su tamaño original (escenario en donde la población se redujo hasta  $\approx 2,500$  individuos, Reeves y Mitchell 2006; y recuperación a  $\approx 20,000$  individuos, Rugh *et al.* 2005, IWC 2008), no fue suficiente para erosionar la diversidad genética de la población, y borrar el efecto diversificador de fuerzas selectivas asociadas a una historia de vida compleja.
2. Que la reducción de la población al  $\approx 3\%$  de su tamaño original (población original de 96,400 individuos, Alter *et al.* 2007; se redujo a 2,500 individuos, Reeves y Mitchell 2006), erosionó la diversidad genética de la población, y borró el efecto diversificador de fuerzas selectivas asociadas a una historia de vida compleja.

## **4. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Analizar la diversidad genética neutral a nivel de la Región control del ADNmit, para reconstruir la demografía histórica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, y estimar el nivel de recuperación de esta especie, e integrar esta información a la historia de vida y nivel de variación histocompatible (DQB exón 2 *Mhc-II*), para evaluar el estado actual de salud genética.

### **Objetivos Particulares**

1. Estimar los niveles de diversidad genética (haplotípica y nucleotídica), y la relaciones filogenéticas intraespecíficas con base en las variantes haplotípicas de la región control del ADN mitocondrial.
2. Estimar el tamaño poblacional histórico con base en los niveles de polimorfismo de la región control mitocondrial.
3. Reconstruir, a través de modelos logísticos de crecimiento poblacional, un escenario plausible de la historia demográfica de la población con base en la estimación del tamaño histórico y las estimaciones de abundancia actual.
4. Comparar la demografía histórica de la población obtenida a partir de estimaciones de modelos genéticos y modelos no genéticos (SOLVER y ADMB).

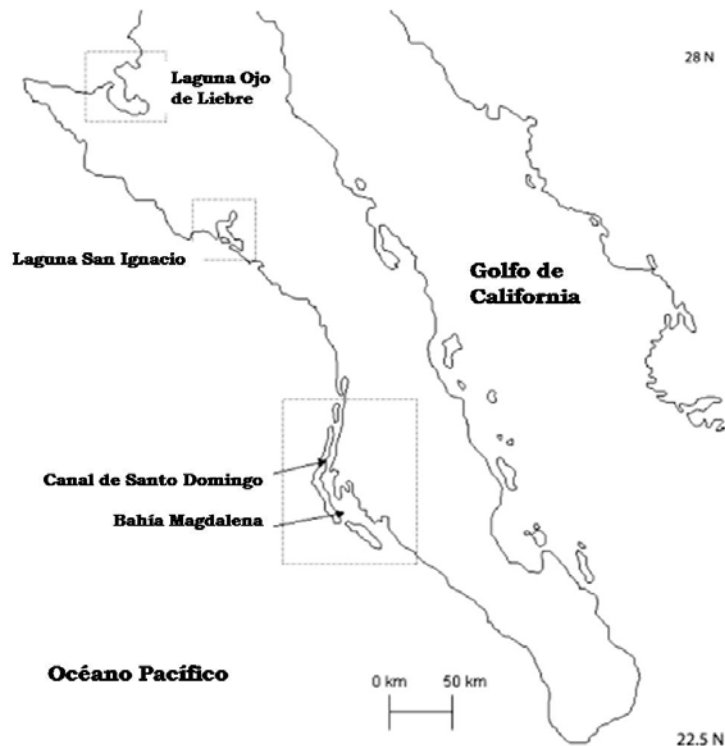
5. Aislar y caracterizar el *locus* DQB exón 2 *Mhc-II* de ballena gris para confirmar su naturaleza y funcionalidad histocompatible en esta especie.
6. Evaluar la diversidad genética (alélica y nucleotídica), así como las relaciones filogenéticas intraespecíficas e interespecíficas del *locus* DQB exón 2 del *Mhc-II*, para identificar si dicha diversidad ha estado sujeta o no a procesos selectivos.
7. Evaluar la posible segregación de alelos DQB asociados a los distintos linajes mitocondriales y lagunas de reproducción, para verificar si existe o no el mismo nivel de variación histocompatible a nivel poblacional.
8. Contrastar los niveles de diversidad genética del *locus* DQB exón 2 *Mhc-II* (Objetivos 5 a 7) en el contexto de la demografía histórica de la población y los parámetros de su historia de vida, para evaluar el estado actual de salud genética de la población de ballena gris.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Métodos generales

#### 5.1.1 Obtención de muestras

Se obtuvieron biopsias de tejido epidérmico de 93 ballenas grises en la costa occidental de la Península de Baja California (Figura 2; 30 biopsias de Laguna San Ignacio, 29 de Laguna Ojo de Liebre y 34 de Bahía Magdalena), bajo el permiso avalado por las autoridades Mexicanas (SEMARNAT Permiso /SGPA/DGVS/00877) para colectar muestras de mamíferos marinos en el Pacífico Mexicano.



**Figura 2. Principales Lagunas Costeras de reproducción y localidades de muestreo de la Población de Ballena gris del Pacífico Nororiental: Laguna Ojo de Liebre (LOL), Laguna San Ignacio (LSI), y Bahía Magdalena (BM) (Modificado de Alter *et al.* 2009).**

### 5.1.2 Extracción del ADN total

El ADN total (ADNt) de cada individuo, se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Aljanabi y Martínez (1997).

La calidad y concentración del ADNt fueron evaluadas por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en los que se incorporaron 0.05 ug/mL de bromuro de etidio (EtBr) y mediante la comparación con un marcador estándar de peso molecular (Invitrogen™ 100pb DNA Ladder).

El ADNt de cada individuo se utilizó para amplificar por PCR dos marcadores moleculares: la región control del ADN mitocondrial y el exón 2 del gen DQB del *Mhc-II*. Adicionalmente, se identificó molecularmente el sexo en cada muestra amplificando el sistema ZFX-ZFY de los cromosomas sexuales.

Todas las amplificaciones, incluyendo controles negativos y positivos, se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf. Para cada grupo de muestras procesadas se incluyeron controles negativos y positivos como control de calidad, con la finalidad de evaluar la posible contaminación de las muestras y/o reactivos. Las reacciones de PCR, se llevaron a cabo de la misma manera, pero para los controles negativos, se omitió el ADN, y para los controles positivos, se agregó el ADN de un individuo conocido.

### 5.1.3 Identificación Molecular del Sexo

#### Amplificación

Una vez obtenido el ADNt, se realizó la identificación molecular del sexo de cada uno de los individuos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); para ello, se utilizó el método y los cebadores propuestos por Bérubé y Palsbøll (1996): ZFX0582 F (5'-ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA-3'), ZFY0752 R (5'-ATTACATGTCGTTTCAAATCA-3') y ZFYX0785 R (5'-CACTTATGGGGGTAGTCCTTT-3'). Todas las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen final de 27 uL de solución amortiguadora B (22 mM Tris-HCl pH 8.4, 55 mM de Cloruro de Potasio (KCl), 0.22 mM dNTPs, 3 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>)), 1.1 U de *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen™), y 0.7 µM de cada cebador; se utilizó el siguiente perfil de temperaturas: periodo inicial de 4min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificación (1min a 94°C, 1min a 50°C, 1.30min a 70°C por cada ciclo), y un periodo final de extensión de 5min a 70°C.

Para cada grupo de muestras procesadas se incluyeron controles negativos, y positivos con el ADN de un macho o una hembra conocido.

Los productos de las amplificaciones, fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa/EtBr al 2%.

## **5.2 Métodos dirigidos a objetivos específicos**

### **5.2.1 Análisis de la Diversidad de la Región Control del ADNmit**

#### **Amplificación**

Para analizar la diversidad genética neutral, se amplificó el dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial (ADNmit), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la amplificación, se utilizaron 0.3mM de cada uno de los cebadores diseñados por el grupo de Ecología Molecular de Mamíferos Marinos del Southwest Fisheries Science Center (SWFSC): Tro (5'-CCTCCCTAAGACTCAAGG-3') y Dxx (5'-CCTGAAGTAAGAAACCAGATG-3'); una solución amortiguadora B [22mM Tris-HCl pH 8.4, 55mM de cloruro de potasio (KCl), 220uM dNTP's, 3.0mM de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>)], 1.1 U de *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen <sup>TM</sup>), y entre 20 – 30 ng/ul de ADNt, a un volumen final de 27ul.

La PCR se realizó en un termociclador Eppendorf, utilizando el siguiente perfil: periodo inicial de desnaturalización de 4min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificación; cada ciclo consistió de 1min de desnaturalización a 94°C, 1min de reincorporación a 51°C y 1min de extensión de la cadena a 70°C. Se añadió un periodo final de extensión de 5min a 70°C. El éxito de las amplificaciones se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa/EtBr. Para observar si los fragmentos amplificados tenían el tamaño esperado, se usó un marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen<sup>TM</sup> 100pb DNA Ladder). Para el control

de calidad, se incluyeron los controles negativos en cada grupo de muestras procesadas.

## **Secuenciación**

Una vez obtenidos los productos de PCR para la región control, previo a la reacción de secuenciación, se purificaron empleando el PureLink™ PCR purification Kit (Invitrogen), modificando el volumen de solución amortiguadora para eluir el ADN de la columna en función de la cantidad del producto amplificado. La concentración de productos de PCR purificados fue evaluada a través de electroforesis en agarosa/EtBr.

Las reacciones de secuenciación se prepararon en un volumen final de 12 uL. Se agregó 6.4 pmoles de alguno de los cebadores (Tro o Dxx) con marcaje fluorescente BigDye® (Applied Biosystems), que permite el uso de sistemas de detección automatizados con tecnología láser y reduce el tiempo en la obtención de resultados, de 1 a 3 uL de ADN (dependiendo de la concentración de producto purificado), y H<sub>2</sub>O hasta ajustar al volumen final. Para cada muestra se secuenció la cadena en ambas direcciones en un secuenciador automático ABI Prism® 3100 (Automated Capillary DNA Sequencer) siguiendo las indicaciones del proveedor, empleando el servicio de secuenciación de SeqXcel Inc. (San Diego, CA. <http://www.seqxcel.com/>).

Una vez analizadas las secuencias e identificado a los haplotipos, se repitió la reacción de PCR y la secuenciación, para los haplotipos identificados como nuevos en la población, con la finalidad de confirmar su presencia.

## **Edición y alineación de Secuencias**

Todas las secuencias obtenidas para la región control, fueron editadas utilizando el programa ChromasPro ver 1.49 beta, y alineadas manualmente con el programa UltraEdit Professional ver 14.20.1. Una vez obtenidas las secuencias individuales se identificaron los sitios variables entre ellas por medio del programa MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) con la finalidad de asignar el haplotipo mitocondrial de cada individuo.

Con fines comparativos, se asignó un código a cada uno de los haplotipos de ballena gris obtenidos, y se contrastaron con aquellos reportados en el banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) correspondientes a estudios previos para la población del Pacífico Nororiental (Steeves *et al.* 2001, LeDuc *et al.* 2002 y Goertliz *et al.* 2003). Aquellos haplotipos que previamente no habían sido reportados, fueron resecuenciados para asegurar que no fuera error durante la edición y alineación de secuencias.

### **5.2.1.1 Diversidad genética y estructura genética**

Una vez identificados los haplotipos para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, se obtuvieron los índices de diversidad nucleotídica ( $\pi_n$ ; Tajima 1983), y haplotídica ( $H$ ; Nei 1987), utilizando el programa Arlequin ver 3.1 (Schneider *et al.* 2000).

Aunque se ha observado que no existe una clara subdivisión genética entre lagunas para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental (p.e Steeves *et al.* 2001; Goerlitz *et al.* 2003; Del Toro-Muñoz 2006, Alter *et al.* 2009), de manera complementaria y para confirmar la ausencia de subdivisión en la población, se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) entre las tres lagunas. Para ello, mediante el programa Arlequin se estimaron los índices de fijación  $\Phi_{ST}$  y  $F_{ST}$ , donde el primero representa la estructura genética considerando tanto la frecuencia haplotípica como la información del número de mutaciones entre los haplotipos, mientras que su análogo,  $F_{ST}$ , considera únicamente la frecuencia de los haplotipos (Schneider *et al.* 2000).

#### **5.2.1.2 Relaciones Filogenéticas**

Se realizó la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre todos los haplotipos mitocondriales (incluyendo aquellos que no se encontraron en este trabajo), mediante tres métodos: Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verosimilitud (MV), e inferencia Bayesiana. En cada una de las reconstrucciones se incluyeron dos grupos externos, la ballena azul (*Balaenoptera musculus*; no. acceso al banco de genes X72204, Arnason *et al.* 1993) y ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*; no. acceso AY343929, McEwing 2003).

Para la reconstrucción de los árboles filogenéticos, se empleó el programa Modeltest (Posada y Crandall 1998), para MV y NJ, y MrModeltest (Nylander 2004) para el método bayesiano, para determinar los parámetros del modelo de evolución de mejor ajuste. Con los valores obtenidos por modeltest, se alimentó el programa PAUP 4.0b10

(Swofford 2000) para reconstruir la filogenia de las secuencias, seleccionando el método de MV como criterio de optimización, empleando una búsqueda heurística mediante el algoritmo TBR (Tree Bisection Reconnection). La robustez de los árboles generados se evaluó estadísticamente con base a un análisis de bootstrap (de 10,000 réplicas) contenido en PAUP. Por último, se calculó un árbol consenso a partir de los árboles más verosímiles.

Para el método de NJ, se usó el modelo de mejor ajuste para generar la matriz de distancias para la reconstrucción del árbol filogenético. Empleando el programa MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007), la robustez de la topología se evaluó a partir de 10,000 replicas generadas por el método de remuestreo de bootstrap.

Con el modelo de mejor ajuste obtenido por MrModeltest, se alimentó el programa MrBayes v3.1 (Huelsenbeck y Ronquist 2001; Ronquist y Huelsenbeck 2003) para reconstruir la filogenia a través del modelo evolutivo General de Tiempo Reversible, utilizando el algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Carlo) para obtener la distribución de probabilidades *a posteriori*, a partir de 10,000,000 generaciones, con un periodo de calentamiento (burn-in) de 5,000,000 generaciones. El programa MrModeltest a diferencia de Modeltest, compara 24 modelos de sustitución nucleotídica (Nylander 2004), los cuales son implementados en MrBayes, con la finalidad de disminuir la incertidumbre en los parámetros evolutivos, y así elegir el modelo más simple posible, que se ajuste razonablemente a los datos (Huelsenbeck y Ronquist 2001; Ronquist y Huelsenbeck 2003).

### 5.2.1.3 Historia Demográfica

Debido a que la población de ballena gris estuvo sujeta a una cacería comercial intensa, y en consecuencia sus niveles de abundancia se redujeron a niveles muy bajos, resulta interesante comprender su demografía histórica a partir de datos moleculares, para evaluar posteriormente su relación con el tamaño histórico de la población y los niveles de abundancia actual. Para ello, se realizó un análisis de la distribución de diferencias pareadas entre haplotipos (Mismatch Distribution), el cual permite observar si la población ha permanecido en equilibrio demográfico (al presentar distribuciones multimodales o caóticas), o si paso por una expansión demográfica o cuello de botella (distribuciones unimodales y suaves) (Rogers y Harpending 1992, Hudson y Slatkin 1991, citados en Schneider *et al.* 2000).

Paralelamente, se aplicó la prueba de neutralidad selectiva por medio del estadístico D (Tajima 1993, citado en Schneider *et al.* 2000), y se calculó el índice de irregularidad de Harpending (IH), donde valores altos corresponden a distribuciones multimodales, y valores bajos a distribuciones unimodales o suaves (Rogers y Harpending, citados en Schneider *et al.* 2000).

Adicionalmente se generó la red de mínima separación (MSN) mediante el programa Arlequin ver 3.1. En este análisis, se estima la relación entre los haplotipos a partir de una matriz de distancias cuadradas. Su representación gráfica permite inferir si existe un patrón de distribución espacial entre los haplotipos de una población (Schneider *et al.* 2000).

#### 5.2.1.4 Estimación del tamaño histórico poblacional

Para estimar el tamaño histórico de la población de ballena gris, se utilizó el modelo corregido propuesto por Enríquez-Paredes (2005), en el cual se incorporarán dos parámetros histórico-demográficos derivados de la reconstrucción filogenética (el número de haplotipos y la tasa de mutación intraespecífica/intrapoblacional), para obtener el tamaño efectivo poblacional histórico.

El número de haplotipos, el tamaño de la secuencia, el tiempo de divergencia y el tiempo generacional fueron usados para establecer la relación entre la diversidad genética y el tamaño efectivo poblacional de hembras,  $\theta_{Nh} = 2 N_{eff} \nu$ ; donde  $\theta_{Nh}$  es un índice de diversidad genética a nivel haplotípico,  $N_{eff}$  es el número de hembras reproductivamente activas, y  $\nu$  es la tasa de mutación o substitución a nivel de los haplotipos (ver Enríquez-Paredes 2005).

El cálculo la diversidad genética a nivel haplotípico, se realizó con base en la razón del número de haplotipos y el tamaño de la secuencia analizada (p.e. Enríquez-Paredes 2005, Jackson *et al.* 2008). Por su parte, la tasa de mutación a nivel de los haplotipos mitocondriales, se obtuvo a través de la razón del tiempo de divergencia y el tiempo generacional para esta especie. Se utilizó el tiempo de divergencia calculado a partir de la topología del árbol filogenético linearizado de todos los linajes maternos para todas las especies de misticetos (ver Enríquez-Paredes 2005).

Adicionalmente, se utilizó el programa BEAST v1.4.8 (Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees; Drummond y Rambaut 2007)

para obtener una aproximación coalescente del tiempo al ancestro común mas reciente (TMRCA), y establecer las distribuciones de probabilidad sobre el tiempo de divergencia. BEAST, implementa estadística bayesiana y cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC, por sus siglas en inglés), para generar las distribuciones *a posteriori* de los parámetros evolutivos, dado un grupo de secuencias moleculares; la característica más distinguible de BEAST, es la capacidad de calibrar filogenias y genealogías, incorporando una escala de tiempo a los árboles filogenéticos (Drummond y Rambaut 2007).

Con fines comparativos, se estimó el tamaño histórico de la población de ballena gris a través del modelo tradicional ( $\theta = 2N_e\mu$ ) y del modelo descrito anteriormente ( $\theta_{N_h} = 2 N_{eff} \nu$ ). Para ello se emplearon los parametros poblacionales y los factores de conversión previamente reportados para la especie.

El tiempo generacional utilizado, fue de 18 años, valor medio dentro del intervalo entre 15.5 – 22.3 años, mismo que utilizan Alter *et al.* (2007).

Asimismo, los tres factores de conversión, utilizados por Roman y Palumbi (2003), para obtener los valores de abundancia históricos totales fueron los siguientes:

1. Se convirtió el número efectivo de hembras  $N_{eff}$ , al número total efectivo de la población  $N_e$ , multiplicando por dos; suponiendo una proporción de sexos 1:1.

2. Para convertir  $N_e$ , al número total de adultos en edad reproductiva  $N_T$ , se multiplicó por dos, suponiendo una proporción de  $N_T:N_e$  de 2.0.
3. Por último, para incluir el número de individuos juveniles o inmaduros y obtener el tamaño histórico total, se multiplicó  $N_T$  por una estimación de (no. de adultos + juveniles) / (no. de adultos), derivado de datos y revisiones de captura. Para ballena gris, esta proporción equivale a un valor de 1.5 (Weller *et al.* 2002, citado por Roman y Palumbi 2003).

Para cada uno de los parámetros del modelo (Tiempo de divergencia, tiempo generacional), así como los factores de conversión para obtener el tamaño histórico total de la población (porcentaje de hembras adultas, proporción de sexos, porcentaje de individuos inmaduros), se obtuvieron los intervalos de confianza mediante simulaciones de Monte Carlo utilizando el programa Crystal Ball 11.1.1.3 Fusion Edition (Oracle® BPM).

Para el caso particular del tiempo de divergencia obtenido mediante el programa BEAST, se utilizó el programa TRACER v1.4.1 (Rambaut y Drummond 2007) para analizar los recorridos de los parámetros muestreados y sus distribuciones *a posteriori* por métodos Bayesianos MCMC, obteniendo de esta forma la desviación estándar y los intervalos de confianza de los parámetros.

### **5.2.1.5 Simulación de Tendencias Demográficas:**

#### **Comparación de las estimaciones de abundancia histórica**

Para evaluar que tan plausibles pueden ser las estimaciones de abundancia históricas, se realizó un ejercicio de simulación de crecimiento poblacional a través del modelo logístico generalizado que la IWC utiliza para la reconstrucción histórica de las poblaciones de ballenas que fueron explotadas (IWC 1999, ver Baker y Clapham 2004):

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

Donde  $P_t$  es el tamaño de la población durante el año  $t$ ;  $r_{\max}$  es la tasa intrínseca de crecimiento poblacional;  $K$  es la capacidad de carga, la cual se supone es igual a la abundancia original previa a la explotación;  $z$  es el nivel máximo de rendimiento sostenible (MSYL, por sus siglas en inglés) relativo a  $K$ , es decir, el número máximo de ballenas que pueden ser tomadas sin cambiar el tamaño de la población; y  $C$  es la captura total en número de individuos durante el año  $t$ .

La trayectoria demográfica se calculó para el periodo desde 1600, fecha a partir de la cual se tienen registros de captura por aborígenes (IWC 1993, citado en Butterworth *et al.* 2002), hasta el 2008, que corresponde al último año con registros de captura (IWC 2010).

#### **5.2.1.6 Modelos No Genéticos**

De manera independiente, y para comparar las estimaciones obtenidas a partir de los modelos genéticos, se utilizaron dos métodos estadísticos: la herramienta Solver de Microsoft Office Excel (Winston 2004), y el ADMB (Automatic Differentiation Model Builder; Fournier 2009). Ambos métodos incluyen en su estimación los valores de abundancia observada y sus coeficientes de variación, obtenidos a partir de censos demográficos.

##### **a) Solver**

Se utiliza para resolver y optimizar ecuaciones (de una o más variables) mediante el uso de métodos numéricos (p.e. a través del cálculo de la Máxima Verosimilitud). Solver utiliza el algoritmo de optimización no lineal GRG2 (Generalized Reduced Gradient; Lasdon y Waren 1997) para buscar el valor óptimo de la celda objetivo, la cual corresponde a la fórmula de la función objetivo. En este caso, la celda objetivo corresponde al cálculo de la Máxima Verosimilitud a partir de los coeficientes de variación de cada uno de los censos demográficos para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental. Posteriormente, Solver cambia los valores de un grupo de celdas, denominadas celdas cambiantes, que están relacionadas con la fórmula de la celda objetivo. En estas celdas se encuentran los valores de las variables, que corresponden a la tasa de crecimiento intrínseca  $r_{\max}$ , y a la capacidad de carga  $K$  de la población. Una vez establecidas las celdas, Solver optimiza el valor de la celda objetivo, y establece los valores más probables para las celdas cambiantes ( $r_{\max}$  y  $K$ ). Con los valores

resultantes, se utilizó el modelo logístico de crecimiento poblacional de la IWC para realizar la simulación de las tendencias demográficas.

#### **b) ADMB**

El AD Model Builder, permite hacer inferencias altamente confiables de parámetros poblacionales, mediante modelos estadísticos no lineales. Este programa, ha incrementado su uso y la importancia en el área de las pesquerías, y se ha vuelto una herramienta estándar para desarrollar aproximaciones estadísticas para el manejo de recursos. El ADMB, trabaja con un lenguaje de programación C++, el cual incluye una serie de módulos que describen aspectos particulares del modelo. Estos módulos, requieren los datos (abundancias observadas y coeficientes de variación), los parámetros del modelo ( $r_{\max}$  y  $K$ ), y los criterios de ajuste, para estimar la distribución de probabilidades de los parámetros para modelos estadísticos no lineales. A partir de los datos observados, años de abundancias, valores de abundancias, y sus coeficientes de variación, el ADMB construye vectores, para ajustar los parámetros del modelo no lineal, y así obtener una serie de valores de abundancia, que corresponderían a los valores de abundancia históricos.

### 5.2.2 Análisis de la Diversidad del *locus* DQB exón 2 *Mhc* – II

#### Amplificación

Para analizar la diversidad genética no neutral, se amplificó el *locus* DQB exón 2 del Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II, mediante la reacción de PCR.

Para la reacción de PCR, se utilizaron 0.3mM de cada uno de los cebadores diseñados por Murray *et al.* (1995): DQB2F (5'-CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC-3') y DQB2R (5'-CATGTCTACTTCACCACAGG-3'); una solución amortiguadora A (10mM Tris-HCl pH 8.4, 55 mM de Cloruro de Potasio (KCl), 0.75 ug de BSA, 0.22 mM dNTP's, 2.5 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>)), 1.1 U de *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen™), y entre 80 – 100 ng/ul de ADNt, a un volumen final de 27uL.

La amplificación del gen DQB exón 2, se realizó en un termociclador Eppendorf, utilizando el siguiente perfil: un periodo inicial de desnaturalización de 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificación. Cada ciclo consistió de 1min de desnaturalización a 94°C, 1 min de reincorporación a 51°C y 1 min de extensión de la cadena a 70°C. Se añadió un periodo final de extensión de 5 min a 70°C. El éxito de las amplificaciones fue evaluado mediante electroforesis en geles de agarosa/EtBr. Para observar si los fragmentos amplificados tenían el tamaño esperado, se usó un marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen™ 100pb DNA Ladder).

De la misma forma que para la amplificación de la región control, en cada grupo de muestras procesadas para DQB exón 2, se incluyeron controles negativos, como control de calidad.

### **Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) automatizado**

Para evaluar el número de variantes alélicas para el *locus* DQB2, se realizó el análisis del polimorfismo de la conformación de cadena sencilla (SSCP por Single Stranded Conformational Polymorphism). Este es un método ampliamente utilizado, capaz de detectar la variación de un solo nucleótido en un segmento de ADN. En su forma más simple, bajo condiciones desnaturalizantes (p.e. agente químico o temperatura elevada), el ADN de doble cadena es desnaturalizado en cadenas sencillas para después ser separadas por electroforesis en gel no desnaturalizante de poliacrilamida. Las cadenas sencillas se pliegan sobre sí mismas adquiriendo estructuras moleculares principalmente terciarias, determinadas por su secuencia de nucleótidos. El SSCP, puede detectar las diferencias en secuencias debido a la diferente movilidad electroforética (acorde a su tamaño y forma adquirida) de la cadena sencilla de ADN (Orita *et al.* 1989).

En los últimos años, se ha automatizado esta técnica para obtener resultados rápidos (fragmentos menores a 300pb, pueden ser separados en menos de 30 min), confiables y no ambiguos (debido a la alta sensibilidad a las condiciones de corrida), y detectar de manera sencilla el polimorfismo en un solo nucleótido (SNP, Single Nucleotide Polymorphism; p.e. Bernat *et al.* 2002), o la presencia de individuos

heterocigotos al observar dos picos de diferente tamaño (p.e. Lento *et al.* 2003). Esta modificación consiste, en marcar con fluorescencia los cebadores que amplifican la región de interés, y por medio de un sistema de electroforesis por capilaridad en un secuenciador automático, generar los perfiles de tamaño de los fragmentos que indican la presencia de variantes de la secuencia de ADN analizada (ver Atha *et al.* 1998).

En este trabajo, y para comparar los perfiles de los SSCP's, se emplearon ambos cebadores marcados con fluorescencia, VIC (verde; para la cadena hacia adelante) y 6-FAM (azul; para la cadena complementaria). El SSCP automatizado se realizó en el Microchemical Core Facility Lab SDSU (San Diego State University Microchemical Core Facility Lab., San Diego, CA; [http://www.sci.sdsu.edu/dnacore/sdsu\\_dnacore.html](http://www.sci.sdsu.edu/dnacore/sdsu_dnacore.html)), donde se empleó un secuenciador automático ABI Prism®310 Genetic Analyzer.

Previó a la corrida, se agregó 10 uL de TE 1X (10 mM Tris-HCL pH 7.5, 1mM EDTA) a los productos de PCR, para después ser purificados en columnas Sephadex™. Cada muestra de corrida, contenía 2 uL de producto purificado (10-20 ng/uL), 0.5 uL de NaOH 0.3N, 10.5 uL de formamida (Hi-Di™) y 1 uL del marcador de peso molecular estándar ROX 500 ABI. Después de algunas pruebas de optimización de la corrida electroforética, las condiciones seleccionadas fueron las siguientes: concentración del polímero de SSCP-CAP (POP™ Conformational Analysis Polymer) al 5.75%, a 31°C por 22 min. Cada muestra fue inyectada a 15 kV por 5 sec, y corrida a 15 kV. Para el análisis de los perfiles de SSCP del *locus* DQB2 se utilizó el programa Peak Scanner™ Software v1.0.

## **Clonación de alelos DQB exón 2 *Mhc* – II**

Una vez obtenidos los resultados del SSCP, con base en los perfiles del tamaño de las variantes alélicas, se seleccionaron los productos de PCR del DQB2 de individuos que representaran todas las variantes para ser clonados y secuenciados.

Un primer grupo de productos de PCR correspondiente a diez individuos, fue clonado en el SDSU Microchemical Core Facility Lab, empleando el GeneJet™ PCR Cloning Kit (Fermentas), el vector pJET1/blunt (del kit), y células de *Escherichia coli* químicamente competentes. La transformación se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante (Fermentas).

Un segundo grupo de productos de PCR representando a cinco individuos, fue clonado en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Toxinas en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), utilizando el kit TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen), el vector PCR TOPO 2.1 (del kit), y células de *E. coli* Top 10 electrocompetentes. La transformación de células electrocompetentes, se llevó a cabo en un electroporador para células procariotas mod. Micropulser (BIO-RAD). Se incubaron las células en 1ml de medio SOC a 37°C por 1 hr, y se inocularon en dos cajas petrí por individuo clonado, con LB agar, ampicilina (50ug/ml) y X-gal (300ug/ml), 50 y 100 uL de células.

Una vez obtenidas las colonias, al cabo de 24 hr, se verificó la presencia del alelo DQB exón 2 mediante un PCR de colonia.

Adicionalmente, y con fines comparativos de la diversidad alélica para DQB exón 2 (ver más adelante), se clonaron los productos de PCR obtenidos en un par de muestras de ballena azul (*Balaenoptera musculus*) y un par de muestras de ballena de aleta (*B. physalus*) obtenidas en el Golfo de California por el Laboratorio de Ecología de Mamíferos Marinos del CICIMAR-IPN.

### **PCR de colonia y secuenciación de alelos DQB**

Se tomó cada colonia con un palillo de madera estéril y se sumergió en 15 uL de agua destilada estéril en un tubo de 0.2 mL. Posteriormente, se realizó la amplificación bajo las condiciones de PCR para el gen DQB, tomando de 1 a 2 uL de células resuspendidas en agua. Los productos se visualizaron en geles de agarosa/EtBr, y una vez verificada la presencia del alelo en la clona amplificada, se secuenciaron los productos de PCR.

Los productos fueron secuenciados en ambos sentidos para analizar el polimorfismo del *locus* DQB exón 2 *Mhc-II*. Para las reacciones de secuenciación de alelos DQB de los individuos clonados en el SDSU Microchemical Core Facility Lab, se utilizaron los cebadores para secuenciación del vector pJET1 (Fermentas), y un secuenciador automático ABI Prism®310 Genetic Analyzer. Para los individuos clonados en CICESE, se utilizaron los servicios de SeqXcel Inc. y del University of Arizona Genetics Core (<http://uagc.arl.arizona.edu>).

## **Edición y alineación de Secuencias**

Todas las secuencias correspondientes al *locus* DQB exón 2, fueron editadas utilizando el programa ChromasPro ver 1.49 beta, y alineadas manualmente con el programa UltraEdit Professional ver 14.20.1.

### **5.2.2.1 Diversidad Alélica**

La naturaleza histocompatible de las secuencias de DQB2 aisladas, se verificó con base a un análisis de homología, que consistió en comparar cada una con el resto de las secuencias depositadas en el genbank mediante búsquedas BlastN (secuencia nucleotídica) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>.).

Una vez alineadas las secuencias DQB, se tradujeron a aminoácidos utilizando el programa MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007). Para verificar el patrón de evolución de las secuencias aisladas, se realizaron comparaciones pareadas entre secuencias para calcular los valores promedio de sustituciones no sinónimas ( $d_N$ ) y sinónimas ( $d_S$ ) por sitio (total, dentro y fuera de la PBR), utilizando el programa DnaSP (DNA Sequence Polymorphis) ver 4.90.1 (Rozas *et al.* 2003), el cual estima la proporción de sustituciones por sitio entre cualquier par de secuencias, como  $K_a$  (número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo), y  $K_s$  (número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo) (Nei y Gojoberi 1986), aplicando el factor de corrección de Jukes y Cantor (1969) (ver Rozas *et al.* 2003).

En este trabajo la diversidad alélica de DQB se representó como una proporción del número de alelos con respecto al número de clonas obtenidas para cada individuo analizado. La diversidad alélica obtenida para la población de *E. robustus* se comparó con las de otras especies de cetáceos (p.e. Baker *et al.* 2005, Yang *et al.* 2005), así como con las obtenidas en las muestras de ballena azul y ballena de aleta empleadas en este trabajo.

#### **5.2.2.2 Relaciones Filogenéticas**

Se realizaron dos tipos de análisis filogenéticos para DQB exón 2 (intra-específico e inter-específico), con la finalidad de evaluar si las variantes alélicas de la ballena gris se separan en clados que pudieran representar distintos *loci* amplificados, y para observar si la variación alélica para esta especie, sigue el mismo patrón de evolución trans-específico característico de este grupo de genes *Mhc*, o si dicha variación ha divergido lo suficiente para diferenciarse del resto de los mamíferos.

##### **a) Análisis filogenético intra-específico de alelos DQB de ballena gris**

Una vez alineadas las secuencias correspondientes a los 25 alelos DQB exón 2 de ballena gris, se realizó la reconstrucción filogenética mediante dos métodos: Máxima Verosimilitud (MV) y Neighbor-Joining (NJ).

Para la reconstrucción de los árboles filogenéticos, se empleó el programa Modeltest (Posada y Crandall 1998), para determinar los

parámetros del modelo de evolución de mejor ajuste. Con los valores obtenidos por modeltest, se alimentó el programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2000) para reconstruir la filogenia de las secuencias, seleccionando el método de máxima verosimilitud como criterio de optimización, empleando una búsqueda heurística mediante el algoritmo TBR (Tree Bisection Reconnection). La robustez de los árboles generados se evaluó estadísticamente con base a un análisis de bootstrap (de 10,000 réplicas) contenido en PAUP. Por último, se calculó un árbol consenso a partir de los árboles más verosímiles.

En el método de NJ, se usó el modelo de mejor ajuste para generar la matriz de distancias para la reconstrucción del árbol filogenético. Empleando el programa MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007), la robustez de la topología se evaluó a partir de 10,000 replicas generadas por el método de remuestreo de bootstrap.

#### **b) Análisis filogenético inter-específico de secuencias *Mhc-II* de mamíferos**

Para reconocer los patrones de evolución trans-específica de las secuencias aisladas de DQB exón 2, es decir, confirmar la existencia de alelos que han trascendido eventos de especiación, se reconstruyó la historia evolutiva de las secuencias de DQB exón 2 de ballena gris con base en sus relaciones filogenéticas con otras especies de mamíferos, cuyas secuencias se encuentran disponibles en el banco de genes. Para esta reconstrucción filogenética, se utilizó el programa Modeltest para obtener los parámetros del modelo evolutivo de mejor ajuste, y posteriormente se reconstruyó el árbol mediante el método de Neighbor-Joining.

### **5.2.3 Segregación de alelos DQB por linajes mitocondriales de ballena gris**

Con la finalidad de obtener un panorama más amplio sobre la historia demográfica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, se realizó un análisis comparativo para observar si los linajes maternos presentan diferentes alelos DQB, si existe o no una segregación por laguna de reproducción, o si todos los individuos, independientemente del linaje materno y de la laguna, tienen la misma probabilidad de que se presenten en ellos cualquier combinación de alelos. A partir de estos análisis, se puede evaluar la influencia de la variación genética adaptativa del *Mhc*, sobre una población aparentemente recuperada, y que no muestra signos de estructura poblacional a nivel de linajes maternos.

## 6. RESULTADOS

Los resultados serán descritos en el mismo orden que en la sección de material y métodos. Al finalizar, se integraran los resultados obtenidos a partir de ambos marcadores genéticos con el objetivo de evaluar el escenario más plausible de recuperación y estado actual de salud genética de la población de la ballena gris del Pacífico Nororiental.

### 6.1 Identificación molecular del sexo

Se identificó el sexo de 90 muestras, las tres restantes quedaron como no identificadas (Anexo 1). En la tabla I, se puede observar que la proporción de sexos esta sesgada hacia las hembras (tres hembras por macho en promedio), siendo Bahía Magdalena la laguna con mayor número de hembras (27), seguida de Laguna San Ignacio (22); por el contrario, en Laguna Ojo de Liebre se observó una proporción de sexos casi de 1:1 (1.23).

**Tabla I. Proporción de sexos por laguna y total.**

| <b>Laguna</b> | <b>n</b> | <b>H</b> | <b>M</b> | <b>H:M</b> |
|---------------|----------|----------|----------|------------|
| <b>LSI</b>    | 29       | 22       | 7        | 3.14       |
| <b>BM</b>     | 32       | 27       | 5        | 5.4        |
| <b>LOL</b>    | 29       | 16       | 13       | 1.23       |
| <b>Total</b>  | 90       | 65       | 25       | 2.6        |

**H = Hembra; M = Macho**

## 6.2 Análisis de la Diversidad de la Región control del ADNmit

Se obtuvieron 93 secuencias individuales de 468pb, entre las cuales se encontraron 30 haplotipos definidos por 34 sitios variables (Tabla II). Las frecuencias para cada nucleótido fueron: A = 0.3078, C = 0.2235, G = 0.1574, T = 0.3104.

Para el análisis comparativo entre los haplotipos, se utilizaron los publicados por Steeves *et al.* 2001 (número de acceso al banco de genes AF369785-AF369762), LeDuc *et al.* 2002 (AF326789-AF326824) y Goertliz *et al.* 2003 (AY514484-AY514458), y solo se analizó la zona de traslape entre las secuencias. La mayoría de los haplotipos encontrados en este trabajo, corresponden a los publicados por LeDuc *et al.* (2002). Debido a los errores de secuenciación en el trabajo de Goertliz *et al.* 2003 (ver Del Toro-Muñoz 2006), se tomó la decisión de incluir en los resultados, solo las secuencias de LeDuc *et al.* (2002), además de que es el trabajo más amplio en cuanto al tamaño de muestra analizado (120 individuos).

En cuanto a la frecuencia haplotípica (Tabla II), cuatro de los haplotipos (hA, hB, hC y hG) representan aproximadamente el 40% de los individuos analizados y se encontraron en las tres lagunas; otros ocho haplotipos, estuvieron representados por un solo individuo. 27 de los 30 haplotipos, corresponden a los publicados por LeDuc *et al.* (2002), donde los haplotipos A, B, C y G fueron los más abundantes.

Por otro lado, tres de los haplotipos (ENPWG11, 20 y 28) no han sido reportados anteriormente, y ninguno de estos correspondió a algún individuo muestreado en Laguna San Ignacio (LSI). Aunado a esto, se

encontró que el haplotipo ENPGW10 (hJ), corresponde a uno de los tres haplotipos exclusivos para la población asiática (F, I y J, ver LeDuc *et al.* 2002); este individuo, fue muestreado en LSI, y fue catalogado por la UABCS y caracterizado molecularmente (este trabajo) como un individuo macho (ver Anexo 1).

**Tabla II. Sitios variables entre los 30 haplotipos de ballena gris. Frecuencias de ocurrencia en las lagunas San Ignacio (LSI), Bahía Magdalena (BM) y Ojo de Liebre (LOL).**

| HAPLOTIPOS |     | SITIOS VARIABLES                    | FRECUENCIA |    |    |   |     |   | TOTAL |
|------------|-----|-------------------------------------|------------|----|----|---|-----|---|-------|
|            |     | 00000011111111112222333333333344    | LSI        |    | BM |   | LOL |   |       |
|            |     |                                     | LeDuc      | et | H  | M | H   | M |       |
| al. 2002   |     | 62341556759123185123815676478786934 | H          | M  | H  | M | H   | M |       |
| ENPGW01    | hD  | T-TATCTTTTCTTGTGTGCGGTTACCTTTAATA   | 2          | 0  | 2  | 0 | 0   | 0 | 5     |
| ENPGW02    | hV  | .-.....A.T.CC.....C.                | 1          | 0  | 1  | 0 | 1   | 0 | 3     |
| ENPGW03    | hG  | .-.....A.TA.C.....G.C.              | 1          | 2  | 2  | 1 | 0   | 1 | 7     |
| ENPGW04    | hAB | .-.....C.T.....                     | 0          | 0  | 3  | 1 | 0   | 0 | 4     |
| ENPGW05    | hAG | .-.....C.T.....CC....               | 0          | 0  | 0  | 0 | 2   | 0 | 2     |
| ENPGW06    | hAC | .-.....C.T...C....CC....            | 0          | 0  | 0  | 1 | 0   | 1 | 2     |
| ENPGW07    | hC  | .-.....C.....                       | 3          | 1  | 3  | 0 | 1   | 1 | 9     |
| ENPGW08    | hZ  | .-.....C....T.....                  | 1          | 0  | 1  | 0 | 0   | 0 | 2     |
| ENPGW09    | hAJ | .-.....C.....T..C.....C.            | 0          | 0  | 1  | 0 | 0   | 0 | 1     |
| ENPGW10    | hJ  | .-.....C.....A.T..C.....CG          | 0          | 1  | 0  | 0 | 0   | 0 | 1     |
| ENPGW11    | *   | .-.....C.....A.TA.C.....C.          | 0          | 0  | 1  | 0 | 0   | 0 | 1     |
| ENPGW12    | hAD | .-.....C.....A.TA.C.....G.C.        | 2          | 0  | 0  | 0 | 0   | 1 | 3     |
| ENPGW13    | hA  | .-.....C.....ATT..C.....C.          | 2          | 1  | 3  | 1 | 1   | 2 | 10    |
| ENPGW14    | hK  | .-.....C..C.....                    | 1          | 0  | 1  | 0 | 1   | 0 | 3     |
| ENPGW15    | hY  | .-.....CC.....A.T..C.....C.         | 0          | 0  | 0  | 0 | 1   | 0 | 1     |
| ENPGW16    | hM  | .-.....C..C.....A.TA.C.....G.C.     | 0          | 0  | 1  | 0 | 2   | 0 | 3     |
| ENPGW17    | hN  | .-.....C..C....A.ATT..C.....G.C.    | 0          | 0  | 0  | 0 | 0   | 0 | SN 1  |
| ENPGW18    | hAF | .-.....C..C.C..A.ATT..C.....G.C.    | 0          | 0  | 0  | 0 | 1   | 0 | 1     |
| ENPGW19    | hX  | .-.....C.....T.....                 | 1          | 0  | 0  | 0 | 0   | 2 | 3     |
| ENPGW20    | *   | .-.....C.....C.T.....CC....         | 0          | 0  | 0  | 0 | 1   | 0 | 1     |
| ENPGW21    | hH  | .-.....C...C.....T.....             | 2          | 0  | 0  | 1 | 0   | 0 | 3     |
| ENPGW22    | hR  | .-.....C...C.....C..T.....          | 3          | 0  | 0  | 0 | 0   | 2 | 5     |
| ENPGW23    | hE  | .-.....C.....T..C.....C.            | 0          | 0  | 0  | 0 | 1   | 0 | 1     |
| ENPGW24    | hT  | .-....C.....ATT..C.T.C....C.        | 1          | 0  | 1  | 0 | 1   | 0 | 4     |
| ENPGW25    | hAA | .-....C..C.....A.ATT.CC.....G.C.    | 0          | 0  | 1  | 0 | 0   | 0 | 1     |
| ENPGW26    | hAI | .-.G.....CC.....A.T..C.T.....C.     | 0          | 0  | 2  | 0 | 0   | 0 | 2     |
| ENPGW27    | hO  | C-.....A.TA.C.....G.C.              | 1          | 0  | 0  | 0 | 0   | 0 | 1     |
| ENPGW28    | *   | C-.....C.....A.TA.C.....C.          | 0          | 0  | 1  | 0 | 1   | 0 | 2     |
| ENPGW29    | hL  | C-.....C.....A.TA.C.....G.C.        | 0          | 1  | 0  | 0 | 0   | 1 | 2     |
| ENPGW30    | hB  | .AC.CT.C..T..A..C.C.T...C..TC...GC. | 1          | 1  | 3  | 0 | 2   | 2 | 9     |
| Duc        | Q   | .-.....C.....A.T..C.....C.          |            |    |    |   |     |   |       |
| Duc        | U   | .-.....C.....A.TA.C.....G.C.        |            |    |    |   |     |   |       |
| Duc        | W   | .-.....C..C.....A.T..C.....G.C.     |            |    |    |   |     |   |       |
| Duc        | S   | .-.....C.....C.....T.....           |            |    |    |   |     |   |       |
| Duc        | P   | .-.G.....C.....A.T..C.....C.        |            |    |    |   |     |   |       |
| Duc        | AH  | .-.....C.....                       |            |    |    |   |     |   |       |
| Duc        | AE  | .-....C..C..C....A.ATT.CC.....G.C.  |            |    |    |   |     |   |       |

Duc = haplotipos reportados por LeDuc *et al.* (2002) que no se encontraron en este trabajo; \* = haplotipos no reportados en estudios previos; H = Hembra; M = Macho; SN = individuos con sexo no identificado

En cuanto a la nomenclatura de los haplotipos encontrados en este trabajo, aquellos que corresponden a alguno de los reportados por LeDuc *et al.* (2002), se les nombro con la misma letra, pero con una “h” distintiva, debido a que el tamaño de las secuencias comparadas entre ambos trabajos es de 454pb. Aquellos que solo fueron encontrados en este estudio, presentan las iniciales “ENPGW” (Eastern North Pacific Gray Whale).

### 6.2.1 Diversidad Genética

Se obtuvieron los valores de diversidad haplotípica ( $h$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ) totales, y para cada una de las lagunas. La probabilidad de que dos individuos elegidos al azar de la muestra total ( $n= 90$ ) presentaran haplotipos diferentes (diversidad haplotípica) fue de  $95\% \pm 0.8$ ; en tanto que la diversidad nucleotídica total fue de  $1.7\% \pm 1.0$ . Los valores más altos para estas diversidades, se encontraron en Laguna Ojo de Liebre (Tabla III).

**Tabla III. Índices de Diversidad Genética de las lagunas: San Ignacio, Bahía Magdalena y Ojo de Liebre.**

| Laguna       | n  | Haplotipos | Diversidad Haplotípica (%) $h$ | Diversidad Nucleotídica (%) $\pi$ |
|--------------|----|------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| <b>LSI</b>   | 30 | 16         | $95 \pm 1.0$                   | $1.6 \pm 0.8$                     |
| <b>BM</b>    | 34 | 19         | $95 \pm 1.0$                   | $1.7 \pm 0.9$                     |
| <b>LOL</b>   | 29 | 19         | $96 \pm 1.0$                   | $2 \pm 1.0$                       |
| <b>Total</b> | 93 |            | $95 \pm 0.8$                   | $1.7 \pm 1.0$                     |

### 6.2.2 Estructura Genética

Para el cálculo del índice de fijación  $\Phi_{ST}$ , se utilizó el método de distancia genética de Tamura Nei con distribución gamma de 1.011, modelo de mejor ajuste obtenido del análisis de Modeltest (ver más adelante en reconstrucción filogenética).

Se obtuvieron valores no significativos para los índices de fijación  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  (-0.00541,  $p=0.77$ ; y -0.00846,  $p=0.68$ , respectivamente, Tabla IV). Al ser no significativos, se infiere que a nivel mitocondrial no existe estructura genética en la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, de acuerdo a la utilización de las tres lagunas de crianza analizadas.

Al realizar el análisis de estructura incluyendo solo a las hembras, de igual forma, los resultados fueron no significativos.

**Tabla IV. Análisis de varianza genética ( $F_{ST}$ ) y varianza molecular ( $\Phi_{ST}$ ) mitocondrial entre los individuos de ballena gris de las lagunas de B.C.S.**

| <b>Fuente de variación</b>                                                                                                  | <b>Grados de libertad</b> | <b>Componentes de la varianza <math>F_{ST}</math> / <math>\Phi_{ST}</math></b> | <b>Porcentaje de variación <math>F_{ST}</math> / <math>\Phi_{ST}</math></b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>Entre lagunas</b>                                                                                                        | 2                         | -0.00258 / -0.03640                                                            | -0.54 / -0.85                                                               |
| <b>Dentro de las lagunas</b>                                                                                                | 90                        | 0.47906 / 4.33749                                                              | 100.54 / 100.85                                                             |
| <b>Total</b>                                                                                                                | 92                        | 0.47648 / 4.30109                                                              |                                                                             |
| <b><math>F_{ST} = -0.00541</math> <math>p = 0.77861</math> / <math>\Phi_{ST} = -0.00846</math> <math>p = 0.68782</math></b> |                           |                                                                                |                                                                             |

### 6.2.3 Relaciones Filogenéticas

Aquellos haplotipos que no se encontraron en este trabajo y se incluyeron en las reconstrucciones filogenéticas, finalizan con la palabra “DUC”, lo cual hace referencia a los reportados por LeDuc *et al.* (2002).

De acuerdo con los resultados del programa ModelTest, el mejor modelo de sustitución nucleotídica para los haplotipos mitocondriales de ballena gris con base en el Criterio de Información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés) fue el de Tamura-Nei con proporción de sitios no variables (0.8493) y distribución Gamma (1.0011). Las tasas de sustitución de cada base fueron:  $A \leftrightarrow C = 1.0$ ;  $A \leftrightarrow G = 82.0518$ ;  $A \leftrightarrow T = 1.0$ ;  $C \leftrightarrow G = 1.0$ ,  $C \leftrightarrow T = 240.1177$ ;  $G \leftrightarrow T = 1.0$ .

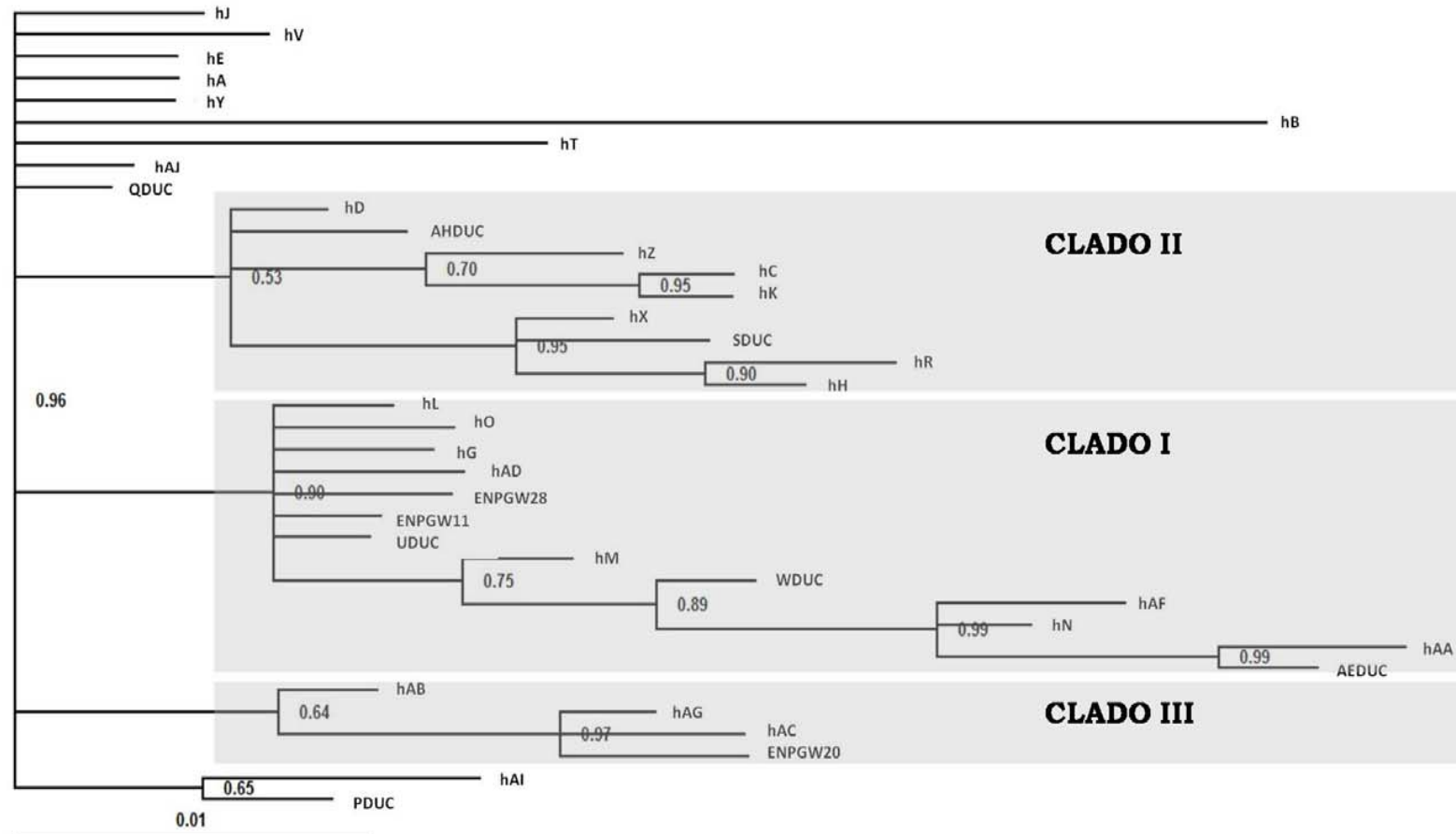
Por su parte el programa MrModeltest, indicó que el mejor modelo de sustitución nucleotídica, fue el general de tiempo reversible (GTR), con distribución Gamma de variación entre sitios de 1.0.

Los árboles filogenéticos contruidos a partir de los métodos de Máxima Verosimilitud (MV), Bayesiano (By) y Neighbor-Joining (NJ) (Figs. 3-5), mostraron topologías similares, con al menos tres Clados soportados con valores altos (mayor al 50%) en los porcentajes de las ramas. Por el método de MV y By, el Clado I (soportado con un 90 y 89% respectivamente), agrupó un total de 13 haplotipos; mientras que en el Clado II (53 y 50% respectivamente), se agruparon nueve haplotipos. En un tercer clado (Clado III), se observó que para la filogenia por MV (ver Figura 3), se agruparon cuatro haplotipos (hAB, hAG, hAC y ENPGW\_20; con 64% de sustento), mientras que para la topología por By, el haplotipo hAB quedo excluido de este Clado (ver Figura 4);

quedando los tres restantes en una rama sólidamente sustentada (97%), misma que se observó por MV. A pesar de que el Clado I, es el más sólido en ambas topologías e incluye mayor número de haplotipos, éste solo agrupó a uno de los linajes más comunes y varios de baja frecuencia; representando al 23% de los individuos de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental.

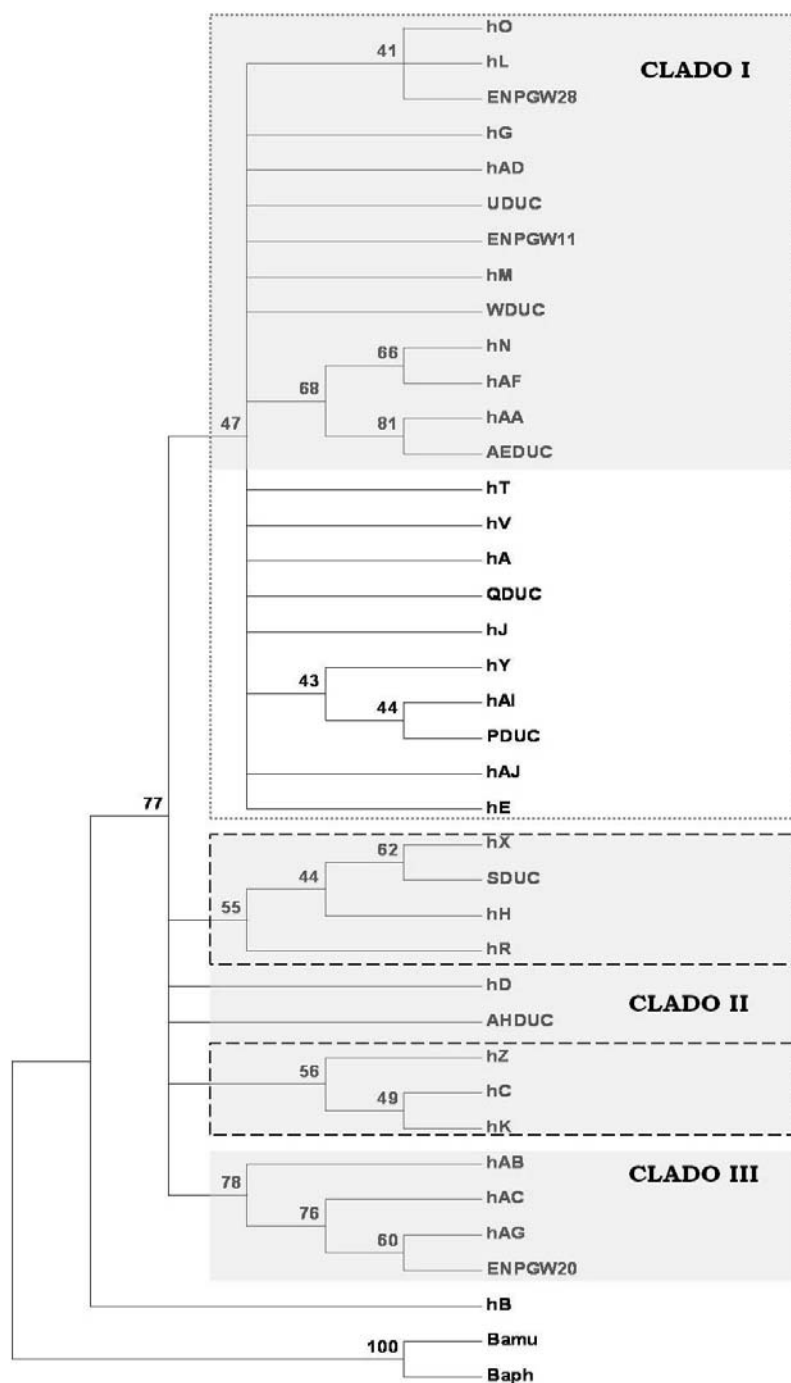
En la reconstrucción por el método de NJ, se observó una topología diferente. El haplotipo hB, se ubicó en la parte basal del árbol, a partir del cual derivan el resto de los linajes de ballena gris; los cuales se agruparon en cuatro ramas principales, con solo un clado en común con las otras topologías (Clado III; ver Figura 5). En la rama más grande, quedaron agrupados 23 haplotipos, incluyendo los correspondientes al Clado I, y el haplotipo de mayor frecuencia en la población (hA); sin embargo, el nivel de sustento de esta rama, fue de 47%. Por otro lado, se observaron dos ramas con altos valores de sustento (54 y 56%), las cuales corresponden al Clado II en las topologías por MV y By.

Por otro lado, cabe mencionar, que en las reconstrucciones filogenéticas, además de observar la relación genética entre linajes, se pueden hacer inferencias sobre su divergencia a lo largo del tiempo evolutivo. Aquellos haplotipos que no se agruparon en clados (nueve en total; ver Figuras 3 y 4), representan el 32% de los individuos e incluyen los haplotipos de mayor frecuencia (hA y hB), corresponden a los más divergentes; siendo el haplotipo hB, el de mayor distancia genética y probablemente el de carácter ancestral (ver Figura 3).



**Figura 3. Reconstrucción filogenética por Máxima Verosimilitud para los linajes mitocondriales de ballena gris. Modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei – Proporción de Sitios Invariantes (0.8493) – Distribución Gamma (1.0011). Sobre las ramas se indican los valores de remuestreo (10,000 replicas) que las sustentan.**





**Figura 5. Reconstrucción filogenética por Neighbor-Joining para los linajes mitocondriales de ballena gris. Modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei, con proporción de sitios no variables (0.8493) y distribución Gamma (1.0011). Sobre las ramas se indican los valores de remuestreo (10,000 replicas) que las sustentan.**

#### **6.2.4 Historia Demográfica**

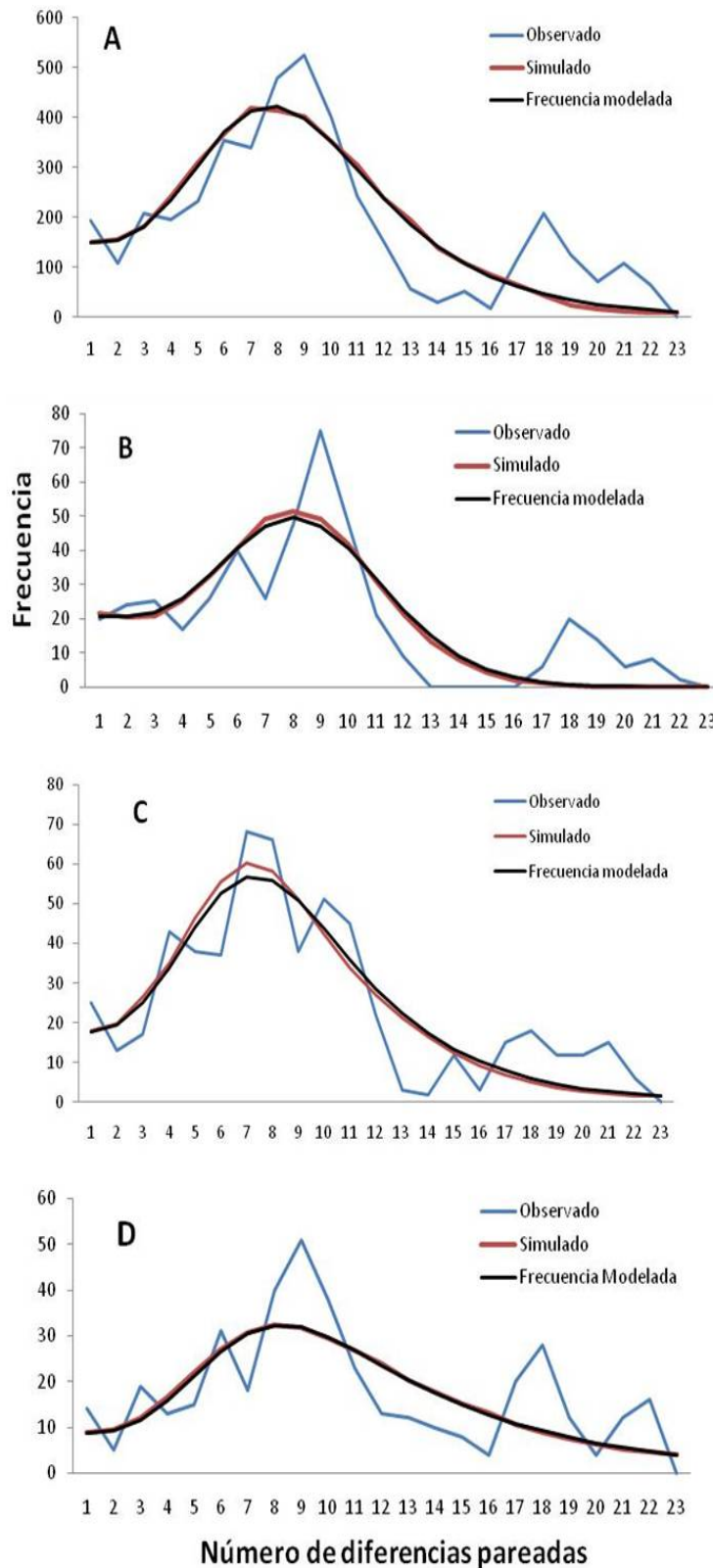
La prueba de neutralidad de Tajima, y los descriptores demográficos del modelo de expansión repentina, resultaron ser no significativos ( $p > 0.05$ , ver Tabla V), tanto para la población total, como para cada una de las lagunas. En la distribución de frecuencias para el número de diferencias pareadas entre los haplotipos (Figura 6), se observó una moda principal, tanto para el total de la población como para cada laguna, y una moda más pequeña a la derecha de la distribución, que es consistente entre las poblaciones.

Estos resultados sugieren, que los linajes mitocondriales de la población de ballena gris, se encuentran probablemente, en una fase de expansión poblacional, o al menos, parecen no haber pasado por un cuello de botella reciente; y aunque el número de linajes podría haberse mantenido estable a través del tiempo evolutivo, no parecen haber disminuido drásticamente.

**Tabla V. Prueba de Neutralidad Selectiva (D'Tajima) y descriptores demográficos del modelo de expansión para las tres lagunas (LSI, BM y LOL), y la población total (bootstrap de 1000 réplicas).**

| <b>Parámetros</b>            | <b>LSI</b> | <b>BM</b> | <b>LOL</b> | <b>Total</b> |
|------------------------------|------------|-----------|------------|--------------|
| <b>Haplotipos</b>            | 16         | 19        | 19         | 30           |
| <b>D'Tajima</b>              | -0.003     | -0.098    | 0.531      | 0.668        |
| <b>(p-valor)</b>             | (0.576)    | (0.513)   | (0.751)    | (0.807)      |
| <b><math>\tau</math></b>     | 7.969      | 5.354     | 5.650      | 5.918        |
| <b><math>\theta_0</math></b> | 0.000      | 3.241     | 5.620      | 2.967        |
| <b><math>\theta_1</math></b> | 20.039     | 31.455    | 46.406     | 28.154       |
| <b>SSD</b>                   | 0.014      | 0.007     | 0.011      | 0.007        |
| <b>(p-valor)</b>             | (0.278)    | (0.442)   | (0.246)    | (0.238)      |
| <b>IH</b>                    | 0.020      | 0.013     | 0.017      | 0.008        |
| <b>(p-valor)</b>             | (0.513)    | (0.555)   | (0.333)    | (0.579)      |

$\tau = 2\mu t$ , donde  $\mu$  es la tasa de mutación de la secuencia analizada, y  $t$  es el tiempo en número de generaciones desde la expansión,  $\theta_0 = 2\mu N_0$  antes de la expansión, y  $\theta_1 = 2\mu N_1$  después de la expansión; SSD = suma de desviaciones cuadradas; IH = índice de irregularidad de Harpending; p = valor de significancia estadística.

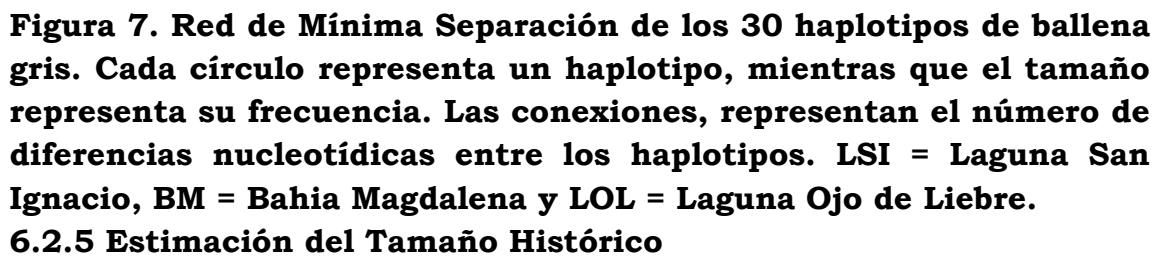


**Figura 6. Distribución de la frecuencia del número de diferencias pareadas de los haplotipos mitocondriales de ballena gris. La curva simulada se obtuvo a partir de 1000 replicas por bootstrap, mientras que la curva modelada corresponde al estimador de la prueba.**

- A) Total de la población;**
- B) Laguna San Ignacio;**
- C) Bahía Magdalena;**
- D) Laguna Ojo de Liebre.**

En cuanto a la red de mínima separación (MSN; Figura 7), se observó que la distribución de los haplotipos concuerda con los principales clados encontrados en las reconstrucciones filogenéticas, así como con la MSN reportada por LeDuc *et al.* (2002). En cuanto a las distancias observadas entre los haplotipos, los más abundantes (hA y hB), estuvieron diferenciados por 16 mutaciones; el haplotipo hA, resultó ser el más cercanamente emparentado con el resto de los haplotipos, mientras que el haplotipo hB es el que presenta mayor número de diferencias nucleotídicas.

Desde un punto de vista demográfico, la distribución espacial de los haplotipos en la MSN, hace referencia a una relativa expansión demográfica de los linajes mitocondriales de ballena gris, en la cual se observa que la mayoría de los linajes están unidos por conexiones cortas a los más comunes; los cuales a su vez, se encuentran distribuidos homogéneamente en la población (no estructura entre lagunas).



60

Para el cálculo del número efectivo poblacional histórico, se contaron un total de 34 haplotipos; 33 de ellos reportados por LeDuc *et al.* (2002), y uno más encontrado en este trabajo (ENPGW28), el cual estuvo representado por dos individuos (ver Tabla II). El tamaño de la secuencia utilizada para el cálculo de la diversidad genética a nivel haplotípico, fue de 523pb (fragmento de mayor tamaño analizado para la región control de ADNmit de ballena gris; ver LeDuc *et al.* 2002).

El tiempo de divergencia de todos los linajes mitocondriales de ballena gris, estimado directamente de la topología del árbol filogenético linearizado (ver Enríquez-Paredes 2005), fue de 1.24 millones de años (ma). La estimación obtenida mediante Inferencia Bayesiana (usando BEAST), fue de 1.28 ma en promedio (0.7 – 2.35 ma, 95% IC).

La tabla VI detalla los valores de cada uno de los parámetros empleados en el cálculo del tamaño poblacional histórico, tanto a través del modelo tradicional, como del modelo corregido. El tamaño poblacional histórico estimado por el método tradicional resultó entre siete y ocho veces mayor que el obtenido por el método corregido. El número efectivo de hembras histórico para ballena gris, se estimó en 4,478 individuos a través del modelo corregido, y en 25,281 individuos empleando el modelo tradicional; el tamaño histórico poblacional, se estimó en un total de 26,871 y 151,689 individuos para el modelo corregido y el modelo tradicional, respectivamente (ver Tabla VI).

**Tabla VI. Parámetros empleados para la estimación del tamaño histórico con base en datos genéticos para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental.**

| Modelos Genéticos                             | NH | m   | p    | TD   | TG | l       | $\mu$   | $\nu$   | $\theta P$ | $\theta Nh$ | Ne(f)  | Factores de Conversión |            |            | N              |
|-----------------------------------------------|----|-----|------|------|----|---------|---------|---------|------------|-------------|--------|------------------------|------------|------------|----------------|
|                                               |    |     |      |      |    |         |         |         |            |             |        | Ps 1:1<br>2            | NT:Ne<br>2 | Pim<br>1.5 |                |
| Modelo Corregido<br>( $\theta Nh = 2Ne \nu$ ) | 34 | 523 |      | 1.24 | 18 |         | 2.3E-07 | 0.00012 |            | 0.542       | 4,478  | 8,957                  | 17,914     | 8,957      | <b>26,871</b>  |
| Modelo Tradicional<br>( $\theta = 2Ne \mu$ )  | 34 | 523 | 8.33 |      | 18 | 1.8E-08 | 6.3E-07 |         | 0.016      |             | 25,281 | 50,563                 | 101,126    | 50,563     | <b>151,689</b> |

**NH = Número de haplotipos**

**m = Tamaño de la secuencia es pares de bases**

**p = Número promedio de diferencias pareadas**

**TD = Tiempo de divergencia en millones de años**

**TG = Tiempo generacional en años**

**l = Tasa de mutación por sitio; valor medio de la estimación utilizada por Roman & Palumbi (2003; 1.5E-08 a 2.0E-08)**

**$\mu$  = Tasa de sustitución por sitio por generación**

**$\nu$  = Tasa de sustitución por linaje**

**$\theta P$  = Diversidad nucleotídica poblacional**

**$\theta Nh$  = Diversidad nucleotídica promedio entre linajes**

**Ne(f) = Tamaño efectivo de hembras histórico de la población**

**Ps = Proporción de sexos (machos:hembras)**

**NT:Ne = Proporción de Número de adultos total NT respecto al Número efectivo total de la población Ne**

**Pim = Proporción de individuos inmaduros**

**N = Tamaño total histórico de la población**

**\* Factores de conversión utilizados por Roman & Palumbi (2003)**

Al incorporar cierto nivel de incertidumbre en los parámetros del modelo genético y factores de conversión, para la estimación del tamaño histórico, mediante simulaciones Monte Carlo (ver Tabla VII), se obtuvo una estimación del número efectivo de hembras de 4,461 (I.C. 95%, 2,410 – 7,201); y una abundancia total histórica de la población de ballena gris, de 28,583 individuos (I.C. 95%, 22,393 – 36,319). Estos valores fueron muy similares a los obtenidos mediante el cálculo determinístico (4,478 y 26,871 individuos, respectivamente; ver Tabla VII).

**Tabla VII. Parámetros empleados en la simulación Monte Carlo (100,000 remuestreos) para la estimación del tamaño histórico de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental con base en modelos genéticos.**

| <b>Parámetros</b>                              | <b>Nivel de incertidumbre</b> |
|------------------------------------------------|-------------------------------|
| Tiempo de Divergencia (millones de años)       | 1,240,000 ± 124,359           |
| Tiempo Generacional (años)                     | 18 ± 1.38                     |
| Proporción de sexos                            | 1 ± 0.08                      |
| Proporción de adultos                          | 0.5 ± 0.02                    |
| Proporción de jóvenes                          | 0.5 ± 0.05                    |
| <b>Ne(f) = 4,461 (I.C. 95%, 2,410 - 7,201)</b> |                               |
| <b>N = 28,583 (I.C. 95%, 22,393 - 36,319)</b>  |                               |

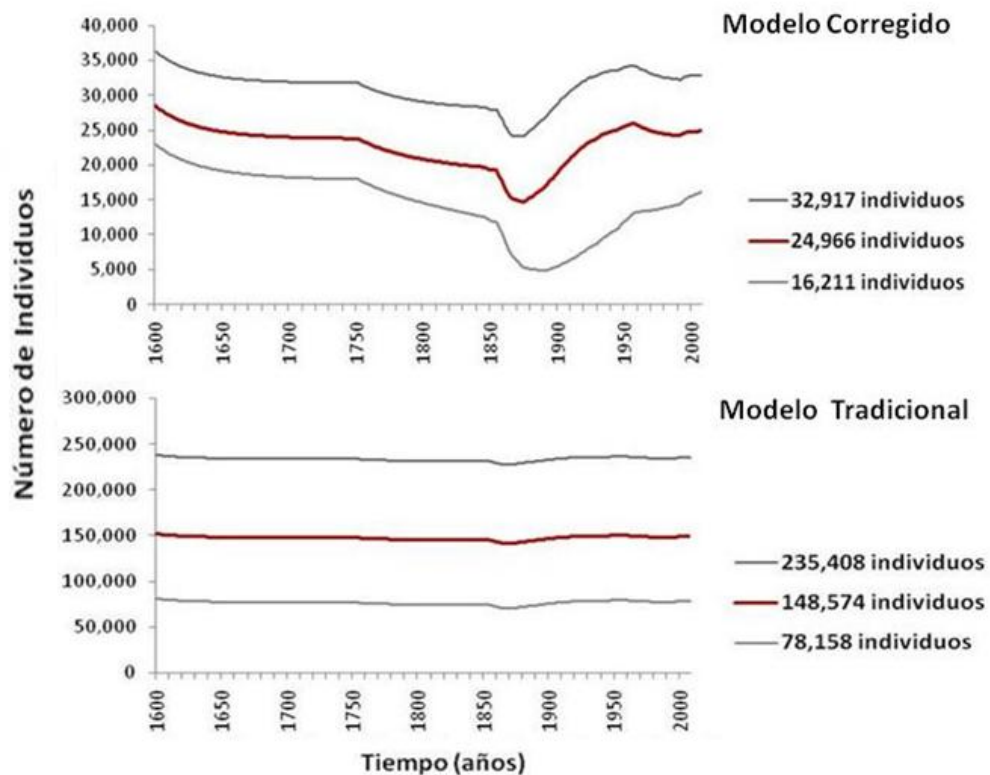
Los niveles de incertidumbre se obtuvieron de la simulación Monte Carlo

### **6.2.6 Simulación de Tendencias Demográficas:**

#### **Comparación de las estimaciones de abundancia histórica**

Con la finalidad de comparar que tan plausibles pueden ser los resultados generados, sobre las estimaciones de abundancia histórica a partir de modelos genéticos, se realizó un ejercicio de simulación de la trayectoria demográfica para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental.

Con base en las estimaciones del tamaño histórico de la población (ver Tabla VI), se generó la tendencia demográfica a partir de cada estimación histórica (desde 1600 hasta el 2008; ver anexo 2), con sus respectivos intervalos de confianza (Figura 8). Como se puede observar, existe una gran variación en las trayectorias, y por consiguiente en las estimaciones de abundancia actual; modelo tradicional, entre 78,000 y 235,000 individuos. Por el contrario, los intervalos de confianza obtenidos para el modelo corregido, exhiben una varianza mucho más pequeña (entre 16,000 y 32,000), y además, dicha trayectoria coincide con las abundancias obtenidas a partir de los censos demográficos (ver Figura 10 y Tabla VIII).

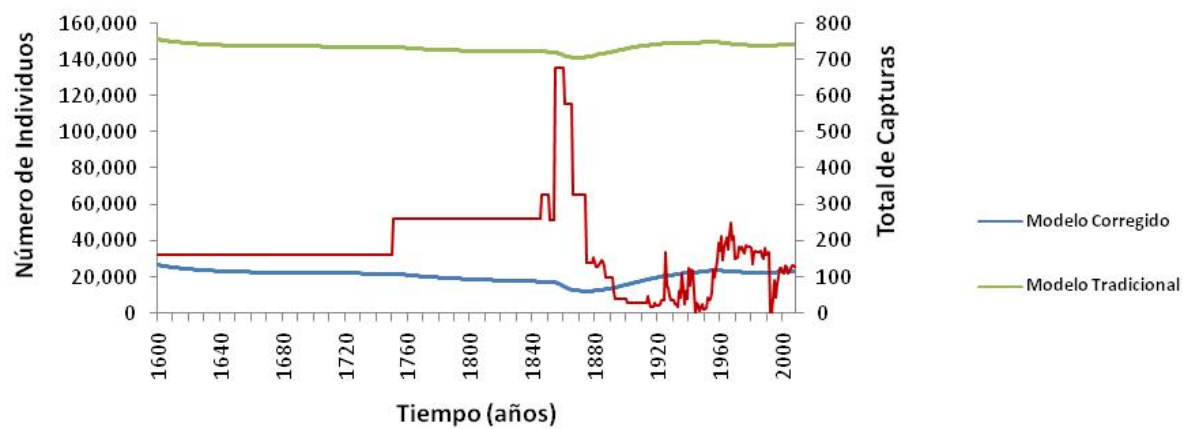


**Figura 8. Trayectoria demográfica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental con base en los modelos genéticos. Las líneas en rojo representan el valor medio del intervalo de confianza de cada estimación; las líneas en grises corresponden a los límites del intervalo al 95% de confianza.**

Al incorporar los datos de capturas, y comparar las trayectorias demográficas entre las tres estimaciones genéticas (Figura 9), como era de esperarse, se observó una gran discrepancia y de igual magnitud como para las estimaciones históricas sobre los niveles de abundancia poblacional.

Como se observa en la figura 9, para la fecha en la cual la población estuvo en supuesto riesgo de extinción (alrededor de 1880) debido a la captura desmedida, basándonos en las estimaciones a partir

del modelo tradicional, habría aproximadamente 150,000 individuos. Lo anterior resulta ilógico de ser, puesto que no se tienen registros de abundancias de esa magnitud para dicha población. Por el contrario, la trayectoria simulada a partir del modelo corregido, resultó en niveles de abundancia más creíbles, y que además, coinciden con los censos más actuales (ver más adelante).



**Figura 9. Trayectoria demográfica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental con base en las estimaciones de abundancia histórica obtenidas a partir de modelos genéticos. La línea en rojo representa el total de capturas (eje secundario de y) por año desde 1600 hasta el 2008 (ver Anexo 2).**

### 6.2.7 Modelos No genéticos

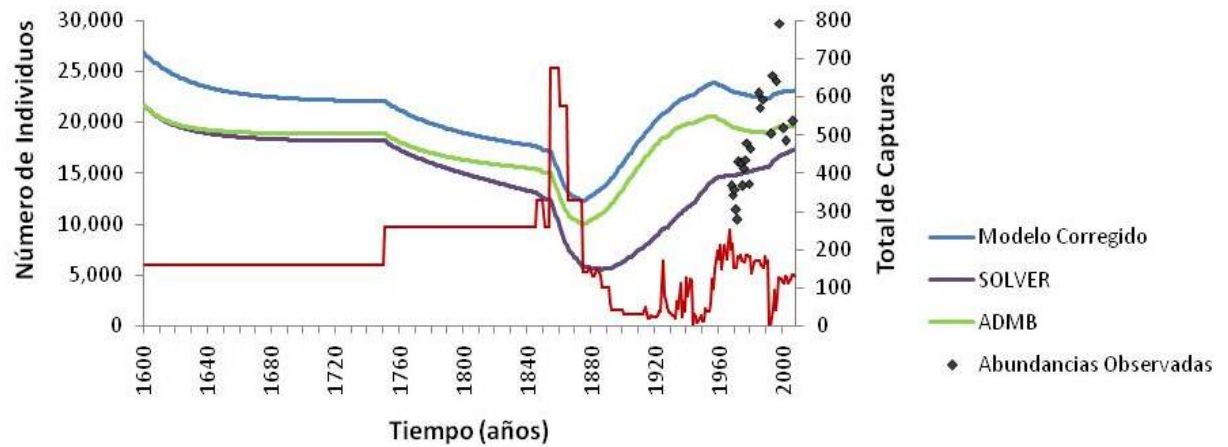
Como se ha mencionado anteriormente, existe incertidumbre sobre los niveles de abundancia histórica, sobre los registros de captura, y por consiguiente, sobre los niveles de abundancia actual de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental. Con el objeto de comparar las estimaciones de abundancia, y así poder evaluar con mayor precisión el estado actual de la población de ballena gris, se utilizaron dos métodos independientes a estimaciones genéticas: la herramienta SOLVER, y el ADMB.

Al comparar las estimaciones de abundancia para los modelos no genéticos con las obtenidas a partir de modelos genéticos (ver Tabla XVII), se observó una mayor similitud con la estimación obtenida a partir del modelo genético corregido, las estimaciones a partir de los métodos SOLVER y ADMB, y las estimaciones a partir de censos demográficos (IWC 2008, Rugh *et al.* 2008).

**Tabla VIII. Estimaciones de abundancia histórica y actual a partir de modelos genéticos y no genéticos.**

| <b>Modelo</b>                                            | <b>Abundancia original<br/>(IC 95%)</b> | <b>Abundancia actual<br/>2007-2008<br/>(IC 95%)</b> |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Censo Demográfico<br>(IWC 2008, Rugh <i>et al.</i> 2008) | 18,000 - 28,000                         | 20,110<br>(16,936 - 23,878)                         |
| Tradicional                                              | 151,895                                 | 148,780                                             |
| Roman y Palumbi 2003                                     | (81,335 - 238,499)                      | (78,158 - 235,408)                                  |
| Corregido                                                | 28,583                                  | 24,966                                              |
| Enríquez-Paredes 2005                                    | (22,393 - 36,319)                       | (16,211 - 32,917)                                   |
| SOLVER                                                   | 21,638                                  | 17,379                                              |
| ADMB                                                     | 21,642                                  | 19,668                                              |

Al incorporar las abundancias observadas (ver anexo 2), y generar la trayectoria demográfica para los métodos no genéticos, se observó que las tendencias son muy similares entre sí, y con la trayectoria generada a partir del modelo corregido (Figura 10); cabe resaltar que estas trayectorias pasan por puntos que corresponden a las abundancias observadas.



**Figura 10. Tendencia demográfica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental a través del modelo genético corregido y de los modelos no genéticos. La línea en rojo representa el total de capturas (eje secundario de y) por año desde 1600 hasta el 2008 (ver Anexo 2).**

### **6.3 Análisis de la Diversidad del *locus* DQB exón 2 *Mhc*-II**

#### **6.3.1 Naturaleza Histocompatible y Diversidad Alélica**

El uso de ambas cadenas en la caracterización de los perfiles, aumento la dificultad de segregar por patrones de picos, puesto que las cadenas hacia adelante no mostraron tener un patrón común entre individuos, por lo que se tomó la decisión de utilizar solo la cadena complementaria.

Del análisis de las variantes alélicas mediante el SSCP automatizado de 93 individuos, solo 83 produjeron perfiles legibles (63 hembras y 20 machos). Estos 83 perfiles fueron clasificados en 18 patrones electroforéticos, que podrían representar haplotipos DQB distintos en la especie (Anexo 3), usando la cadena de regreso. Los patrones A y Ca, fueron los más frecuentes encontrándose en un 35% y 22% de los individuos, mientras que 14 patrones poco frecuentes, estuvieron representados por menos de cuatro individuos, de los cuales ocho, solo se encontraron en un individuo. De los 18 perfiles clasificados, tres se encontraron en individuos de las tres lagunas (A, Aa y Ca; Anexo 3), mientras que seis patrones fueron exclusivos de Bahía Magdalena, y dos patrones para Laguna Ojo de Liebre y Laguna San Ignacio.

El anexo 4, resume características importantes de las perfiles SSCP poco frecuentes. Bahía Magdalena, fue la laguna que presentó mayor número de perfiles SSCP; por ende, se infiere que probablemente, esta sea la laguna con mayor polimorfismo alélico a nivel de DQB exón 2. Por otro lado, de los 23 individuos pertenecientes a los patrones poco

frecuentes, 17 fueron hembras, y cinco fueron machos; esto indicaría que existe mayor variabilidad en el *Mhc-II* en hembras, con respecto a los machos. Sin embargo, el número de hembras y de clonas analizadas, fue mucho mayor al número de machos. Cabe señalar, que los cinco individuos machos, corresponden a individuos con linajes mitocondriales distintos (que divergen en nucleótidos), lo cual pudiera indicar, que corresponden a individuos migrantes de la población.

La complejidad de los perfiles del SSCP, proporciona la primera evidencia de la presencia de más de dos alelos por individuo, y por tanto de duplicación génica. Por consiguiente, debido a la gran variación de los perfiles, se escogieron 15 individuos con los patrones más complejos para ser clonados y secuenciados (ver anexo 3).

En general, se secuenciaron 5 clonas por individuo, excepto para los individuos SI15 y OL01 (10 y 35 clonas respectivamente) (ver anexo 5). Para estos dos últimos individuos, del análisis y edición de secuencias, resultó en seis y 28 secuencias editadas sin ambigüedad, las cuales resultaron en cuatro y 13 alelos distintos. De las secuencias aisladas de dos individuos para ballena de aleta y dos para ballena azul (anexo 5), resultaron en un total de siete y seis alelos distintos.

Todas las secuencias obtenidas, correspondieron a un fragmento de 172pb. En ballena gris, 28 sitios variables definieron 25 secuencias distintas de nucleótidos para DQB exón 2 (Tabla IX).

**Tabla IX. Sitios variables a nivel nucleotídico entre los 25 alelos de DQB exón 2 encontrados en 15 individuos clonados de ballena gris.**

|                |                   | Sitios Variables                                            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |            |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------|-------------------|-------------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alelos         | locus<br>Asignado | 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1                                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Frecuencia |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                |                   | 1 1 1 1 2 2 2 2 2 4 5 5 6 7 0 1 2 2 3 3 4 4 5 5 5 6         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |            |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                |                   | 2 4 5 7 3 6 7 8 2 3 4 5 6 9 0 3 8 8 5 0 5 7 1 9 8 9 1 2 4 4 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |            |   |   |   |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*01 | LOCUS A           | C                                                           | G | A | C | C | T | A | C | A | G | C | A | G | T | A | C | A | G | G | A | A | A | C | A | A | G | C          | T | 7 |   |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*02 | LOCUS B           | .                                                           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .          | C | 1 |   |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*03 | LOCUS A           | .                                                           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T          | . | 1 |   |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*04 | LOCUS C           | .                                                           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | C | . | C          | . | 6 |   |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*05 | LOCUS C           | .                                                           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | C | . | G          | C | . | 1 |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*06 | LOCUS D           | .                                                           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . | .          | . | 1 |   |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*07 | LOCUS C           | .                                                           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | A | C          | . | C | . | 1 |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*08 | LOCUS B           | .                                                           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .          | . | 1 |   |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*09 | LOCUS C           | .                                                           | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | C | .          | C | . | 1 |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*10 | LOCUS E           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .          | . | 3 |   |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*11 | LOCUS E           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | C | .          | C | . | 3 |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*12 | LOCUS E           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | .          | . | . | 4 |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*13 | LOCUS D           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | A          | C | . | C | . | 4 |   |   |   |
| EsroENP-DQB*14 | LOCUS E           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | G          | A | C | . | C | . | 1 |   |   |
| EsroENP-DQB*15 | LOCUS D           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | G          | . | A | C | G | . | C | . | 1 |
| EsroENP-DQB*16 | LOCUS D           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | C | .          | . | A | C | . | C | . | 1 |   |
| EsroENP-DQB*17 | LOCUS E           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | .          | . | A | C | . | C | . | 1 |   |
| EsroENP-DQB*18 | LOCUS E           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .          | . | . | . | . | . | 1 |   |   |
| EsroENP-DQB*19 | LOCUS D           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | C | T | T | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | .          | A | C | . | C | . | 7 |   |   |
| EsroENP-DQB*20 | LOCUS D           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | C | T | T | . | . | . | . | . | . | . | . | C | G | .          | A | C | . | C | . | 1 |   |   |
| EsroENP-DQB*21 | LOCUS E           | .                                                           | . | . | . | . | C | T | A | G | A | G | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | .          | . | . | . | . | . | 1 |   |   |
| EsroENP-DQB*22 | LOCUS D           | .                                                           | G | . | . | C | T | A | G | A | G | . | . | C | T | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | .          | A | C | . | C | . | 1 |   |   |
| EsroENP-DQB*23 | LOCUS PS1         | G                                                           | . | . | G | G | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .          | . | . | 8 |   |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*24 | LOCUS PS2         | G                                                           | . | . | G | G | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | C          | . | C | . | 1 |   |   |   |   |
| EsroENP-DQB*25 | LOCUS PS1         | G                                                           | C | . | G | G | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | .          | . | 2 |   |   |   |   |   |   |
|                |                   | Total                                                       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 60         |   |   |   |   |   |   |   |   |

El locus asignado corresponde al análisis filogenético de segregación de alelos (ver Figura 11)

La naturaleza histocompatible de las secuencias referidas se verificó de acuerdo a su grado de homología con distintas secuencias histocompatibles clase II depositadas en el genbank. Todas las secuencias mostraron una alta homología con secuencias DQB exón 2 *Mhc*-II aisladas de varias especies de cetáceos (entre 92 – 98%), por ejemplo, con la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) fue entre 93 – 98%, con el cachalote (*Physeter catodon*) de 91 – 97%, así como con especies de mamíferos terrestres, como el panda gigante (*Ailuropoda*

*melanoleuca*, 91 – 96%), el alce (*Alces alces*, 90 – 93%), el cerdo (*Sus scrofa*, 88 – 91%), y la vaca (*Bos taurus*, 87 – 92%) (Tabla X). Cabe mencionar, que los alelos EsroENP-DQB\*04 y 10, resultaron 100% homólogos con los únicos dos alelos de DQB depositados en el banco de genes para esta población (número de acceso al genbank, DQ354635 y DQ354636, Baker *et al.* 2006).

El grado de homología de las secuencias de ballena de aleta y ballena azul generadas en este trabajo (se reportan solo las secuencias de aminoácidos, comparadas en Tabla XI), fue de un 89 – 98% para con otras especies de cetáceos. En particular, las secuencias de ballena de aleta (BaphGC-DQB\*01, 02, 03, 06 y 07), tuvieron una homología de 93 – 99% con otras secuencias para la misma especie (no. de acceso AB164199, Hayashi *et al.* 2003; DQ300261, Nigenda-Morales *et al.* 2008; DQ354627, Baker *et al.* 2006); en tanto que las secuencias de ballena azul (BamuGC-DQB\*05 y 06), tuvieron una homología del 96% con otra secuencia de la misma especie (no. de acceso AB164200, Hayashi *et al.* 2003).

**Tabla X. Secuencias histocompatibles clase II homólogas a las secuencias de DQB exón 2 *Mhc-II* de ballena gris (EsroENP-DQB\*01 – 25). Se muestran las identidades y el porcentaje de homología.**

| Especie             | EsroENP<br>DQB2*01 | EsroENP<br>DQB2*02 | EsroENP<br>DQB2*03 | EsroENP<br>DQB2*04 | EsroENP<br>DQB2*05 | EsroENP<br>DQB2*06 | EsroENP<br>DQB2*07 | EsroENP<br>DQB2*08 | EsroENP<br>DQB2*09 | EsroENP<br>DQB2*10 | EsroENP<br>DQB2*11 | EsroENP<br>DQB2*12 | EsroENP<br>DQB2*13 |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <i>Balaenoptera</i> | 167/171            | 166/171            | 166/171            | 168/171            | 167/171            | 160/171            | 167/171            | 166/171            | 167/171            | 163/171            | 163/171            | 163/171            | 162/171            |
| <i>physalus</i>     | 97%                | 97%                | 97%                | 98%                | 97%                | 93%                | 97%                | 97%                | 97%                | 95%                | 95%                | 95%                | 94%                |
| <i>Physeter</i>     | 164/171            | 163/171            | 163/171            | 167/171            | 166/171            | 161/171            | 166/171            | 163/171            | 166/171            | 159/171            | 162/171            | 158/171            | 161/171            |
| <i>catodon</i>      | 95%                | 95%                | 95%                | 97%                | 97%                | 94%                | 97%                | 95%                | 97%                | 92%                | 94%                | 92%                | 94%                |
| <i>Ailuropoda</i>   | 160/171            | 159/171            | 159/171            | 162/171            | 161/171            | 164/171            | 161/171            | 159/171            | 161/171            | 163/171            | 165/171            | 162/171            | 164/171            |
| <i>melanoleuca</i>  | 93%                | 92%                | 92%                | 94%                | 94%                | 95%                | 94%                | 92%                | 94%                | 95%                | 96%                | 94%                | 95%                |
| <i>Alces alces</i>  | 159/171            | 158/171            | 158/171            | 160/171            | 159/171            | 157/171            | 160/171            | 158/171            | 160/171            | 159/171            | 160/171            | 156/171            | 159/171            |
|                     | 92%                | 92%                | 92%                | 93%                | 92%                | 91%                | 93%                | 91%                | 93%                | 92%                | 93%                | 91%                | 92%                |
| <i>Sus scrofa</i>   | 154/171            | 153/171            | 153/171            | 157/171            | 157/171            | 154/171            | 157/171            | 153/171            | 156/171            | 153/171            | 156/171            | 153/171            | 156/171            |
|                     | 90%                | 89%                | 89%                | 91%                | 91%                | 90%                | 91%                | 89%                | 91%                | 89%                | 91%                | 89%                | 91%                |
| <i>Bos taurus</i>   | 152/169            | 153/171            | 153/169            | 155/169            | 154/169            | 151/171            | 156/169            | 151/169            | 154/169            | 151/169            | 152/169            | 150/169            | 151/169            |
|                     | 89%                | 89%                | 90%                | 91%                | 91%                | 88%                | 92%                | 81%                | 91%                | 89%                | 89%                | 88%                | 89%                |

| Especie             | EsroENP<br>DQB2*14 | EsroENP<br>DQB2*15 | EsroENP<br>DQB2*16 | EsroENP<br>DQB2*17 | EsroENP<br>DQB2*18 | EsroENP<br>DQB2*19 | EsroENP<br>DQB2*20 | EsroENP<br>DQB2*21 | EsroENP<br>DQB2*22 | EsroENP<br>DQB2*23 | EsroENP<br>DQB2*24 | EsroENP<br>DQB2*25 |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <i>Balaenoptera</i> | 161/171            | 160/171            | 161/171            | 162/171            | 162/171            | 161/171            | 160/171            | 162/171            | 160/171            | 162/169            | 163/169            | 160/167            |
| <i>physalus</i>     | 94%                | 93%                | 94%                | 94%                | 94%                | 94%                | 93%                | 94%                | 93%                | 96%                | 96%                | 95%                |
| <i>Physeter</i>     | 160/171            | 161/171            | 160/171            | 161/171            | 158/171            | 160/171            | 159/171            | 157/171            | 159/171            | 159/169            | 162/169            | 157/167            |
| <i>catodon</i>      | 93%                | 94%                | 93%                | 94%                | 92%                | 93%                | 92%                | 91%                | 92%                | 94%                | 95%                | 94%                |
| <i>Ailuropoda</i>   | 163/171            | 164/171            | 163/171            | 164/171            | 162/171            | 164/171            | 163/171            | 161/171            | 163/171            | 155/169            | 157/169            | 141/147            |
| <i>melanoleuca</i>  | 95%                | 95%                | 95%                | 95%                | 94%                | 95%                | 95%                | 94%                | 95%                | 91%                | 92%                | 95%                |
| <i>Alces alces</i>  | 158/171            | 157/171            | 158/171            | 159/171            | 158/171            | 156/171            | 155/171            | 155/171            | 155/171            | 154/169            | 156/169            | 151/167            |
|                     | 92%                | 91%                | 92%                | 92%                | 92%                | 91%                | 90%                | 90%                | 90%                | 91%                | 92%                | 90%                |
| <i>Sus scrofa</i>   | 155/171            | 154/171            | 155/171            | 155/171            | 152/171            | 154/171            | 153/171            | 152/171            | 153/171            | 147/167            | 151/167            | 150/169            |
|                     | 90%                | 90%                | 90%                | 90%                | 88%                | 90%                | 89%                | 88%                | 89%                | 88%                | 90%                | 88%                |
| <i>Bos taurus</i>   | 150/169            | 151/171            | 150/169            | 151/169            | 148/169            | 150/171            | 149/171            | 149/169            | 149/171            | 147/167            | 150/167            | 145/165            |
|                     | 80%                | 88%                | 88%                | 89%                | 87%                | 87%                | 87%                | 88%                | 87%                | 88%                | 89%                | 87%                |

La traducción de las secuencias DQB exón 2 MHC-II aisladas de ballena gris, mostró que cuatro de ellas (EsroENP-DQB2\*21, 23, 24, 25), presentaron codones de paro al inicio de la secuencia, por lo que la proteína no puede ser sintetizada; el resto de las 21 secuencias, tuvieron marcos de lectura abiertos y continuos. Para las secuencias aisladas de ballena de aleta y ballena azul, todas mostraron marcos de lectura abiertos (ver Tabla XI).

El alineamiento de los 57 aminoácidos traducidos, corresponden a las posiciones 21 a 77 del dominio  $\beta 1$  (Brown *et al.* 1993); se observó que algunos cambios de los residuos se dieron en regiones reconocidas como parte de las cadenas laterales de la PBR y/o que interactúan con las cadenas laterales del péptido (sitios: 26, 28, 30, 32, 37, 38, 47, 56, 57, 60, 61, 65, 67, 70, 71 y 74; Brown *et al.* 1993, Stern *et al.* 1994).

[illegible]

75

Las secuencias proteicas de ballena gris se comparan con secuencias similares de ballena jorobada (Meno, no. de acceso DQ354664, Baker *et al.* 2006), ballena de aleta (Baph, DQ300261, Nigenda-Morales *et al.* 2008; BaphGC\_DQB2\*01-07, este trabajo), ballena azul (Bamu, AB164200, Hayashi *et al.* 2003; BamuGC\_DQB2\*01-06, este trabajo), el tursión (Tutr, EF690293, Yang *et al.* 2008), y de cerdo (Susc, AF272718, Shiels *et al.* 2000).

Por otro lado, se observaron un total de 19 sustituciones de aminoácidos, de los cuales ocho se dieron en posiciones importantes de la PBR. Al comparar dichas sustituciones, se observó que 15 corresponden a cambios no conservativos de las propiedades fisicoquímicas de los residuos (peso molecular, polaridad), y cuatro fueron conservativas (no hubo cambios en las propiedades) (Tabla XII).

**Tabla XII. Sitios donde se dan las sustituciones de los aminoácidos de las secuencias aisladas. Los renglones en gris corresponden a posiciones donde los cambios son no conservativos, y renglones en blanco a cambios conservativos.**

| Posición | Aminoácido      | Propiedades                              | Sustitución     | Propiedades                              | Sustitución | Propiedades                              |
|----------|-----------------|------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------|-------------|------------------------------------------|
| 21       | Treonina        | Polar sin carga, hidrofílico PM 119      | Arginina        | Polar carga positiva, hidrofílico PM 174 |             |                                          |
| 22       | Ácido Glutámico | Polar carga negativa, hidrofílico PM 147 | Glicina         | No polar, hidrofóbico PM 75              | Glutamina   | Polar sin carga, hidrofílico PM 146      |
| 23, 25   | Arginina        | Polar carga positiva, hidrofílico PM 174 | Glicina         | No polar, hidrofóbico PM 75              |             |                                          |
| 26*, 37  | Tirosina        | Polar sin carga, hidrofílico PM 181      | Leucina         | No polar, hidrofóbico PM 131             |             |                                          |
| 28*      | Serina          | Polar sin carga, hidrofílico PM 105      | Ácido Glutámico | Polar carga negativa, hidrofílico PM 147 |             |                                          |
| 29       | Arginina        | Polar carga positiva, hidrofílico PM 174 | Lisina          | Polar carga positiva, hidrofílico PM 146 | Glicina     | No polar, hidrofóbico PM 75              |
| 38*      | Alanina         | No polar, hidrofóbico PM 89              | Valina          | No polar, hidrofóbico PM 117             |             |                                          |
| 43       | Ácido Aspártico | Polar carga negativa, hidrofílico PM 133 | Glicina         | No polar, hidrofóbico PM 75              |             |                                          |
| 57*      | Ácido Aspártico | Polar carga negativa, hidrofílico PM 133 | Alanina         | No polar, hidrofóbico PM 89              |             |                                          |
| 62       | Asparragina     | Polar sin carga, hidrofílico PM 132      | Serina          | Polar sin carga, hidrofílico PM 105      |             |                                          |
| 63       | Serina          | Polar sin carga, hidrofílico PM 105      | Glicina         | No polar, hidrofóbico PM 75              |             |                                          |
| 64       | Glutamina       | Polar sin carga, hidrofílico PM 146      | Arginina        | Polar carga positiva, hidrofílico PM 174 |             |                                          |
| 67*      | Leucina         | No polar, hidrofóbico PM 131             | Isoleucina      | No polar, hidrofóbico PM 131             |             |                                          |
| 70*      | Lisina          | Polar carga positiva, hidrofílico PM 146 | Glutamina       | Polar sin carga, hidrofílico PM 146      | Arginina    | Polar carga positiva, hidrofílico PM 174 |
| 71*      | Arginina        | Polar carga positiva, hidrofílico PM 174 | Treonina        | Polar sin carga, hidrofílico PM 119      | Alanina     | No polar, hidrofóbico PM 89              |
| 72       | Arginina        | Polar carga positiva, hidrofílico PM 174 | Triptofano      | No polar, hidrofóbico PM 204             |             |                                          |
| 75       | Leucina         | No polar, hidrofóbico PM 131             | Prolina         | No polar, hidrofóbico PM 115             |             |                                          |

\* Posiciones importantes de la PBR

Al realizar el análisis comparativo entre las 25 secuencias aisladas de ballena gris, en forma pareada y permutativa, se observó que en promedio, las sustituciones no sinónimas son superiores a las sinónimas; las sustituciones no sinónimas, son significativamente mayores a las sinónimas (para el total de las secuencias, 0.07 y 0.03 respectivamente,  $p < 0.5$ ; Tabla XIII). Así mismo, se observó que para las secuencias de ballena de aleta y ballena azul, las sustituciones no sinónimas son superiores a las sinónimas (para el total de las secuencias, 0.04 y 0.07, 0.02 y 0.04 respectivamente,  $p < 0.5$ ).

Al comparar las sustituciones sinónimas y no sinónimas dentro y fuera de la PBR para cada especie (Tabla XIII), se observó que la proporción de sustituciones no sinónimas vs sinónimas, fueron superiores dentro de la PBR para las tres especies. Cabe resaltar que para ballena gris, esta proporción fue 5 veces mayor en la PBR que fuera de esta región.

**Tabla XIII. Tasas de sustitución no sinónimas ( $d_N$ ) y sinónimas ( $d_S$ ) para el total de las secuencias, y dentro y fuera de la PBR, estimadas para ballena gris (*Eschrichtius robustus*), ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) y ballena azul (*B. musculus*).**

| <b>Ballena Gris</b>     | <b>Región</b>   | <b>No. de codones</b> | <b><math>d_N</math></b> | <b><math>d_S</math></b> | <b><math>d_N/d_S</math></b> | <b>Valor p</b> |
|-------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------|
|                         | <b>PBR</b>      | 14                    | 0.12                    | 0.01                    | <b>11.82</b>                | $p < 0.05$     |
|                         | <b>No - PBR</b> | 43                    | 0.04                    | 0.02                    | <b>2.04</b>                 |                |
|                         | <b>Total</b>    | 57                    | 0.07                    | 0.03                    | <b>2.51</b>                 |                |
| <b>Ballena de Aleta</b> | <b>Región</b>   | <b>No. de codones</b> | <b><math>d_N</math></b> | <b><math>d_S</math></b> | <b><math>d_N/d_S</math></b> | <b>Valor p</b> |
|                         | <b>PBR</b>      | 14                    | 0.18                    | 0.02                    | <b>7.48</b>                 | $p < 0.05$     |
|                         | <b>No - PBR</b> | 43                    | 0.04                    | 0.05                    | <b>0.91</b>                 |                |
|                         | <b>Total</b>    | 57                    | 0.07                    | 0.04                    | <b>1.79</b>                 |                |

| <b>Ballena Azul</b> | <b>Región</b>   | <b>No. de codones</b> | <b>d<sub>N</sub></b> | <b>d<sub>S</sub></b> | <b>d<sub>N</sub>/d<sub>S</sub></b> |          |
|---------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------------|----------|
|                     | <b>PBR</b>      | 14                    | 0.12                 | 0.02                 | <b>6.06</b>                        | p < 0.05 |
|                     | <b>No - PBR</b> | 43                    | 0.02                 | 0.02                 | <b>1.04</b>                        |          |
|                     | <b>Total</b>    | 57                    | 0.04                 | 0.02                 | <b>2.35</b>                        |          |

Por otro lado, al comparar las tasas de sustitución entre las secuencias de ballena gris que presentan codones de paro (pseudogenes) (Tabla XIV), se observó que las tasas de sustitución no sinónimas fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) respecto a las sinónimas dentro de la PBR; sin embargo, al comparar dichas secuencias con el resto con marcos de lectura abiertos, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para la tasa de sustitución no sinónima dentro de la PBR.

**Tabla XIV. Tasas de sustitución no sinónimas (d<sub>N</sub>) y sinónimas (d<sub>S</sub>) dentro y fuera de la PBR, para las secuencias con codones de paro (pseudogenes), y el resto de las secuencias con marcos de lectura abiertos para ballena gris (*Eschrichtius robustus*).**

| Región      | No. de codones | d <sub>N</sub> | d <sub>S</sub> | d <sub>N</sub> /d <sub>S</sub> | P         |
|-------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------------|-----------|
| Pseudogenes |                |                |                |                                |           |
| PBR         | 14             | 0.08           | 0.01           | 10.35                          | P < 0.05  |
| No - PBR    | 43             | 0.05           | 0.02           | 1.91                           |           |
| Genes       |                |                |                |                                |           |
| PBR         | 14             | 0.12           | 0.01           | 13.47                          | P > 0.05* |
| No - PBR    | 43             | 0.03           | 0.02           | 1.91                           |           |

\* valor no significativo para d<sub>N</sub> dentro de la PBR entre pseudogenes y genes

Adicionalmente, y una vez establecido el *locus* correspondiente para cada alelo DQB exón 2 de ballena gris (ver análisis filogenético intra-específico), se compararon las tasas de sustitución sinónima y no sinónima, dentro y fuera de la PBR para cada *locus* (Tabla XV). Como se puede observar, solo el LOCUS C, D y E, tuvieron tasas de sustitución no sinónimas significativamente superiores a las sinónimas dentro de la PBR. En particular el LOCUS D, tuvo una proporción  $d_N/d_S$  muy superior dentro de la PBR que fuera de esta región.

**Tabla XV. Tasas de sustitución no sinónimas ( $d_N$ ) y sinónimas ( $d_S$ ) dentro y fuera de la PBR, para cada *locus* asignado de los alelos DQB exón 2 de ballena gris (*Eschrichtius robustus*).**

| Región    | No. de<br>codones | d <sub>N</sub> | d <sub>S</sub> | d <sub>N</sub> /d <sub>S</sub> | P        |
|-----------|-------------------|----------------|----------------|--------------------------------|----------|
| LOCUS A   |                   |                |                |                                |          |
| PBR       | 14                | 0.000          | 0.000          |                                |          |
| No - PBR  | 43                | 0.010          | 0.000          |                                |          |
| LOCUS B   |                   |                |                |                                |          |
| PBR       | 14                | 0.000          | 0.000          |                                |          |
| No - PBR  | 43                | 0.021          | 0.000          |                                |          |
| LOCUS C   |                   |                |                |                                |          |
| PBR       | 14                | 0.016          | 0.000          |                                | P < 0.05 |
| No - PBR  | 43                | 0.011          | 0.000          |                                |          |
| LOCUS D   |                   |                |                |                                |          |
| PBR       | 14                | 0.122          | 0.007          | 17.965                         | P < 0.05 |
| No - PBR  | 43                | 0.026          | 0.015          | 1.714                          |          |
| LOCUS E   |                   |                |                |                                |          |
| PBR       | 14                | 0.038          | 0.000          |                                | P < 0.05 |
| No - PBR  | 43                | 0.021          | 0.009          | 2.457                          |          |
| LOCUS PS1 |                   |                |                |                                |          |
| PBR       | 14                | 0.000          | 0.000          |                                |          |
| No - PBR  | 43                | 0.010          | 0.000          |                                |          |

El LOCUS PS2 solo incluyó una secuencia por lo que no se realizaron comparaciones en las tasas de sustitución

Comparando la proporción de  $d_N/d_S$  dentro de la PBR para otras especies de cetáceos para las que se ha reportado duplicación de genes (Tabla XVI), se observó que la ballena gris, presenta el valor más alto (11,82), seguido del baiji (*Lipotes vexillifer*, con 7.66). Sin embargo, la tasa de sustitución no sinónima  $d_N$ , es menor para la ballena gris (0.11, contra 0.19 para el baiji).

**Tabla XVI. Promedio de las tasas de sustitución no sinónimas ( $d_N$ ) y sinónimas ( $d_S$ ), y la proporción ( $d_N/d_S$ ), en a) Región de Unión del Péptido (PBR) de DQB exón 2 *Mhc-II*, para la ballena gris (*Eschrichtius robustus*), ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*), ballena azul (*B. musculus*), el baiji (*Lipotes vexillifer*, Yang *et al.* 2005), ballena franca del sur (*Eubalaena australis*, Baker *et al.* 2006), ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*, Baker *et al.* 2006) y la marsopa sin aleta (*Neophocoena phocaenoides*, Xu *et al.* 2007); y b) Total de la secuencia de los loci DQB exón 2 *Mhc-II* (este trabajo), y exón 2 *Mhc-I* (Flores-Ramírez *et al.* 2000) para ballena gris.**

| <b>a)</b>                                            |                         |                         |                             |              |
|------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------|
| <b>Especie</b>                                       | <b><math>d_N</math></b> | <b><math>d_S</math></b> | <b><math>d_N/d_S</math></b> | <b>P</b>     |
| <i>Eubalaena australis</i><br>Del Sur                | 0.396                   | 0.000                   | -                           | $P < 0.0001$ |
| <i>Eschrichtius robustus</i><br>Pacífico Nororiental | <b>0.118</b>            | 0.010                   | <b>11.82</b>                | $P < 0.05$   |
| <i>Lipotes vexillifer</i>                            | <b>0.196</b>            | 0.026                   | <b>7.66</b>                 | $P < 0.01$   |
| <i>Balaenoptera physalus</i><br>Golfo de California  | 0.176                   | 0.024                   | 7.48                        | $P < 0.05$   |
| <i>Megaptera novaeangliae</i> *<br>SEA, CA y GM      | 0.304                   | 0.043                   | 7.07                        | $P < 0.001$  |
| <i>Balaenoptera musculus</i><br>Golfo de California  | 0.121                   | 0.020                   | 6.06                        | $P < 0.05$   |
| <i>Neophocoena phocaenoides</i> *<br>YRP, YSP y SCSP | 0.1                     | 0.023                   | 4.30                        | $P=0.071$    |
| <b>b)</b>                                            |                         |                         |                             |              |
| <b>loci</b>                                          | <b><math>d_N</math></b> | <b><math>d_S</math></b> | <b><math>d_N/d_S</math></b> | <b>P</b>     |
| <b>DQB exón 2 MHC-II</b>                             | 0.075                   | 0.030                   | 2.51                        | $P < 0.05$   |
| <b>exón 2 MHC-I</b>                                  | 0.082                   | 0.044                   | 1.86                        | $P = 0.005$  |

\* Individuos pertenecientes a: Sureste de Alaska (SEA), California Pacífico Norte (CA) y Golfo de Main Atlántico Norte (GM); Población del Río Yangtze (YRP), Población del Río Amarillo (YRP) y Población del Sur del Mar de China (SCSP), para la marsopa sin aleta.

Para hacer una aproximación sobre los niveles de diversidad alélica para el *locus* DQB exón 2, se escogió al individuo con mayor número de clonas secuencias, tanto para ballena gris, ballena de aleta y ballena azul (este trabajo), y para otras especies de cetáceos para las que se ha reportado duplicación de este gen (*Megaptera novaeangliae* y *Eubalaena australis*, ver Baker *et al.* 2006; *Lipotes vexillifer*, ver Yang *et al.* 2005). Así mismo, se comparó dicha diversidad con dos *locus* del MHC clase I (exón 2 y 3) para ballena gris (ver Flores-Ramírez *et al.* 2000).

Al comparar la razón entre el número de alelos respecto al número de clonas para cada especie (Tabla XVII), como una estimación de la diversidad alélica, se observó un valor medio de diversidad (0.46) para ballena gris. Sin embargo, para las ballenas de aleta, azul y franca, cuyos valores de diversidad son mayores (1.0, 0.67 y 0.63 respectivamente), el número de clonas secuenciadas es menor, lo cual pudiera estar sobreestimando la diversidad alélica. Por otro lado, al comparar las diversidades entre ballena gris y el delfín de río, donde el número de alelos y clonas es relativamente proporcional 1:2 (13:28 y 6:16, respectivamente), se observa que la diversidad para ballena gris es mayor, respecto a la del delfín de río (0.38).

**Tabla XVII. Aproximación de la diversidad alélica del *locus* DQB exón 2 *Mhc*-II.**

| <b>Especie</b>                                      | <b># Clonas</b> | <b># Alelos</b> | <b>Razón<br/>Alelos/Clonas</b> |
|-----------------------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|
| <b><i>Eschrichtius robustus</i></b>                 |                 |                 |                                |
| Ballena gris<br>(este trabajo)                      | 28              | 13              | 0.46                           |
| <b><i>Balaenoptera musculus</i></b>                 |                 |                 |                                |
| Ballena azul<br>(este trabajo)                      | 6               | 4               | 0.67                           |
| <b><i>Balaenoptera physalus</i></b>                 |                 |                 |                                |
| Ballena de aleta<br>(este trabajo)                  | 5               | 5               | 1                              |
| <b><i>Megaptera novaeangliae</i></b>                |                 |                 |                                |
| Ballena jorobada<br>(Baker <i>et al.</i> 2006)      | 10              | 3               | 0.3                            |
| <b><i>Eubalaena australis</i></b>                   |                 |                 |                                |
| Ballena franca<br>(Baker <i>et al.</i> 2006)        | 8               | 5               | 0.63                           |
| <b><i>Lipotes vexillifer</i></b>                    |                 |                 |                                |
| Delfin de río Baiji<br>(Yang <i>et al.</i> 2005)    | 16              | 6               | 0.38                           |
| <b><i>Eschrichtius robustus</i></b>                 |                 |                 |                                |
| exón 2 MHC-I                                        | 15              | 6               | 0.4                            |
| exón 3 MHC-I<br>(Flores-Ramírez <i>et al.</i> 2000) | 15              | 3               | 0.2                            |

### 6.3.2 Relaciones Filogenéticas

#### a) Análisis filogenético intra-específico de alelos DQB de ballena gris

Con la evidencia presentada de duplicación génica para el *locus* DQB exón 2 *Mhc-II* de ballena gris del Pacífico Nororiental, se realizó la reconstrucción filogenética a partir de los 13 alelos encontrados en un individuo (ver anexo 5 y 8), con la finalidad de observar la segregación de alelos en los *loci* para un solo individuo.

Para las 13 secuencias aisladas de DQB de un solo individuo, el mejor modelo de sustitución nucleotídica a partir de Modeltest, fue el General de Tiempo Reversible (GTR), con diferentes tasas de transición y transversiones (Ts/Tv), así como diferente frecuencia de las bases nucleotídicas. La proporción de Ts/Tv resultante fue de 0.5822, con una frecuencia de bases de A = 0.11278, C = 0.25898, G = 0.23183, T = 0.39641.

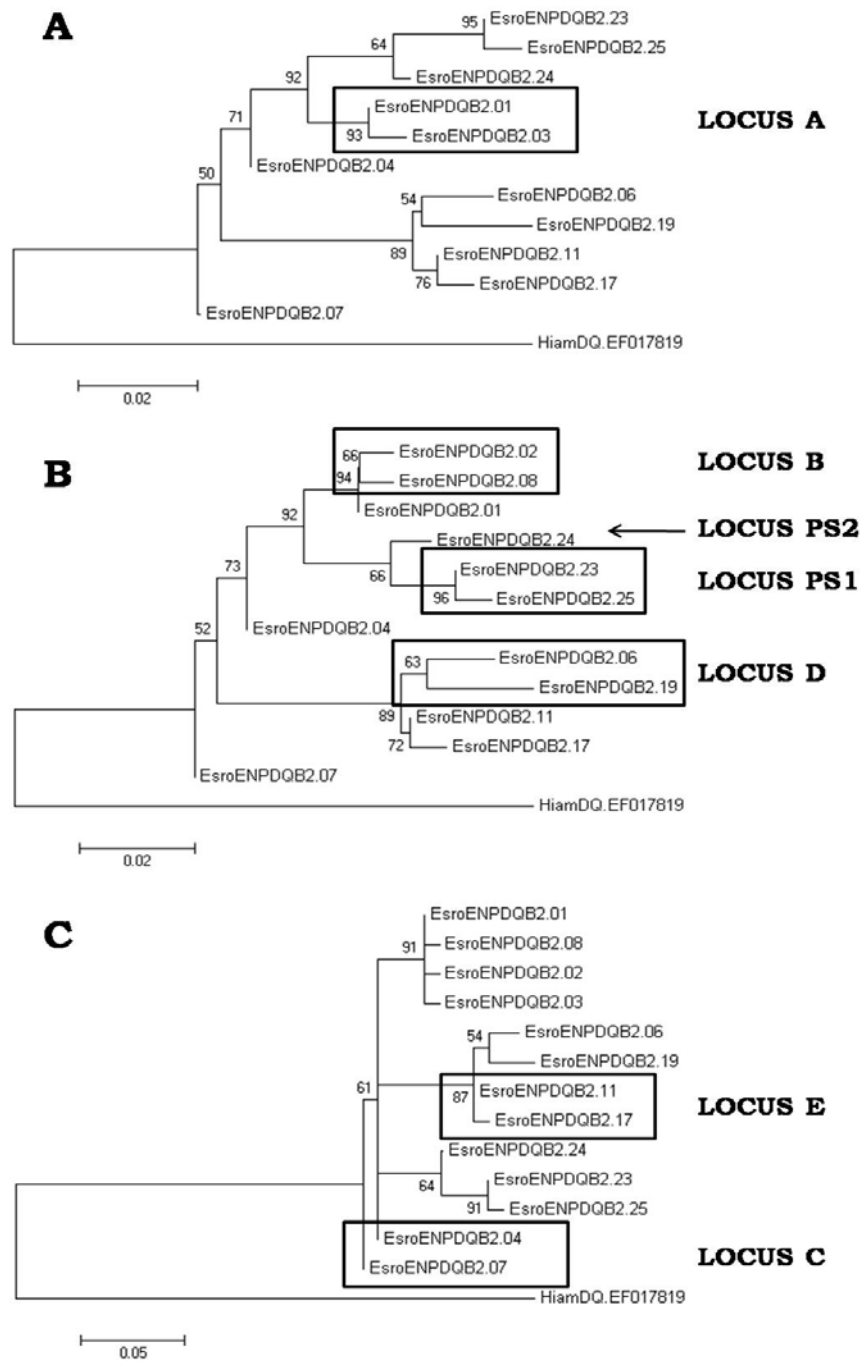
En la figura 11, se muestran los subárboles filogenéticos generados por NJ para la segregación de alelos DQB en los *loci* supuestos para un individuo. Como se puede observar, de los 13 alelos aislados, 12 quedaron pareados con valores altos de bootstrap, de la siguiente manera: alelos EsroENPDQB2.01 y 03 con 93% de sustento (LOCUS A; Figura 11A); alelos EsroENPDQB2.02 y 08 con 66% (LOCUS B; Figura 11B); alelos EsroENPDQB2.04 y 07 (LOCUS C; Figura 11C); alelos EsroENPDQB2.06 y 19 con 63% (LOCUS D; Figura 11B); alelos EsroENPDQB2.11 y 17 con 87% (LOCUS E; Figura 11C); y alelos EsroENPDQB2.23 y 25 con 96% (LOCUS PS1, pseudogenes; Figura

11B). El alelo EsroENPDQB2.24, con 64% quedo en un LOCUS PS2 (Figura 11A).

Una vez establecidos los *loci* para DQB exón 2, a partir de los 13 alelos aislados para un individuo, se realizaron las reconstrucciones filogenéticas con los 25 alelos DQB para ballena gris. El mejor modelo de sustitución nucleotídica a partir de Modeltest, fue el Modelo de Transversión más Distribución Gamma (TVM). La proporción de Ts/Tv resultante fue de 0.7310, con distribución gamma de variación entre sitios de 0.97435, y frecuencia de bases de A = 0.11269, C = 0.26226, G = 0.22874, T = 0.39631.

En la figura 12, se observa la segregación de todos los alelos DQB para ballena gris en su respectivo *locus*. El LOCUS C, quedo como grupo basal en la topología del árbol, e incluyó a los alelos EsroENPDQB2.05 y 09; los LOCUS A y B, así como los correspondientes a pseudogenes (LOCUS PS1 y PS2), no incluyeron más alelos en cada uno de ellos. Por su parte, los LOCUS E y D, resultaron ser los más polimórficos con cinco alelos más en cada *locus*. Aunado a lo anterior, el LOCUS E, incluyó al pseudogen EsroENPDQB2.21. Los árboles por MV resultaron similares, con topologías menos soportadas (resultados no se muestran).

Al analizar las tasas de sustitución sinónimas y no sinónimas para cada *locus* (ver tabla XV), se observó que los más polimórficos (LOCUS E y D), que también corresponden a los alelos más recientes evolutivamente (ver figura 12), mostraron tasas de sustitución no sinónima significativamente diferentes a las sinónimas dentro de la PBR. Por el contrario, en los LOCUS A, B y PS1, no se observaron tasas de sustitución no sinónima.



**Figura 11. Subárboles filogenéticos para la segregación de alelos DQB exón 2 *Mhc*-II en los loci supuestos para un solo individuo de ballena gris. Modelo de sustitución nucleotídica GTR, con proporción Ts/Tv de 0.5822. Se utilizó como grupo externo una secuencia de hipopótamo (*Hippopotamus amphibius*; no. acceso EF017819, Yang *et al.* 2006).**



**Figura 12. Reconstrucción filogenética por Neighbor – Joining de las secuencias aisladas de DQB exón 2 de ballena gris. Modelo de sustitución nucleotídica TVM, con distribución gamma de 0.97435, y una proporción  $T_s/T_v$  de 0.7310. Sobre las ramas se indican los valores de remuestreo (1,000 replicas) que las sustentan. Los \* indican los alelos correspondientes a un solo individuo. Se utilizó como grupo externo una secuencia de hipopótamo (*Hippopotamus amphibius*; HiamDQ, no. acceso EF017819, Yang *et al.* 2006).**

## **b) Análisis filogenético inter-específico de secuencias *Mhc*-II de mamíferos**

Para observar si la variación alélica DQB exón 2 de la ballena gris, sigue el mismo patrón de evolución trans-específico característico de este grupo de genes *Mhc*, o si dicha variación ha divergido lo suficiente para diferenciarse del resto de los mamíferos, se utilizaron 150 secuencias de DQB exón 2, DRB exón 2 y cDNA-DQB exón 2 depositadas en el banco de genes (Anexo 6). El *locus* DRB, pertenece a la clase *Mhc*-II, y es considerado como uno de los más polimórficos del complejo (ver Takahashi *et al.* 2000, Garrigan y Hedrick 2003); dada su cercanía con los *loci* DQ en el genoma nuclear (ver Takahashi *et al.* 2000), y debido a la problemática de carácter evolutivo (p.e. si hay recombinación interlocus o translocación entre *loci* *Mhc*-II; Takahashi *et al.* 2000), se tomó la decisión de incluir alelos DRB para considerar la posible similitud entre alelos DQB y DRB exón 2 de ballena gris.

Para el análisis filogenético inter-específico entre las secuencias aisladas de DQB exón 2 de ballena gris, y otras secuencias de distintas especies de mamíferos tanto terrestres como marinos, el mejor modelo de sustitución nucleotídica a partir de Modeltest, resultó en GTR + G (Modelo General de Tiempo Reversible más Distribución Gamma), con Distribución Gamma de variación entre sitios de 0.6144 y frecuencia de bases de A = 0.2035, C = 0.2477, G = 0.3968, T = 0.1520.

En la reconstrucción filogenética por NJ, se observó que los alelos de ballena gris, se segregaron independientemente, y se agruparon con pocas secuencias de DQB de otros mysticetos (*Balaenoptera physalus*, no. de acceso DQ300261, Nigenda-Morales *et*

*al.* 2008; *Balaena mysticetus* DQ354624, DQ354625; *Megaptera novaeangliae*, DQ354659, DQ354664; *Eubalaena australis*, DQ354631, DQ354634; Baker *et al.* 2006) (Figura 13). El resto de los alelos DQB de mysticetos se mezclaron con alelos de DRB (Clado DQB-DRB mysticetos).

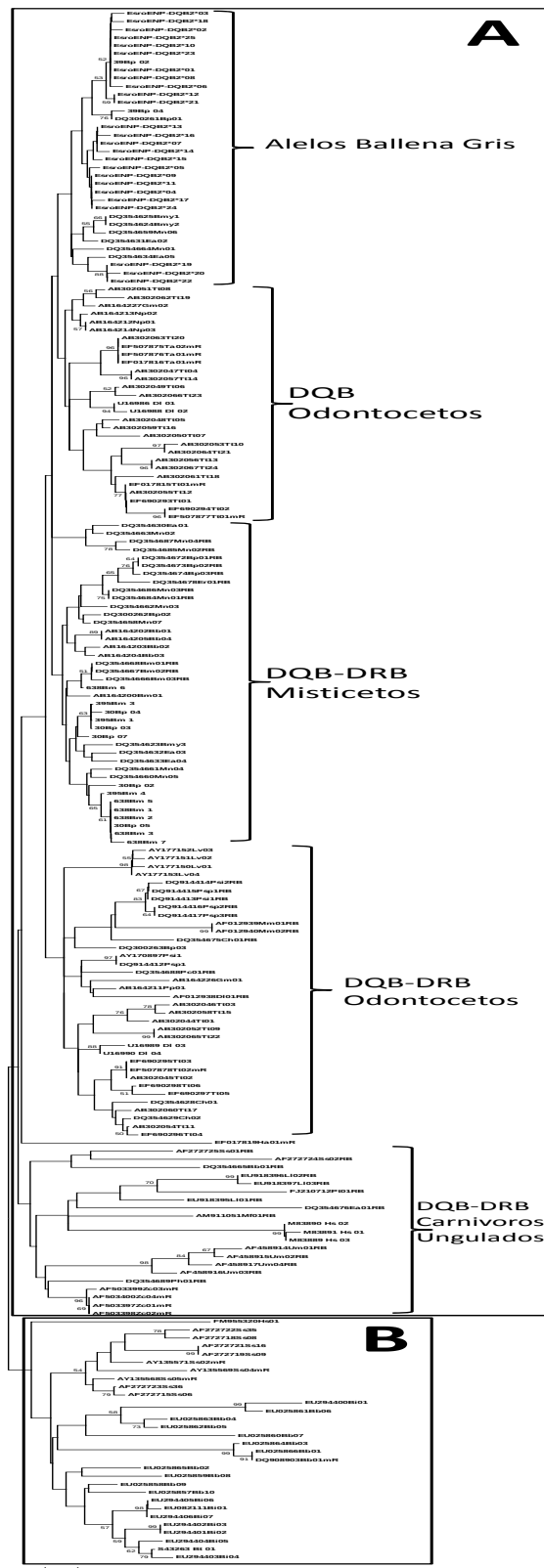
En el clado “DQB odontocetos”, se observó que la mayoría de los alelos agrupados, correspondieron a los del tursión (*Tursiops truncatus*, AB302047- AB302062, Kita *et al.* 2008; EF690293, EF690294, Yang *et al.* 2008). Por otro lado, en el clado “DQB-DRB odontocetos”, se observó que secuencias de DQB de *Lipotes vexillifer*, *Phocoena sinus*, *Phocoena spinipinnis*, *Globicephala macrorhynchus*, se mezclaron con secuencias de DRB de estas mismas especies. Solo un alelo de DQB de ballena de aleta se encontró en este clado (no. de acceso DQ300263, Nigenda-Morales *et al.* 2008).

En el clado “DQB-DRB carnívoros-ungulados”, se agruparon principalmente secuencias de DRB del cerdo (*Sus scrofa*), de bison (*Bison bison*), de pantera (*Panthera tigris*), de oso polar (*Ursus maritimus*), y del lobo marino de Nueva Zelanda (*Phocarctos hookeri*); además, se agrupó una secuencia DRB de mysticeto (*Eubalaena australis*, DQ354676, Baker *et al.* 2006), cuatro alelos DQB del *Homo sapiens* (nos. de acceso M83889 - M83891), y cuatro alelos cDNA-DQB del lobo marino de California (*Zalophus californianus*, AF503397 - AF503340, Bowen *et al.* 2002). En el clado “B”, que resultó en el grupo basal de la topología, se agruparon solo alelos de DQB de ungulados.

En general, se observó una mayor similitud entre secuencias de DQB para ballena gris, el tursión, y el grupo basal de los ungulados; sin

embargo, la mayoría de estos clados no están soportados por valores de bootstrap, o son valores muy bajos (>50%).

Adicionalmente, y con el objeto de corroborar la topología generada a partir de secuencias de DQB, DRB y cDNA-DQB2 de mamíferos, se generó otro árbol filogenético, pero solo con secuencias de DQB (Anexo 7). Esta topología, resultó similar a la Figura 13, agrupando en un clado a los alelos de gris, y quedando como grupo basal, solo secuencias correspondientes a ungulados.



**Figura 13. Reconstrucción filogenética de la historia evolutiva de secuencias *Mhc-II* de ballena gris y otros cetartiodáctilos. Modelo de sustitución nucleotídica GTR con Distribución Gamma (0.6144). Sobre las ramas se indican los valores de remuestreo (10,000 replicas) que las sustentan.**

#### **6.4 Segregación de alelos DQB por linajes mitocondriales de ballena gris**

Con la finalidad de observar si existe una segregación de alelos DQB exón 2, que pueda mostrar signos de estructura con respecto a los linajes maternos, es decir que allá alelos específicos a ciertos linajes, se asignó a cada alelo DQB de ballena gris, su haplotipo mitocondrial correspondiente (ver Anexo 8).

De manera gráfica (ver Figura 14), se puede observar, que alelos DQB muy cercanos filogenéticamente, por ejemplo alelos EsroENPDQB2\_10 y 18 (Figura 14A), pertenecen a individuos con haplotipos hB y hG respectivamente, los cuales son muy distintos genéticamente (ver distribución espacial de los haplotipos en Figura 14B); de igual manera, alelos EsroENPDQB2\_12 y 21, muy cercanos, corresponden a haplotipos muy distintos (hAD y hL respectivamente). Por otro lado, alelos EsroENPDQB2\_20 y 8, muy diferentes genéticamente (Figura 14A), y provenientes de individuos diferentes (ver anexo 8), corresponden al mismo haplotipo mitocondrial (hA). Lo anterior sugiere que no existe una segregación específica de los alelos DQB respecto a los linajes maternos de ballena gris.



## **7. DISCUSIÓN**

### **7.1 Identificación Molecular del Sexo**

#### **Proporción de Sexos**

Al igual que en este trabajo, en estudios previos se ha observado que dentro de las lagunas de crianza existe una mayor proporción de hembras que de machos. Por ejemplo, Alter *et al.* (2009), analizando 105 individuos de ballena gris, encontraron mayor número de hembras para cada una de las principales lagunas (Laguna San Ignacio, Ojo de Liebre y Bahía Magdalena), observando una proporción total de hembras respecto a machos de 2.75, valor muy similar al obtenido en este trabajo (2.6). Por el contrario, estudios realizados con individuos fuera de estas áreas de reproducción (p.e. Steeves *et al.* 2001, Lang *et al.* 2010), han encontrado mayor proporción de machos respecto a hembras; sin embargo, no se ha observado diferencias significativas a nivel mitocondrial, entre las hembras fuera y dentro de las lagunas de crianza (Alter *et al.* 2009).

El hecho de observar mayor proporción de hembras dentro de las lagunas de crianza, es una característica de su filopatría reproductiva, que se ha corroborado a diferentes niveles de estudio. Como parte de su comportamiento reproductivo, la ballena gris migra hacia el sur para aparearse y tener a sus crías; se ha observado que la mayoría de los apareamientos ocurren dentro o cerca de la boca de las lagunas de Baja California Sur, mientras que todas las madres con cría, permanecen dentro de ellas (Rice *et al.* 1984). Mediante conteos, y a través de foto-identificación, se ha documentado que los mayores tiempos de

residencia dentro de las lagunas de crianza, lo presentan las madres con cría y hembras solitarias (ver Urbán *et al.* 2003). Desde un punto de vista genético, se ha observado valores significativos de diferenciación genética ( $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$ ) a nivel del ADN mitocondrial, entre hembras y el resto de los individuos dentro de la laguna, y entre hembras dentro y fuera de la laguna (ver Goerlitz *et al.* 2003); estos resultados, han permitido inferir que las hembras exhiben fidelidad al sitio de nacimiento aun en años de no cría.

Por otro lado, la proporción de hembras respecto a machos en las diferentes lagunas de crianza, ha cambiado en los últimos años. Por ejemplo, para Laguna San Ignacio, Goerlitz *et al.* (2003), analizando 66 individuos (53 hembras y 13 machos) para las temporadas de 1996 y 1997, obtuvieron una proporción de 4.08 hembras por cada macho; en este trabajo, se obtuvo una proporción de 3.14 (22 hembras y siete machos) para las temporadas de 1997, 1998, 1999 y 2000 (ver anexo 1); por su parte, Alter *et al.* (2009), analizando 53 individuos para las temporadas de 2001, 2002 y 2005, obtuvieron una proporción de 1.94 (35 hembras y 18 machos). Para Laguna Ojo de Liebre, Goerlitz *et al.* (2003), observaron una proporción de 3.67 hembras por macho durante la temporada de 1997 (11 hembras y 3 machos); por su parte, Alter *et al.* (2009), encontraron una proporción de 2.33 (14 hembras y 6 machos) para las temporadas 2001, 2002 y 2005, en tanto que en este trabajo, para la temporada 2007 se obtuvo una proporción de 1.23 (16 hembras y 13 machos).

Aparentemente, tanto para Laguna San Ignacio, como para Ojo de Liebre, el número de machos ha ido aumentando en los últimos diez años. En particular para Laguna Ojo de Liebre, entre 1980 y 1997 se

observó un incremento del ~10% en la presencia de madres con cría, porcentaje que también corresponde al incremento poblacional para esos años (ver Alter *et al.* 2009). Así mismo, se ha observado que hoy en día más ballenas usan Laguna Ojo de Liebre (Alter *et al.* 2009), probablemente por ser la más norteña de las principales lagunas de reproducción.

Por otro lado, para Bahía Magdalena, en este trabajo se utilizaron las mismas muestras que Alter *et al.* (2009) utilizaron en su estudio. Este último, representa el primer trabajo donde se analiza la variación genética en individuos de esa laguna. De los 32 individuos analizados, 27 fueron hembras y cinco machos (este trabajo), en tanto que Alter *et al.* (2009), identificaron 28 hembras y cuatro machos. En esta laguna, se observó una proporción mayor de hembras que para las otras lagunas de crianza en sus diferentes temporadas; inclusive, esta laguna muestra un bajo nivel pero significativo de diferenciación genotípica entre Bahía Magdalena y Laguna San Ignacio (ver Alter *et al.* 2009). Una de las explicaciones más plausibles, es un escenario, donde las ballenas exhiben una absoluta fidelidad a ese sitio natal, que probablemente continuó, aun durante el periodo de cacería, y posteriormente cuando la caza cesó (Alter *et al.* 2009). Otra explicación, podría ser un uso de la laguna casi exclusivo de las hembras preñadas o madres con cría, debido a la lejanía (ya que es la más sureña) respecto a las otras dos lagunas, haciendo que los machos entren a las lagunas más norteñas, reduciendo el gasto energético por parte de los individuos durante la migración.

## 7.2 Análisis de la Diversidad de la Región Control del ADNmit

### 7.2.1 Diversidad Genética

El número de individuos analizados (93), así como el número de haplotipos encontrados en este trabajo (30 haplotipos), fueron similares a los publicados anteriormente para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental; Steeves *et al.* (2001), LeDuc *et al.* (2002) y Goertliz *et al.* (2003), analizaron 57, 120 y 83 secuencias individuales, encontrando 24, 33 y 28 haplotipos respectivamente.

De la misma forma, los valores de diversidad genética encontrados en este estudio, son muy similares a los obtenidos previamente para la esta población ( $h = 94\%$ ,  $\pi = 1.7\%$ , Steeves *et al.* 2001;  $h = 95\%$ ,  $\pi = 1.6\%$ , LeDuc *et al.* 2002;  $h = 95\%$ ,  $\pi = 2\%$ , Goertliz *et al.* 2003;  $h = 93\%$ ,  $\pi = 1.94\%$ , Del Toro-Muñoz 2006).

Los valores de diversidad genética para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, son relativamente altos comparados con otras poblaciones de ballenas que fueron intensamente cazadas. Por ejemplo, para la población de gris del Pacífico Noroccidental, la cual no ha mostrado signos de recuperación después del periodo de cacería (ver Weller *et al.* 2002), los valores de diversidad son bajos ( $h = 70\%$ ,  $\pi = 1.7\%$ , LeDuc *et al.* 2002); de la misma forma, para la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) del Pacífico Nororiental, los valores son bajos ( $h = 79\%$ ,  $\pi = 0.6\%$ , Enríquez-Paredes 2005). Por el contrario, para *Eubalaena australis* (ver Jackson *et al.* 2008), la cual parece haber recuperado niveles de abundancia, se obtuvo una diversidad total de  $h =$

92% y  $\pi = 7.3\%$ , donde la diversidad nucleotídica es superior comparada con la población de ballena de gris de este trabajo (1.7%).

Los niveles de diversidad genética relativamente altos para esta población, han permitido sugerir (p.e. Goertliz *et al.* 2003), que pese a la cacería comercial bajo la cual estuvo sujeta, y haber disminuido considerablemente el número de individuos en la población, ésta no fue lo suficientemente severa o duradera para verse reflejado en una reducción en dicha diversidad. Los resultados generados de las simulaciones demográficas para el modelo genético corregido (ver más adelante), revelaron que durante el aparente cuello de botella, la abundancia de la población no fue tan bajo como lo reportado por Reeves y Mitchell (2006;  $\approx 2,500$  individuos); esto apoyaría la hipótesis de que la cacería no fue tan severa, ni lo suficiente para disminuir la diversidad genética.

### **7.2.2 Estructura Genética**

El análisis de estructura poblacional entre lagunas (ver Tabla IV), indicó que no existe estructura dentro de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental ( $F_{ST} = -0.00541$   $p = 0.77861$ ;  $\Phi_{ST} = -0.00846$   $p = 0.68782$ ). La ausencia de estructura genética a nivel mitocondrial en esta población de ballena gris, se ha reportado por otros autores. Steeves *et al.* (2001), encontraron que no hay subdivisión genética ( $\Phi = -0.007$ ,  $p > 0.51$ ) entre un grupo de individuos residentes de Clayoquot Sound, British Columbia (sitio de alimentación), y el resto de la población de la ballena gris; Goerlitz *et al.* (2003), observaron que para las lagunas San Ignacio y Ojo de Liebre, aunque hay diferencias

significativas entre las hembras y el resto de los individuos en cada laguna (sugiriendo filopatría al sitio), no hay diferenciación genética entre estas lagunas ( $F_{ST} = 0.03$ ,  $p = 0.08$ ;  $\Phi_{ST} = 0.013$ ,  $p = 0.27$ ). En otro estudio, Del Toro-Muñoz (2006), realizó dos análisis de estructura genética (utilizando ADN mit y cinco microsatélites) entre las lagunas San Ignacio, Ojo de Liebre y Bahía Magdalena, encontrando valores no significativos tanto para los índices de fijación a nivel de ADN mitocondrial ( $F_{ST} = 0.002$ ,  $p = 0.59$ ;  $\Phi_{ST} = 0.002$ ,  $p = 0.34$ ), como para los índices a nivel microsatelital ( $F_{ST} = 0.000$ ,  $p = 0.49$ ;  $R_{ST} = 0.009$ ,  $p = 0.25$ ). Estos resultados sugieren que el comportamiento filopátrico no ha tenido un efecto que pueda ser detectable sobre la estructura genética de la población, probablemente debido a que existe un alto grado de intercambio genético por parte de los machos, o porque no ha pasado suficiente tiempo para generar tales diferencias.

Sin embargo, más recientemente Alter *et al.* (2009), utilizando también información genética de la región control del ADNmit y nueve microsatélites, sugirieron que aunque existen altas tasas de migración entre las tres lagunas de reproducción, el hecho de haber observado una desviación, pequeña pero significativa (mediante la prueba exacta de diferenciación alélica y genotípica), de panmixia entre Bahía Magdalena y Laguna San Ignacio, y el hecho de haber encontrado evidencia de un severo cuello de botella poblacional a nivel de microsatélites, significa que la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, se encuentra aun recuperándose de los impactos de la cacería en las lagunas de reproducción, y que esta población debe ser protegida y monitoreada por futuros cambios genéticos.

Aunque la ballena gris muestra una alta fidelidad a los sitios de nacimiento, la observable estructura genética entre las diferentes lagunas, refleja las consecuencias ecológicas y genéticas de la cacería (Alter *et al.* 2009). Basados en los registros históricos, un gran número de ballenas fueron cazadas en Bahía Magdalena, la cual fue más intensamente cazada, y por un periodo de tiempo mayor que para las otras dos lagunas (ver Alter *et al.* 2009); lo anterior, podría ser una explicación del grado de diferenciación genética encontrado para Bahía Magdalena.

### **7.2.3 Relaciones Filogenéticas**

Debido a sus características, alta tasa de mutación, no recombinación, y herencia matrilineal, el ADNmit se ha vuelto uno de los marcadores más utilizados para análisis filogeográficos a nivel intraespecífico, donde las relaciones evolutivas entre matrilineas son estudiadas en un contexto geográfico. Pese a que el ADNmit representa solo una parte del genoma (aproximadamente 0.5%), y puede no reflejar el total de las relaciones filogenéticas del taxa, bajo un soporte estadístico, la genealogía del árbol puede ser evidencia de la orientación geográfica, a manera que concuerde con la biogeografía o eventos históricos de la población; al mismo tiempo, puede ser una evidencia independiente de la estructura poblacional (p.e. debido a la fragmentación del hábitat), de la expansión de distribución de las especies y poblaciones, eventos de migración, y extinción de linajes genéticos (p.e. debido a la cacería), aspectos de gran importancia para la biología de la conservación (Aulsebrook 1995; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009).

Para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, el único trabajo previo que cuenta con un análisis filogenético utilizando ADNmit, es el publicado por Steeves *et al.* (2001). Estos autores encontraron al menos cinco linajes mitocondriales soportados con valores de bootstrap superiores al 50%, de los cuales uno de ellos contenía haplotipos exclusivamente de la población residente de British Columbia (sitio de alimentación), mientras que otro linaje comprendía haplotipos de individuos no residentes de dicho sitio. Sin embargo, no observaron evidencia de estructura poblacional, a nivel de grupos residentes y no residentes.

En este trabajo se reconstruyó la filogenia mediante tres aproximaciones distintas para la población de ballena gris (ver Figuras 3, 4 y 5). Se observaron al menos tres clados consistentes con valores altos de sustento mayores al 50%, sugiriendo al menos tres linajes principales, a partir de los cuales derivan el resto de los haplotipos; también, se observaron algunas politomías en las tres topologías. Cabe mencionar, que estas topologías presentan valores más altos de sustento en sus ramas, que la filogenia reportada por Steeves *et al.* (2001), además de que en estos análisis se incluye mayor número de haplotipos.

De los linajes observados, ninguno fue exclusivo de alguna de las lagunas de crianza. Los alelos más frecuentes están distribuidos homogéneamente en la población (ver MSN figura 7), y presentes en ambas poblaciones del Pacífico Norte (ver LeDuc *et al.* 2002); además, no hay signos de estructura poblacional, por lo que se podría inferir, que históricamente los haplotipos encontrados en la población actual, han

mantenido la misma distribución tanto a nivel poblacional, como a nivel filogeográfico.

Por otro lado, la presencia de politomías en las topologías, puede ser una evidencia de la ausencia o pérdida de ciertos haplotipos. Sin embargo, pese a la reducción poblacional debido a la cacería, esta disminución no fue la suficiente, como para afectar la diversidad haplotípica, y mostrar signos de estructura poblacional a nivel del análisis filogeográfico.

Otra característica importante, que ha sido reportada en trabajos previos (ver Steeves *et al.* 2001, LeDuc *et al.* 2002), es la posición basal del haplotipo hB en la topología del árbol (ver Figura 5; haplotipo h24, Steeves *et al.* 2001; haplotipo B, LeDuc *et al.* 2002), el cual a su vez resultó ser el más distante y antiguo (debido a la longitud de su rama, ver Figura 3), de todos los haplotipos maternos encontrados para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental. Estas características permiten inferir, que este haplotipo, puede ser un remanente de la población extinta del Atlántico Norte; no solo debido al número de diferencias respecto a todos los haplotipos, o a su distancia genética o posición basal observada en las topologías, sino porque además, es de los más abundantes en ambas poblaciones de ballena gris del Pacífico Norte (Noroccidental y Nororiental; ver LeDuc *et al.* 2002).

Por último, en este trabajo se encontro a un individuo macho que presenta el haplotipo J; haplotipo reportado como exclusivo para la población Asiática (ver LeDuc *et al.* 2002). En la población del Pacífico Nororiental, al igual que para la población Asiática (LeDuc *et al.* 2002), éste haplotipo puede considerarse como antiguo (ver Filogenia, Figura

3), y raro (frecuencia de 1). Sin embargo, este haplotipo presenta pocas diferencias respecto a uno de los más comunes, que es el haplotipo hA (ver MSN, Figura 7). Esto podría estar indicando una posible migración de machos entre ambas poblaciones; la cual es aparentemente mínima, o no lo suficientemente reciente, debido a que actualmente estas poblaciones se encuentran genéticamente diferenciadas (ver LeDuc *et al.* 2002, Lang *et al.* 2010).

#### **7.2.4 Historia Demográfica**

Es bien conocido que los cambios históricos en el tamaño poblacional, pueden tener efectos en los patrones de variación genética en una población. El método más frecuentemente utilizado para inferir el pasado poblacional bajo el modelo de expansión repentina, es la distribución de diferencias pareadas (Mismatch Distribution). Así mismo, la recuperación después del cuello de botella poblacional (p.e. debido a la cacería o a la invasión de un nuevo hábitat), toma un gran número de generaciones (Bjorklund 2003).

Existen dos principales elementos dependientes, componentes de la variación genética, que evidencian un cuello de botella poblacional: en primer lugar, si el muestreo es aleatorio con respecto a los haplotipos (asumiendo ADNmit), en la población remanente, que representa una muestra de la población original, muchos haplotipos se han perdido, principalmente aquellos presentes en baja frecuencia; en segundo lugar, si los individuos varían en los sucesos reproductivos (lo cual es de esperarse debido al cuello de botella), y si la variación es aleatoria respecto a los haplotipos, algunos haplotipos se volverían sobre

representados (es decir altas frecuencias de pocos haplotipos) en las futuras generaciones (Bjorklund 2003).

En el análisis de la distribución de diferencias pareadas, para las lagunas de crianza y el total de la población (ver figura 6), y los descriptores demográficos para el modelo de expansión repentina, no detectaron un cuello de botella poblacional. En primer lugar, no hay evidencia de una drástica reducción del número de haplotipos, puesto que se observa una sola moda en la distribución de diferencias pareadas, y además, la diversidad haplotípica es alta (ver tabla III), comparada con otras especies de cetáceos que estuvieron sujetas a una cacería intensa; en segundo lugar, no se observaron altas frecuencias de pocos haplotipos, y se encontraron ocho individuos con alelos raros. Para este último punto, la red de mínima separación (figura 7), muestra una distribución espacial homogénea de los haplotipos en la población; la mayoría de los haplotipos están unidos a los más comunes por conexiones cortas, lo cual hace referencia a una expansión demográfica sin signos de reducción drástica en los haplotipos; además, no se observaron signos de estructura poblacional (ver tabla IV), que pudiera evidenciar una segregación de haplotipos en la población, debido a la deriva genética actuando sobre la población remanente en recuperación después de un cuello de botella (Bjorklund 2003).

Otro parámetro poblacional que puede ser influenciado por la demografía histórica de una población, es el estadístico  $D'$ Tajima (p.e. Innan y Stephan 2000, Schimdt y Pool 2002). La prueba  $D'$ Tajima se basa en la diferencia entre dos estimaciones de la cantidad de variación genética: la primera estimación se obtiene a partir del número de sitios segregantes (Watterson 1975), mientras que la segunda, se basa en el

número promedio de diferencias pareadas. Comunmente, esta prueba ha sido ampliamente utilizada para inferir la acción de la selección y/o la neutralidad, bajo la hipótesis nula de evolución neutral en una población en equilibrio (Tajima 1989). Bajo este supuesto, en ausencia de recombinación de un *locus* neutral (p.e Región control del ADNmit), los valores de la prueba D'Tajima, reflejarían solo efectos de los cambios en el tamaño poblacional (Schimdt y Pool 2002); así, poblaciones en crecimiento poblacional o cuellos de botella menos recientes, los valores de la prueba D'Tajima tenderán a ser negativos, en tanto que poblaciones en decremento, o con signos de subdivisión o cuello de botella recientes, mostraran valores D'Tajima positivos (ver Innan y Stephan 2000, Schimdt y Pool 2002). Sin embargo, si el *locus* esta siendo sujeto a selección balanceadora, se generarían valores D'Tajima positivos; en cambio, valores D'Tajima negativos estarían detectando selección purificadora (Innan y Stephan 2000).

Los valores generados de la prueba D'Tajima para las lagunas de crianza y el total de la población, resultaron muy diferentes entre sí, y contradictorios a los reportados por Alter *et al.* (2009). Por ejemplo, para Laguna San Ignacio, se obtuvo un valor negativo (-0.003, este trabajo), y uno positivo (0.299, Alter *et al.* 2009); de igual manera, para Laguna Ojo de Liebre se obtuvieron valores opuestos (0.531 este trabajo, y -0.35 Alter *et al.* 2009); para Bahía Magdalena, pese a que se utilizaron las mismas muestras en ambos trabajos, se obtuvieron resultados diferentes (-0.098 este trabajo, y 0.048 Alter *et al.* 2009). Por otro lado, el valor generado para el total de la población, fue de 0.668, similiar al obtenido por Alter *et al.* (2009), de 0.782. Este último, es consistente, y reflejaría una población con cuello de botella reciente. Sin embargo, los

valores obtenidos para dicha prueba en este trabajo y el de Alter *et al.* (2009), fueron no significativos.

Por su parte, los resultados generados por la distribución de diferencias pareadas, evidencian que la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, se encuentra en una fase de expansión poblacional sin signos de un cuello de botella severo (Bjorklund 2003).

#### **7.2.5 Estimación del Tamaño Histórico**

Aspectos demográficos como un cuello de botella poblacional, pueden remover los efectos del equilibrio del tamaño poblacional sobre la diversidad genética (Bazin *et al.* 2006). Sin embargo, la pérdida de diversidad genética no es tan acelerada como la reducción en la abundancia, por lo que sería posible estimar el número de individuos que expliquen los niveles actuales de diversidad genética. El modelo genético corregido utilizado en este trabajo, a diferencia del modelo tradicional (ver Roman y Palumbi 2003), considera información referente a la historia demográfica de las poblaciones. Al usar tiempos de divergencia intraespecíficos en el cálculo de las tasas de sustitución, el modelo ajusta los tiempos de coalescencia al ancestro común de los miembros de una especie o población, y no a los tiempos de coalescencia entre diferentes especies. Las tasas de sustitución nucleotídica están estrechamente asociados con el metabolismo, los tiempos generacionales y la demografía histórica de cada especie, por lo tanto parece más adecuado emplear tasas intraespecíficas basadas en la reconstrucción filogenética de los haplotipos que conforman las poblaciones (ver Enríquez-Paredes 2005).

Al comparar las estimaciones de los tamaños históricos obtenidas para la misma población por Alter *et al.* (2007), se obtuvieron en promedio un total de 34,410 individuos para el número efectivo de la población (31,175 – 38,084, 95% IC), y 96,400 individuos para la población total histórica; valor cuatro veces mayor al obtenido por el modelo corregido (ver Tabla VI), y por las estimaciones a partir de modelos no genéticos (ver Tabla VIII).

La estimación del tamaño poblacional histórico a través de las correcciones al modelo genético tradicional, generó valores mucho más congruentes con la demografía histórica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental. El modelo corregido se ajustó a la estimación de abundancia actual para esta población (ver tabla VIII; 20,110 individuos Rugh *et al.* 2008); por el contrario, el modelo tradicional sugiere que podrían haber existido más de 151,000 ballenas grises en el Pacífico Nororiental. Así, si en la actualidad, los niveles de abundancia de esta población son similares, a los que había previo al periodo de caza, las estimaciones obtenidas en este trabajo indicarían, que la abundancia actual en la población del Pacífico Nororiental, representa aproximadamente el 80% del stock original.

Pese a que el número de individuos estimado a través del modelo corregido aparentemente ofrece una mejor aproximación al tamaño histórico, es importante considerar las limitaciones del mismo (ver Enríquez-Paredes 2005). Por ejemplo, el cálculo de los tiempos de divergencia, de las tasas de sustitución nucleotídica, y de los componentes poblacionales, como proporción de sexos, número de individuos jóvenes respecto a adultos, y tasas de crecimiento, están

fundamentados en poca información y con ciertos niveles de incertidumbre. Sin embargo, la población de ballena gris, presenta la mayor serie de tiempo de registros de capturas, foto-identificación, y de niveles de recuperación mediante censos (Baker y Clapham 2004), por lo que estimaciones sobre los componentes poblacionales arriba mencionados, y otros parámetros reproductivos, pueden realizarse disminuyendo enormemente los niveles de incertidumbre.

Por otro lado, en cuanto a la incertidumbre producto de las tasas de sustitución, Enriquez-Paredes (2005) menciona que este problema pudiera ser solventado al emplear otros genes y evaluar los resultados generados para estimar el tamaño histórico poblacional. Para esta población, Alter *et al.* (2007) realizaron un estudio para estimar el tamaño histórico poblacional, mediante el uso de diez *loci*. Sus resultados evidenciaron una gran discrepancia y de igual magnitud, como para la estimación obtenida por el modelo tradicional (ver tabla XV y XVII). Algunos autores sugieren que las variaciones en la tasas de mutación entre los diferentes taxa animales, puede ser la explicación de la discrepancia entre la diversidad genética y el tamaño efectivo poblacional (ver Roman y Palumbi 2003, Bazin *et al.* 2006, Alter *et al.* 2007, Nabholz *et al.* 2008). Cada especie y cada una de sus poblaciones se establecieron en un tiempo y espacio particulares, por lo que en función del número y la variedad de linajes presentes, cada población acumulará variación genética neutral a diferentes tasas (Enríquez-Paredes 2005); de aquí la importancia de considerar las tasas de sustitución a nivel intraespecífico.

En particular para mamíferos, Nabholz *et al.* (2008) encontraron una correlación positiva entre la diversidad genética del ADNmit y el

nivel taxonómico, sugiriendo que la tasa de mutación varía dependiente del grupo taxonómico, y que debe ser considerada a nivel linaje-específico; y, aunque la tasa de mutación es usualmente desconocida, ésta puede ser estimada a partir de las tasas de sustitución linaje-específica, ya que bajo neutralidad, estas dos son proporcionales (ver Nabholz *et al.* 2008). Por otro lado, se ha observado que la tasa de mutación influye en la velocidad en que el polimorfismo es recuperado, después de una repentina pérdida de variabilidad, debido por ejemplo, a un cuello de botella poblacional (Nai y Graur 1984, citado en Nabholz *et al.* 2008); lo anterior, resalta la importancia de considerar la tasa de mutación a nivel intraespecífico, tal y como se propone en el modelo genético modificado, y más aun, en poblaciones que fueron afectadas por la cacería comercial.

Otra limitante para los modelos genéticos y demográficos, resulta de la dificultad para establecer los límites de las poblaciones (Enríquez-Paredes 2005). Tanto el modelo tradicional como el corregido, suponen una población cerrada, en donde los efectos de la inmigración y la dispersión son mínimos. Aunque para algunas poblaciones resulta difícil el establecer límites a las poblaciones naturales, la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, puede considerarse una población cerrada, puesto que el flujo genético entre la población asiática y americana, es prácticamente nulo (con niveles de significancia muy bajos; ver LeDuc *et al.* 2002; Lang *et al.* 2010).

#### **7.2.6 Simulación de Tendencias Demográficas:**

##### **Comparación de las Estimaciones de Abundancia Histórica entre Modelos Genéticos y No Genéticos**

Reconstruir la trayectoria histórica de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, es importante para entender la dinámica de la población, y para el futuro manejo de la cacería para la población (Witting 2003). Distintos modelos se han utilizado para generar dicha trayectoria (p.e. Butterworth *et al.* 2002); sin embargo ninguno de ellos reconcilia el registro de capturas y los datos de abundancias. Por el contrario, las simulaciones históricas generadas a partir del modelo de crecimiento logístico poblacional, que la IWC utiliza para poblaciones de ballenas que fueron cazadas, genera tendencias que coinciden con la historia de capturas y los censos demográficos (ver Baker y Clapham 2004).

Las trayectorias demográficas utilizando el modelo logístico de la IWC (ver figuras 13 y 14), generadas a partir de las estimaciones del tamaño histórico poblacional del modelo genético corregido, y los modelos Solver y ADMB (ver tabla XVII), coinciden con los registros de captura históricos, y los niveles de abundancia más actuales (ver Rugh *et al.* 2008). Aunado a esto, Witting (2003), propone un modelo alternativo inercial de dinámica poblacional para simular la trayectoria demográfica para esta población. Sus resultados, también son congruentes con los generados en este trabajo. Por ejemplo, para el año en que la cacería comercial comenzó (1846), bajo el modelo inercial, la abundancia poblacional sería de 15,200 individuos (13,600-18,900 individuos al 95% IC); para el modelo genético corregido, la abundancia para esa fecha resultó ser de 17,300 individuos, en tanto que para

Solver y el ADMB, resultaron en 12,601 y 15,103 individuos respectivamente. Por otro lado, para el año en que la población se vio en supuesto peligro de extinción (1880), bajo el modelo inercial, se obtuvo una abundancia de aproximadamente 5,000 individuos, en tanto que para el modelo genético corregido, Solver y el ADMB, se obtuvieron abundancias de 12,730, 5,682 y 10,368 individuos respectivamente. Así, el modelo inercial de dinámica poblacional (ver Witting 2003), representa una evidencia más que soporta los resultados obtenidos a partir del modelo genético corregido.

Aunque el modelo corregido arrojará valores muy cercanos a las estimaciones demográficas del tamaño histórico para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, es importante considerar las implicaciones que esto conlleva. De acuerdo con el número de individuos estimado a través del modelo corregido, que además es soportado por los modelos no genéticos Solver y ADMB, esta población se encuentra por arriba del 80% de su tamaño original. Esto indicaría que esta población podría soportar una captura moderada, y al mismo tiempo considerarla para la reapertura de la caza comercial, la cual tendría que estar regulada cuidadosamente.

Por otro lado, se tiene registrado que para 1998-2002 hubo un declive poblacional; sin embargo, este declive no fue observado en ninguna de las trayectorias generadas en este trabajo. Una de las explicaciones, es que se cree que la población de ballena gris presenta una dinámica cíclica poblacional (Witting 2003), que puede estar mayormente influenciada por eventos oceanográficos; los cuales son aspectos que estos métodos no incluyen en sus modelos. Nabholz *et al.* (2008), analizaron un gran número de especies de mamíferos, y

sugirieron que la variación estocástica en el tamaño efectivo poblacional, es probablemente un proceso general de la dinámica de las especies de mamíferos, suficientemente fuerte para remover cualquier efecto de la abundancia sobre la diversidad del ADNmit; por lo que cambios en la abundancia debido a procesos climáticos, no dejarían señal en la diversidad genética.

Por otra parte, se ha observado que fluctuaciones en la distribución y el tamaño poblacional, son causados por cambios en el clima global, principalmente durante los últimos 3 millones de años (ma), que han dejado una reciente era de hielo del Cuaternario (2.4 ma al presente; Hewitt 2000). Por ejemplo, la historia de las especies o poblaciones que se distribuyen en la zona del Ártico (p.e. la beluga *Delphinapterus leucas*, O'Corry-Crowe *et al.* 2010), ha sido moldeada en gran parte por los cambios ambientales asociados con las oscilaciones climáticas del Cuaternario; periodos sucesivos fríos y cálidos han determinado la localidad y el tamaño de las poblaciones, las rutas de la expansión postglacial, así como el tiempo y la secuencia de la divergencia poblacional (ver Hewitt 2000, Hewitt 2004, O'Corry-Crowe *et al.* 2010). Además, se ha observado que la región de Norte América es la principal región que difiere en geografía, clima, y por consiguiente en la historia de las especies y patrón genómico (Hewitt 2000).

Para ballena gris, Perryman *et al.* (2002), modelaron fluctuaciones decadales (p.e. Oscilación Decadal del Pacífico), y anuales (p.e. El Niño), con el declive en la producción de crías entre 1993-2001. Observaron que la variabilidad en la producción de crías, parece estar relacionada con las diferencias interanuales en la distribución espacio-temporal del hielo. Para esa época, la extensión del hielo permaneció más de la

primera mitad de la temporada de alimentación, disminuyendo la disponibilidad de alimento. La disponibilidad de alimento, y la condición nutritiva, están ligadas tanto a la tasa de ovulación, como a la tasa de embarazos de hembras adultas; por tanto, al no haber suficiente alimento, la producción de crías se verá mermada (ver Perryman *et al.* 2002).

Aunque es evidente que la cacería comercial afectó tanto la distribución (población del Atlántico extinta), como la abundancia (población Asiática no recuperada y actualmente en peligro) de la ballena gris, los factores climáticos y oceanográficos son aspectos que influyen sobre los patrones de variación de todas las poblaciones naturales. Para la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, estos factores parecen tener mayor influencia sobre los niveles de abundancia, que la cacería comercial aun cuando estuvo en su apogeo. A nivel genético del ADNmit, no hay signos de un cuello de botella severo que pudiera haber sido consecuencia de la cacería desmedida; los niveles de diversidad son altos, y aparentemente la población representa la mayor parte de los haplotipos ancestrales; además, la población ha recuperado los niveles de abundancia previos al periodo de caza, y aunque aparentemente se encuentra en una fase de expansión, ésta puede ser consecuencia del cambio climático y disponibilidad de recursos, más que la respuesta a una reducción poblacional debido a la cacería.

### 7.3 Análisis de la Diversidad del *locus* DQB exón 2 *Mhc-II*

#### Consideraciones Metodológicas

Inicialmente, el proyecto comprendía objetivos que planteaban el análisis de la demografía histórica a partir de la diversidad neutral de la región control del ADNmit, y la diversidad adaptativa a nivel del *Mhc-II*. Sin embargo, debido a problemas desde el punto de vista metodológico, no se pudieron hacer inferencias sobre la diversidad adaptativa real.

La diversidad adaptativa real, debería comprender estimaciones de la diversidad alélica para el total de la población de ballena gris, así como de la proporción de homocigotos:heterocigotos para el *locus* DQB exón 2 *Mhc-II*. Debido al problema de duplicación del *locus* DQB exón 2 en ballena gris, evidenciado por el análisis del SSCP automatizado, fue imposible cumplir con dichos objetivos y estimaciones.

En ausencia de cebadores específicos que amplifiquen solo un *locus* DQB exón 2, desde un punto de vista metodológico, si fuera factible la clonación y secuenciación de alelos DQB para todos y cada uno de los individuos analizados en dicho trabajo, sería posible una estimación de la diversidad alélica para el total de población. Sin embargo, la proporción de individuos homocigotos respecto a los heterocigotos en la población, seguiría siendo un valor desconocido.

Por otro lado, la posibilidad de diseñar cebadores *locus*-específicos, a partir del análisis y alineamiento de secuencias nucleotídicas y protéicas, es una opción que pudiera ser explorada en este trabajo; más aun, con el avance en la tecnología, y el desarrollo de

algoritmos que facilitan el diseño de cebadores más adecuados al grupo de genes o proteínas analizadas (ver Najafabadi *et al.* 2008).

El uso de técnicas moleculares que permitan observar la expresión de tales genes del sistema inmune, indicarían que alelos están siendo funcionales en la población actual. Sin embargo, el conocimiento sobre el origen *locus*-específico de cada alelo funcional, y por tanto información sobre la proporción de homocigotos:heterocigotos, seguiría siendo un problema de interpretación.

Por otro lado, la búsqueda de otros marcadores genéticos sujetos a selección (ver Nielsen *et al.* 2005), representaría una alternativa al problema de la duplicación génica, lo que llevaría a obtener información sobre la diversidad adaptativa poblacional. Más recientemente, se ha demostrado que el uso de otras regiones del ADN nuclear, como los SNP's (Single Nucleotide Polymorphism), representan una alternativa necesaria para comprender y distinguir los patrones de variación genética, en respuesta a cambios en la demografía poblacional y/o debidos a la acción de la selección natural (ver Nawa y Tajima 2008).

### **7.3.1 Caracterización, Naturaleza Histocompatible y Diversidad Alélica**

A partir de 15 individuos de ballena gris, se aislaron y caracterizaron un total de 25 secuencias únicas, cuya alta homología con secuencias histocompatibles clase II depositadas en el banco de genes, constituye una evidencia de su naturaleza histocompatible (ver Tabla X). Las secuencias descritas tuvieron un mayor grado de

homología con secuencias correspondientes al cachalote, panda, alces, cerdo, y vaca, lo que es consistente con el linaje evolutivo del que descienden los cetáceos (Cetartiodactyla y Ferungulata), lo cual se discute a detalle acorde a su análisis evolutivo inter-específico (ver más adelante).

Otra evidencia de la funcionalidad histocompatible de estas secuencias, es su traducción polipeptídica que indica que las secuencias aisladas tienen marcos de lectura abiertos que codifican proteínas histocompatibles (excepto tres secuencias con codones de paro; ver tabla XI). Aunado a esto, en la tabla XI se resumen características muy particulares que comparten las secuencias descritas, que las definen como secuencias histocompatibles; por ejemplo, mutaciones en posiciones de importancia para la PBR, como sitios de reconocimiento del antígeno, y sitios que forman las cadenas laterales de la PBR (Brown *et al.* 1993, Stern *et al.* 1994). Las mutaciones o cambios a nivel polipeptídico, que ocurren en secuencias histocompatibles, resultan en una alta tasa de sustituciones no sinónimas (p.e. Yang *et al.* 2005, Baker *et al.* 2006, Xu *et al.* 2007), que provocan cambios en la estructura tridimensional (Brown *et al.* 1993, Stern *et al.* 1994), y en su afinidad e hidrofobicidad (ver Tabla XII), lo que favorece la detección y captura de diversos péptidos antígenos, aumentando la capacidad inmune (Piertney y Oliver 2006).

En conclusión, el análisis comparativo de homología, y de la función de las secuencias polipeptídicas para ballena gris y otros mamíferos, representan evidencias de la naturaleza histocompatible de las secuencias aisladas de ballena gris. Otro aspecto muy importante de los genes MHC, es que para algunas especies, ciertos *loci* están

representados por más de dos alelos en los individuos. De los individuos clonados y secuenciados (ver Anexo 5), para cinco de estos, se aislaron más de dos secuencias distintas por individuo, sugiriendo la presencia de más de un *locus* DQB en la especie. En particular, la presencia de 13 alelos en un solo individuo, sugiere la presencia de al menos siete *loci* clase II para esta especie. La presencia de varios alelos *Mhc* (duplicación de gen), ha sido reportado para varias especies tanto de peces teleósteos (p.e. *Gasterosteus aculeatus*, Thorsten *et al.* 2004), aves (p.e. *Gallinago media*, Ekblom *et al.* 2004), mamíferos terrestres (p.e. Gu y Nei 1999), y mamíferos marinos (p.e. *Lipotes vexillifer*, Yang *et al.* 2005; *Megaptera novaengliae*, *Eubalena australis*, Baker *et al.* 2006; *Neophocaena phocaenoides*, Xu *et al.* 2007), incluyendo a secuencias histocompatibles clase I para ballena gris (Flores-Ramírez *et al.* 2000). Se ha sugerido, que probablemente esto sea debido a una duplicación reciente, afectando a algunos de estos alelos, o a la amplificación de diferentes *loci* (ver Ekblom *et al.* 2004, Nei y Rooney 2005).

Con base en la filogenia de los cetartiodactilos (ver más adelante en análisis filogenético interespecífico; ver Gatesy *et al.* 1999), la duplicación génica pudo haber ocurrido cuando los cetáceos divergeron de los artiodáctilos, primero en misticétos, y posteriormente en odontocétos (ver Gatesy *et al.* 1999). Las evidencias de duplicación génica, sólo en el baiji (ver Yang *et al.* 2005) y en la marsopa sin aletas (Xu *et al.* 2007), sugerirían eventos de duplicación relativamente recientes en odontocétos (ver Tabla XVIII).

Otra característica particular de este tipo de genes *Mhc*, que además representa una evidencia adicional de su naturaleza histocompatible, es una proporción significativamente mayor de

sustituciones no sinónimas que sinónimas (ver Piertney y Oliver 2006). Desde los primeros estudios sobre las tasas de sustitución nucleotídica en el hombre y el ratón (p.e. Hughes y Nei 1989), se ha evidenciado que la tasa de sustitución de aminoácidos, se ve favorecida por la selección Darwiniana. Existen tres observaciones comunes en genes MHC, que concuerdan con la hipótesis de selección: alta tasa de sustitución no sinónima, alta diversidad, y polimorfismo alélico persistente por grandes periodos de tiempo (ver Bernatchez y Landry 2003). Para ballena gris, se observo una proporción de sustituciones no sinónimas significativamente superior a las sinónimas (ver Tabla XIII); además, respecto a la alta diversidad y polimorfismo alélico, esta especie, presenta valores superiores comparado con otras especies de mamíferos marinos (ver Tabla XVIII); estos patrones confirman que las secuencias descritas para ballena gris, están siendo sujetas a selección, favoreciendo el polimorfismo alélico.

Pese a que la característica predominante de estos genes, es que el polimorfismo alélico sea atribuido a la selección balanceadora, favoreciendo altas tasas de sustituciones no sinónimas contra las sinónimas, los alelos MHC, pueden experimentar periodos de evolución neutral, durante el cual la deriva génica y la mutación son más prominentes en mantener dicho polimorfismo, que la selección (Vassilakos *et al.* 2009). Contrario a los alelos funcionales, los pseudogenes experimentan evolución neutral (Yang *et al.* 2005), por lo que no se observaría una proporción mayor de sustituciones no sinónimas. Al comparar las tasas de sustituciones de aminoácidos entre las secuencias con marcos de lectura abiertos, y las secuencias con codones de paro (ver tabla XIV), se observó una diferencia significativa entre las sustituciones no sinónimas ( $d_N$ ) y las sinónimas ( $d_S$ ), tanto

para genes como para pseudogenes; al comparar la proporción  $d_N/d_S$  entre genes y pseudogenes, se observó que no hay diferencias significativas entre ambos grupos de genes. Lo anterior, puede ser una evidencia de que los pseudogenes representan mutaciones relativamente recientes, puesto que todavía se observan tasas de sustituciones no sinónimas muy superiores respecto a las sinónimas.

A pesar de haber encontrado un alto polimorfismo alélico en las secuencias descritas para ballena gris, el hecho de que existan aparentemente, al menos siete *loci* MHC-II, hace probable que los alelos encontrados no sean los únicos presentes en los individuos, lo cual limita la interpretación en términos de variabilidad genética a nivel poblacional. Lo anterior justificó el intentar segregar a las secuencias descritas en sus correspondientes linajes alélicos; el análisis filogenético ha sido utilizado para este fin (p.e. Gu y Nei 1999), es decir, agrupar alelos del mismo *locus* en un linaje alélico. De la misma forma, el análisis filogenético, ha permitido hacer inferencias sobre los procesos evolutivos que han experimentados las secuencias MHC a lo largo de su historia (ver Piertney y Oliver 2006).

### **7.3.2 Diversidad Alélica por duplicación de genes**

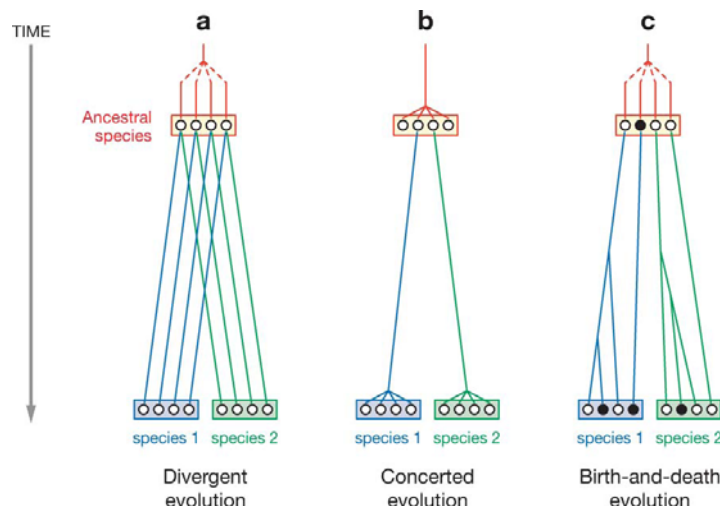
El hecho de que los individuos presentaran más de dos alelos, sugieren que estos alelos no provienen de un mismo *locus*, lo cual es una evidencia que soporta la existencia de duplicación genética en el *locus* DQB de ballena gris. En cetáceos, resulta de particular interés que la evidencia de duplicación de genes solo se ha reportado principalmente para misticetos, y dos especies de odontocétos (*Lipotes vexillifer* y

*Neophocaena phocaenoides*). La tabla XVIII, resume las principales características de cómo han evolucionado los genes DQB en las distintas especies de cetáceos. Cabe resaltar, que la ballena gris es la única especie en la que se ha observado pseudogenes en su polimorfismo alélico a nivel de DQB *Mhc*-II.

Como se ha mencionado anteriormente, una característica importante de los genes MHC, es su alto grado de polimorfismo genético dentro de los *loci*; además de que algunos linajes alélicos, aparentemente han coexistido en la población por un largo tiempo evolutivo, abarcando eventos de especiación (Gu y Nei 1999). Diferentes modelos de evolución, se han propuesto para tratar de explicar cómo surge, y cómo es mantenida esta alta diversidad. Para el complejo de genes MHC, se ha propuesto el modelo de evolución de “Nacimiento y Muerte” (Birth-and-Death Evolution), en el cual nuevos genes son creados por duplicación genética, en donde algunos genes duplicados pueden ser mantenidos en el genoma por largo tiempo, mientras que otros pueden ser eliminados o volverse no-funcionales por alguna mutación deletérea (ver Figura 15; Nei y Rooney 2005).

**Tabla XVIII. Características importantes de la evolución del *locus* DQB exón 2 en cetáceos.**

| Especie                                                                                                                | # Individuos analizados      | # Alelos           | Evidencia de duplicación de genes | Evidencia de pseudogenes | No-PBR dn/ds   | PBR dn-ds (valor P)        | PBR dn/ds                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>MISTICETOS</b>                                                                                                      |                              |                    |                                   |                          |                |                            |                          |
| <i>Eschrichtius robustus</i><br>Ballena gris<br>Pacífico Nororiental                                                   | 15                           | 25                 | SI                                | SI                       | 0.040<br>0.020 | 0.117<br>0.009<br>p < 0.05 | 11.82                    |
| <i>Balaenoptera musculus</i><br>Ballena azul<br>Golfo de California                                                    | 2                            | 6                  | SI                                | NO                       | 0.017<br>0.016 | 0.12<br>0.019<br>p < 0.05  | 6.06                     |
| <i>Balaenoptera physalus</i><br>Ballena de aleta<br>Golfo de California                                                | 2                            | 7                  | SI                                | NO                       | 0.042<br>0.045 | 0.176<br>0.023<br>p < 0.05 | 7.48                     |
| <i>Megaptera novaeangliae</i> *<br>Ballena jorobada<br>Poblaciones del SEA, CA & GM<br>Baker <i>et al.</i> . 2006      | 35                           | 23                 | SI                                | NO                       | 0.022<br>0.047 | 0.304<br>0.043<br>p < 0.05 | 7.07                     |
| <i>Eubalaena australis</i><br>Ballena franca<br>Población del Sur<br>Baker <i>et al.</i> . 2006                        | 1                            | 5                  | SI                                | NO                       | 0.031<br>0.012 | 0.396<br>0<br>p < 0.05     | -                        |
| <b>ODONTOCETOS</b>                                                                                                     |                              |                    |                                   |                          |                |                            |                          |
| <i>Lipotes vexillifer</i><br>Baiji (extinto)<br>Delfín chino del Río Yangtze<br>Yang <i>et al.</i> . 2005              | 18                           | 43                 | SI                                | NO                       | 0.024<br>0.08  | 0.196<br>0.025<br>p < 0.01 | 7.66                     |
| <i>Neophocaena phocaenoides</i> *<br>Marsopa sin aleta<br>Poblaciones del YRP, YSP & SCSP<br>Xu <i>et al.</i> . 2007   | 195                          | 14                 | SI                                | NO                       | 0.037<br>0.018 | 0.1<br>0.023<br>p = 0.07   | 4.3                      |
| <i>Orcinus orca</i> *<br>Orca<br>Poblaciones del SR, AR, AT, CT, BR & IC<br>Vassilakos <i>et al.</i> . 2009            | 30 promedio<br>por población | 5 por<br>población | NO                                | NO                       | -              | -                          | 1.84 - 3.07<br>p < 0.043 |
| <i>Tursiops truncatus</i> *<br>Tonina<br>Poblaciones del MED, ENA, WNAP, WNAC & ENP<br>Vassilakos <i>et al.</i> . 2009 | 25 promedio<br>por población | 7 por<br>población | NO                                | NO                       | -              | -                          | 29.2 - 62.7<br>p < 0.001 |
| <i>Tursiops aduncus</i><br>Tonina (ecotipo costero)<br>Población del Sur de África<br>Vassilakos <i>et al.</i> . 2009  | 140                          | 7                  | NO                                | NO                       | -              | -                          | 28.9<br>p < 0.001        |
| <i>Delphinapterus leucas</i><br>Murray <i>et al.</i> . 1995                                                            | 233                          | 5                  | NO                                | NO                       | -              | -                          | -                        |
| <i>Monodon monoceros</i><br>Murray <i>et al.</i> . 1995                                                                | 12                           | 1                  | NO                                | NO                       | -              | -                          | -                        |
| <i>Phocoena sinus</i><br>Munguía-Vega <i>et al.</i> . 2007                                                             | 25                           | 1                  | NO                                | NO                       | -              | -                          | -                        |



**Figura 15. Modelos de Evolución de familias de multigenes. Círculos claros representan genes funcionales; círculos oscuros corresponden a pseudogenes (tomado de Nei y Rooney 2005).**

En conclusión, la duplicación de genes, en combinación con una alta diversidad alélica, efectivamente incrementa la diversidad que codifica para proteínas MHC, los cuales juegan un papel muy importante en la respuesta inmune contra varios patógenos (Yang *et al.* 2005). Se ha observado que muchas especies de mamíferos marinos tienen bajos niveles de diversidad MHC (p.e. Murray *et al.* 1995, Munguía-Vega *et al.* 2007, Nigenda-Morales *et al.* 2008), comparada con especies de mamíferos terrestres (p.e Elizabeth *et al.* 2000, Villegas-Castagnasso *et al.* 2003). Una de las hipótesis más sencillas que ha explicado esta reducción de la diversidad MHC en mamíferos marinos, es que este bajo nivel es causado por una baja presión de selección, resultado de una abundancia baja de parásitos en el ambiente marino, comparado con los ambientes terrestres (Slade 1992).

Sin embargo, el delfín de río baiji (actualmente extinto), y la marsopa sin aletas (población del Río Yangtze en peligro de extinción),

poblaciones con distribución limitada, endémicas de esas regiones, que han disminuido drásticamente sus niveles de abundancia en las últimas décadas, hasta el punto de la extinción para el caso del baiji, exhiben altos niveles de diversidad MHC con duplicación de genes (ver Yang *et al.* 2005, Xu *et al.* 2007). Se ha especulado, que los ambientes dulceacuícolas tienen relativamente altos niveles de patógenos respecto al agua marina, por lo que dichas diversidades en el MHC, son una adaptación evolutiva al ambiente dulceacuícola (Yang *et al.* 2005). En particular la ballena gris, exhibe altos niveles de diversidad alélica y variabilidad en sus secuencias, eventos de duplicación de genes, la única con evidencia de pseudogenes, y la proporción  $d_N/d_S$  más alta entre los mamíferos que presentan eventos de duplicación. Estas características particulares, pueden ser resultado de su peculiar historia de vida; dentro de los misticetos, es la especie más costera, por lo que tiene relación con muchas otras especies marinas y terrestres, además de que recibe mayor impacto antropogénico (incluyendo las zonas de crianza donde se realiza avistamiento de ballenas), realiza una de las migraciones anuales más largas (por lo que su condición física se ve desafiada), y su tipo de alimentación por dragado, indudablemente favorece el contacto con materia orgánica en descomposición. Todos estos factores, promueven un encuentro mayor con patógenos, estimulando así la respuesta inmune.

Aunque en el presente trabajo, se ha encontrado gran evidencia soportando la hipótesis de selección favoreciendo mayor polimorfismo alélico, Garrigan y Hedrick (2003), resaltan que algunas de las señales de selección pueden ser detectables hasta poco tiempo después de la presión de selección, pero que esta señal puede permanecer por considerables periodos de tiempo, después de que la presión de

selección haya disminuido. Así, y pese a que se encontró una gran diversidad alélica en la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, y que sea posible inferir su naturaleza histocompatible, es posible que estos niveles de diversidad MHC, no estén siendo actualmente funcionales contra algún patógeno, y que sean una huella en el genoma nuclear. Para confirmar esto, sería necesario por ejemplo, un estudio de expresión genética mediante extracción de RNA, que pudiera mostrar que genes están siendo funcionales en los individuos de la población.

### **7.3.3 Relaciones Filogenéticas**

#### **a) Análisis filogenético intra-específico de alelos DQB de ballena gris**

El análisis filogenético entre las secuencias de DQB exón 2 de ballena gris (ver Figura 12), mostró la segregación de alelos en al menos siete *loci*, de los cuales dos (LOCUS PS1 y PS2), incluyeron a pseudogenes. Aunque aparentemente 21 alelos mostraron marcos de lectura abiertos, solo 13 de estos, los cuales pertenecen a los LOCUS D y E, mostraron tasas de sustitución no sinónimas superiores y significativas, evidenciando la acción de la selección (Hughes y Nei 1989). Aunado a esto, estos LOCUS incluyen a los alelos de origen más reciente en la topología del árbol. Estas últimas dos características, permiten inferir que la presión de selección, efectivamente esta provocando un aumento en la diversidad alélica. Sin embargo, este análisis comprende solo una pequeña muestra de la población, por lo que las interpretaciones son limitadas debido al tamaño de muestra.

## **b) Análisis filogenético inter-específico de secuencias *Mhc*-II de mamíferos**

En todas las reconstrucciones filogenéticas realizadas en especies de mamíferos marinos, para observar el polimorfismo trans-específico característico de este grupo de genes *Mhc*-II, solo han utilizado pocas secuencias de cada especie. En este trabajo se incluyeron secuencias de varios individuos de cada especie, asegurando con ello la resolución de las ramas internas (intra-específicas), y una reducción importante de la variabilidad inter-específica.

Acorde a la topología del análisis filogenético inter-específico (ver Figura 13), el grupo ancestral o basal del árbol, corresponde a secuencias provenientes de ungulados. Estos resultados son consistentes, acorde a la línea evolutiva de la cual descienden los cetáceos, Cetartiodactilia, clado que une a los cetáceos con los ungulados (ver Gatesy et al. 1999).

En este análisis se observó que los alelos para ballena gris, se segregan independientemente del resto de las especies, lo cual pudiera estar reflejando que estos alelos surgieron tiempo después de la divergencia entre odontocétos y misticétos. Es bien conocido que los genes *Mhc*, presentan un tipo de polimorfismo trans-específico, en el cual la selección mantiene a los alelos durante grandes periodos de tiempo, pasando a través de eventos de especiación (Piertney y Oliver 2006). En cetáceos, se ha observado en algunas especies este tipo de evolución trans-específica. Por ejemplo Hoelzel *et al.* 1999, observaron que secuencias DQB de cuatro especies de pinnípedos, presentan este tipo de evolución trans-específica, sugiriendo que las secuencias *Mhc* de

mamíferos marinos evolucionan de manera similar que especies de mamíferos terrestres. Para ballena gris, Flores-Ramírez *et al.* (2000), encontraron polimorfismo trans-específico en secuencias *Mhc* clase I, con secuencias de ungulados. Sin embargo, para secuencias *Mhc*-II (este trabajo), no fue el caso. Esto puede ser una evidencia, de que los efectos de la presión de selección, han sido muy diferentes para la población de ballena gris, por lo que se estaría haciendo referencia a una adaptación local.

Es importante considerar, que la ballena gris representa la segunda especie de cetáceo más divergente, siendo la ballena de Groenlandia (*Balaena mysticetus*) la más ancestral del grupo de misticetos, y de cetáceos en general (ver Milinkovitch *et al.* 1994). Este origen tan ancestral de la ballena gris, puede ser una razón por la que no se haya observado polimorfismo trans-específico; y en conjunto con una presión de patógenos particulares de su historia de vida, indicaría una adaptación local para la población de ballena gris.

Un ejemplo claro de adaptación local, es el trabajo realizado por Xu *et al.* (2007), para la marsopa sin aletas *Neophocaena phocaenoides* de la población del Río Yangtze, cuyo polimorfismo alélico muestra mayor similitud con el extinto delfín de río *Lipotes vexillifer* (Yang *et al.* 2005), especies con historia de vida y distribución similar, que para con otras poblaciones de marsopas.

#### **7.4 Segregación de alelos DQB por linajes mitocondriales de ballena gris**

En el análisis que se realizó para observar la posible segregación de alelos DQB por linajes maternos (ver figura 14), no se observó evidencia de una segregación diferencial de alelos DQB por haplotipos maternos. Sin embargo, estos resultados, pueden ser consecuencia de un bajo número de muestra, tanto de individuos clonados, como en el número de clonas analizadas por individuo; aunque, al no haber estructura poblacional a nivel del ADNmit, podría esperarse que tampoco la hubiera a nivel de DQB exón 2 *Mhc-II*.

A pesar de que no se observó una segregación de alelos DQB por linajes maternos, y el tamaño de muestra limita el análisis e interpretación para esta sección, fue posible evidenciar que los haplotipos más frecuentes (p.e. hA, hB y hG; Tabla II; ver Le Duc *et al.* 2002), presentan mayor diversidad *Mhc-II* (ver Anexo 8). Por ejemplo, el haplotipo hA, que esta representado por 10 individuos, presentó 14 alelos DQB; por su parte el haplotipo hB, presente en 9 individuos, tuvo solo cuatro alelos DQB; en tanto que el haplotipo hAD, menos frecuente (3 individuos), presentó 5 alelos distintos. Cabe resaltar, que uno de los haplotipos nuevos encontrado en este trabajo (ENPGW15; ver Tabla II), presentó 5 alelos DQB distintos.

Otro aspecto importante a resaltar, es la presencia de los pseudogenes (ver Tabla XI), solo en individuos de los linajes más comunes (ver Anexo 8). Esta característica, en conjunto con la relativamente alta diversidad para los linajes más comunes, podría representar una evidencia más de la acción de la selección, para el total

de la población, puesto que no hay signos de estructura a nivel del ADNmit (ver Tabla IV). Sin embargo, para poder tener la certeza de No segregación de alelos DQB por linajes, debería tenerse al menos, un tamaño de muestra que incluyera representantes de todos los haplotipos de la población. En este trabajo, solo se tienen alelos DQB para nueve haplotipos mitocondriales (30% del total).

Por otra parte, y pese a que no fue posible, realizar inferencias directamente sobre la demografía histórica de la población de ballena gris partir de la diversidad genética no neutral a nivel de DQB exón 2 *Mhc-II*, existe evidencia de que dicha diversidad puede reflejar la demografía histórica, puesto que una pérdida de diversidad, es típicamente considerada como una evidencia de una población pequeña, en declive o potencialmente en peligro (Hedrick 2003). En mamíferos marinos, un ejemplo claro donde los efectos demográficos se reflejan en ambas diversidades, tanto neutral a nivel de la región control mitocondrial, como no neutral sujeta a selección a nivel del gen DQB, es en la población de la vaquita marina (ver Munguía-Vega *et al.* 2007); para esta población, la explicación más plausible para ambos genes, es la pérdida de variabilidad por endogamia y deriva genética en una población históricamente pequeña.

Al analizar la demografía e historia de vida, con la diversidad genética neutral y adaptativa de varias especies de mamíferos marinos (ver Anexo 9), se observó que no hay una correlación consistente entre la diversidad neutral y no neutral de estas especies. Aunque al parecer, no hay una regla que establezca la relación entre ambas diversidades, aparentemente es la demografía e historia de vida de las poblaciones, la que determina los patrones de variación. Por ejemplo, y caso contrario a

la vaquita marina, es el caso del baiji (ver Yang et al. 2005); esta especie, actualmente extinta, fue mermando su población a lo largo de su historia de vida, presenta bajos niveles de diversidad neutral (ADNmit), pero presenta una de las diversidades adaptativas más altas entre los mamíferos marinos, la cual se considera como una respuesta ante todos los impactos a su hábitat. Por su parte, la ballena gris presenta altos niveles de diversidad tanto neutral como adaptativa (ver Anexo 9); estas son evidencias, por un lado, de que la cacería no fue lo suficientemente severa para afectar su diversidad neutral, en tanto que la diversidad adaptativa, puede considerarse como un reflejo o respuesta tanto a su historia de vida, como a todos los cambios que ha tenido su ambiente, y que han ido incrementado a lo largo de su historia de vida.

### **7.5 Re-análisis de la demografía histórica e historia de vida para evaluar el estado actual de salud genética de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental.**

En cuanto a la diversidad genética neutral a nivel de la región control del ADNmit, la población de ballena gris del Pacífico Nororiental, presenta altos valores de diversidad comparada con otras poblaciones de cetáceos que fueron intensamente cazadas. Desde un punto de vista demográfico, la población de ballena gris se encuentra en una fase de expansión poblacional, que no presenta signos de un cuello de botella reciente, o al menos parece no haber sido lo suficientemente severo o duradero para verse reflejado en los patrones de variación genética.

Por su parte, en cuanto a la variación genética adaptativa a nivel de DQB exón 2 *Mhc-II*, la población de ballena gris presenta altos niveles

de diversidad alélica comparada con otras especies de cetáceos; además, presenta evidencias de los efectos de la presión de selección sobre los patrones de variación adaptativa, como duplicación génica, alelos no funcionales (pseudogenes), y altas tasas de sustituciones no sinónimas.

Por otro lado, pese a que la población de ballena gris del Pacífico Nororiental fue intensamente cazada, actualmente ha recuperado sus niveles de abundancia después del periodo de explotación comercial (Rugh *et al.* 2005, IWC 2010); valores de abundancia que son similares a los obtenidos mediante el modelo genético corregido (este trabajo). Así mismo, los valores altos de diversidad genética, tanto neutral como adaptativa, son reflejo de que tal reducción no fue lo suficientemente severa. Entonces, ¿qué pudo haber hecho que tal reducción no afectara los niveles de diversidad genética, ni su capacidad de recuperación?

Es posible que su gran capacidad o flexibilidad en escoger diferentes hábitats, sea parte del porque esta población exhibe tan remarcada recuperación (Goerlitz *et al.* 2003). Se ha sugerido que las ballenas grises pudieron moverse fuera de las áreas donde hubo una intensa cacería, a otras zonas fuera de la costa para sus actividades reproductivas, lo cual permitió que gran número de individuos sobreviviera el periodo de caza comercial (Jones y Swartz 1984 en Goerlitz *et al.* 2003). Como resultado, el impacto en la demografía de la población se redujo, y la severidad del aparente cuello de botella poblacional, quedo atenuado. Aunado a lo anterior, la peculiar historia de vida de la ballena gris (hábitos costeros, modo de apareamiento, tipo de alimentación, entre otros), propicia el encuentro con variedad de patógenos que estimulan y favorecen nuevas variantes alélicas,

aumentado la diversidad adaptativa y su capacidad de respuesta ante cambios ambientales.

En conclusión, aunque la población de ballena gris fue intensamente cazada, y su recuperación actual fuera tan solo  $\frac{1}{4}$  de la población original, como lo plantean en su trabajo Alter *et al.* (2007), las altas diversidades genéticas tanto neutral como adaptativa, presentes en la población actual, en conjunto con los resultados aquí generados sobre la abundancia poblacional, son reflejo, y pueden interpretarse como buen estado de salud genética, para una población recuperada, con capacidad de respuesta ante cambios ambientales, y con niveles de abundancia relativamente altos y comparables con la abundancia original previo al periodo de caza.

## **8. CONCLUSIONES**

### **Diversidad Neutral a nivel de la Región Control del ADNmit de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental**

La población de ballena gris del Pacífico Nororiental, presenta valores altos de diversidad genética neutral, y no presenta signos de estructura poblacional a nivel de la región control del ADN mitocondrial.

En cuanto al análisis de la distribución de diferencias pareadas y los descriptores demográficos bajo el modelo de expansión repentina, la población de ballena gris se encuentra en una fase de expansión, donde no hay evidencia de un cuello de botella poblacional, o una reducción drástica de los niveles de abundancia poblacional.

Para el tamaño histórico poblacional, los resultados aquí generados a partir del retrocálculo demográfico que utiliza la Comisión Ballenera Internacional, reconciliando las estimaciones demográficas y genéticas. Así mismo, la estimación obtenida a partir del modelo genético corregido, concuerda con la estimación de abundancia más actual a partir de censos demográficos, y con las estimaciones a partir de modelos no genéticos (Solver y ADMB).

Por último, la estimación genética corregida, en conjunto con las revisiones y datos de capturas, pueden ayudar a establecer una línea de base más confiable para evaluar los niveles de recuperación, e implementar medidas de manejo para las poblaciones de ballenas.

## **Diversidad Adaptativa a nivel del gen DQB exón 2 *Mhc-II* de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental**

La duplicación génica, el alto grado de polimorfismo alélico, y las altas tasas de sustitución no sinónima, son consistentes con la acción de la selección; así mismo, la retención de variación genética adaptativa a pesar de la reducción poblacional, es reflejo de su peculiar historia de vida que promueve el encuentro con diversos patógenos, soportando así, la hipótesis de la presión patogénica diversificadora, que favorece la diversidad de alelos como consecuencia de la presión selectiva de diversos patógenos.

En cuanto al análisis de la historia evolutiva de los alelos DQB exón 2 de ballena gris, respecto a otras especies de mamíferos, la ausencia del patrón de evolución trans-específico de la diversidad alélica, puede interpretarse como una adaptación local, debido al ambiente, distribución, demografía e historia de vida particulares de esta población.

Desde un punto de vista demográfico, y en conjunto con la diversidad genética neutral, los patrones de variación adaptativa a nivel del *Mhc-II* de la ballena gris, son consistentes con el tamaño poblacional actual.

La diversidad alélica y duplicación génica en DQB exón 2 *Mhc-II*, es un hecho que biológicamente confiere a los individuos la capacidad de responder ante la presencia de nuevos patógenos. El entender cómo evolucionan estos genes, cómo surge dicha variabilidad, que procesos favorecen su permanencia en el genoma, y cuales su desaparición, y

cómo es la relación entre los diferentes *loci Mhc* tanto a nivel intra-específico como inter-específico, sigue siendo controversial.

## 9. LITERATURA

- Alter SE, E Rynes y SR Palumbi. 2007. DNA evidence for historic population size and past ecosystem impacts of gray whales. **P Natl Acad Sci USA**. 104(38):15162-15167.
- Alter SE, S Flores-Ramírez, S Nigenda, J Úrban-Ramírez, L Rojas-Bracho y SR Palumbi. 2009. Mitochondrial and Nuclear Genetic Variation across Calving Lagoons in Eastern North Gray Whales (*Eschrichtius robustus*). **J Hered**. 100:34-46.
- Arnason U, A Gullberg y B Widegren. 1993. Cetacean Mitochondrial DNA control region: sequences of all extant baleen whales and two sperm whale species. **Mol Biol Evol**. 10:960-970.
- Avise JC. 1995. Mitochondrial DNA Polymorphism and a Connection Between Genetics and Demography of Relevance to Conservation. **Conserv Biol**. 9:686-690.
- Avise JC, AG Jones, DeEtteWalker y JA DeWoody. 2002. Genetic Mating System and Reproduction Natural Histories of Fishes: Lessons for Ecology and Evolution. **Annu Rev Genet**. 36:19-45.
- Aljanabi SM y I Martínez. 1997. Universal and rapid sald-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Res**. 25(22):4692-4693.
- Atha DH, HM Wenz, H Morehead, J Tiang y CD O'Connell. 1998. Detection of p53 point mutations by single strand conformation polymorphism: analysis by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**. 19:172-179.
- Ballard JWO y GM Rand 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its Phylogenetic implications. **Annu Rev Ecol Evol S**. 36:621-642.
- Baker CS, A Perry, JL Bannister, MT Weinrich, RB Abernethy, J Calambokidis, J Liens, RH Lambertsen, J Úrban-Ramírez, O Vasquez, PJ Clapham, A Alling, SJ O'Brien y SR Palumbi. 1993. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. **Proc Natl Acad Sci USA**. 90:8239-8243.
- Baker CS y PJ Clapham. 2004. Modelling the past and future of whales and whaling. **Trends Ecol Evol**. 19:365-371.
- Baker CS, MD Vant, ML Dalebout, GM Lento, SJ O'Brien y N Yuhki. 2006. Diversity and duplication of *DQB* and *DRB*-like genes of the

- MHC in baleen whales (suborder:Mysticeti). **Immunogenetics**. DOI 10.1007/s00251-006-0080-y.
- Bazin E, S Glémin y N Galtier. 2006. Population Size Does Not Influence Mitochondrial Genetic Diversity in Animals. **Science**. 312:570-572.
- Bernat M, E Titos y J Claria. 2002. Rapid identification of single nucleotide polymorphisms by fluorescence-based capillary electrophoresis. **Genet Mol Res**. 1(1):72-78.
- Bernatchez L y C Landry. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? **J Evolution Biol**. 16:363-77.
- Bérubé M y PJ Palsbøll. 1996. Identification of sex in Cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. **Mol Ecol**. 5(2):283-288.
- Bérubé M, J Úrban, AE Dizon, RL Brownell y PJ Palsbøll. 2002. Genetic identification of a small and highly isolated population of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Sea of Cortez, México. **Conserv Genet**. 3:183-190.
- Björklund M. 2003. Test for a population expansion after a drastic reduction in population size using DNA sequence data. **Heredity**. 91:481-486.
- Bowen L, BM Aldridge, F Gulland, J Woo, W Van Bonn, R DeLong, JL Stott y ML Johnson. 2002. Molecular characterization of expressed DQA and DQB genes in the California sea lion (*Zalophus californianus*). **Immunogenetics**. 54:332 – 347.
- Brown JH, TS Jardetzky, JC Gorga, LJ Stern, RG Urban, JL Strominger y DC Wiley. 1993. Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**. 364:33 – 39.
- Butterworth DS, JL Korrubel y AE Punt. 2002. What is needed to make a simple density-dependent response population model consistent with data for eastern North Pacific gray whales?. **J Cetacean Res Manage**. 4(1):63-76.
- Del Toro-Muñoz L. 2006. Estructura Genética en la Población de Ballena Gris (*Eschrichtius robustus*) Pacífico Oriental. **Tesis de Maestría**. CICESE. 79pp.
- Domínguez-Domínguez O y E Vázquez-Domínguez. 2009. Phylogeography: applications in taxonomy and conservation. **Animal Biod Conserv**. 32:59-70.

- Drummond AJ y A Rambaut. 2007. Software BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evol Biol**. doi:10.1186/1471-2148-7-214
- Edwards SV, J Nusser y J Gasper. 2000. CHAPTER 8: Characterization and Evolution of Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes in Non-Model Organisms, with Examples from Birds. 168-207 pp. En: AJ Baker (ed). **Molecular Methods in Ecology**. Blackwell Science. Oxford. 341 pp.
- Ekblom R, SA Saether, M Grahn, P Fiske, JA Kalas y J Hoglund. 2004. Major Histocompatibility Complex variation and mate choice in a lekking bird, the great snipe (*Gallinago media*). **Mol Ecol**. 13:3821 – 3828.
- Elizabeth JG, RA Oliver y GC Russell. 2000. Duplicated DQ haplotypes increase the complexity of restriction element usage in cattle. **J Immunol**. 165:134-138.
- Enriquez-Paredes LM. 2005. Identidad Genética de la Población de Ballena Azul (*Balaenoptera musculus*) en el Pacífico Nororiental: Agregaciones Mexicanas. **Tesis de Doctorado**. UABC. 198pp.
- Flores-Ramírez S, J Urbán-Ramírez y RD Miller. 2000. Major histocompatibility complex I loci from the grey whale (*Eschrichtius robustus*). **J Hered**. 91:279-282.
- Flores-Ramirez S, RD Miller y J Urban-Ramirez. 2004. Major histocompatibility complex I polymorphism in a cetacean: the gray whale (*Eschrichtius robustus*). **Mar Mammal Sci**. 20:262 – 273.
- Fournier D. 2009. ADMB Fast, Accurate, Stable Optimization. <http://admb-project.org/>
- Frankham R, JD Ballou y DA Briscoe. 2009. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press. Reino Unido. 704pp.
- Garrigan D y PW Hedrick. 2003. Perspective: Detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. **Evolution**. 57(8): 1707-1722.
- Gatesy J, MC Milinkovitch, V Waddell V y M Stanhope. 1999. Stability of Cladistic Relationships between Cetacea and Higher Level Artiodactyl Taxa. **Systematic Biol** 48: 6-20.
- Goerlitz DS, J Urbán, L Rojas-Bracho, M Belson y CM Schaeff. 2003. Mitochondrial DNA variation among Eastern North Pacific gray

- whales (*Eschrichtius robustus*) on winter breeding grounds in Baja California. **Can J Zoolog.** 81:1965-1972.
- Gu X y M Nei. 1999. Locus Specificity of Polimorphic Alleles and Evolution by a Birth-and-Death Process in Mammalian MHC Genes. **Mol Biol Evol** 16(2):147 – 156.
- Hasegawa M, H Kishino y T Yano. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **J Mol Evol.** 22:160 – 174 .
- Hayashi K, S Nishida, H Yoshida, M Goto, LA Pastene y H Koike. 2003. Sequence variation of the DQB allele in the cetacean MHC. **Mammal Study.** 28:89 – 96.
- Hedrick PW. 2003. The major histocompatibility complex (MHC) in declining populations: an example of adaptive variation. 97-113 p. En WV Holt, AR Pickard, JC Rodger y DE Wildt (eds.). **Reproduction Science and Integrated Conservation.** Cambridge University Press. 409 pp.
- Hedrick PW, KM Parker y RN Lee. 2001. Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and MUs in the endangered *Sonoran topminnow*. **Mol Ecol.** 10: 1399 – 1412.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature.** 405:907-913.
- Hewitt G. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. **Phil Trans R Soc Lond B.** 359:183–195.
- Hoelzel AR, JC Stephens y SJ O’Brien. 1999. Molecular genetic diversity and evolution at the MHC DQB *locus* in four species of pinnipeds. **Mol Biol Evol.** 16:611-618.
- Hoelzel AR, RC Fleischer, C Campagna, BJ Le Boeuf y G Alvord. 2002. Impact of a population bottleneck on symmetry and genetic diversity in the northern elephant seal. **J Evol Biol.** 15:567–575.
- Hoelzel AR, A Natoli, ME Dahlheim, C Olavarria, RW Baird y NA Black. 2002. Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proc R Soc Lond B.* 269:1467–1473.
- Huelsensbeck JP y F Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics.** 17:754 – 755.
- International Whaling Commission. 1999. The Revised Management Procedure (RMP) for baleen whales. **J Cetacean Res Manage.** 1:251-258.

- International Whaling Commission. 2008. Report of the Sub-Committee on Aboriginal Subsistence Whaling. **IWC/60/Rep 3**. 16pp.
- International Whaling Commission. 2010. Catches taken: ASW Aboriginal Subsistence Whaling catches since 1985. <http://www.iwcoffice.org>.
- Jackson JA, NJ Patenaude, EL Carroll y CS Baker. 2008. How few whales were there after Whaling? Inference from contemporary mtDNA diversity. **Mol Ecol**. 17: 236 – 251.
- Jones ML y SL Swartz. 2002. Gray whale *Eschrichtius robustus*. 524 – 536 p. En WF Perrin, B Wursig y JGM Thewissen (eds.) **Encyclopedia of Marine Mammals**. Academic Press. 1414 pp.
- Kita YF, M Watanabe, T Shiina, A Tanaka, H Ohizumi, K Hosomichi, T Iwasaki, M Ota, H Inoko, S Bahram y S Tanaka. 2008. The determination of community structure of offshore-type bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) by population genetic analysis. Unpublished .
- Lang AR, DW Weller, RG LeDuc, AM Burdin y RL Brownell Jr. 2010. Genetic differentiation between Western and Eastern (*Eschrichtius robustus*) gray whale populations using microsatellite markers. IWC 62<sup>nd</sup> Annual Meeting. **SC/62/BRG11**
- LeDuc RG, DW Weller, J Hyde, AM Burdin, PE Rosel, RL Brownell, B Wursig y AE Dizon. 2002. Genetic differences between western and easter gray whales (*Eschrichtius robustus*). **J Cetacean Res Manage**. 4:1-5.
- Lento GM, CS Baker, V David, N Yuhki, NJ Gales y J O'Brien. 2003. Automated single-strand conformation polymorphism reveals low diversity of Major Histocompatibility Complex Class II gene in the threatened New Zealand sea lion. **Mol Ecol**. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00445.x
- Maruyama T y M Kimura. 1980. Genetic variability and effective population size when local extinction and recolonization of subpopulations are frequent. **Proc Natl Acad Sci USA**. 77:6710-6714.
- McEwing R. 2003. mtDNA control region recovered from historical samples of tympano bulla. Unpublished.
- Meyers LA y JJ Bull. 2002. Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. **Trends Ecol Evol**. 17: 551 – 557.

- Milinkovitch MC, A Meyer y JR Powell. 1994. Phylogeny of all Major groups of Cetaceans Based on DNA Sequences from three Mitochondrial Genes. **Mol Biol Evol.** 11:939-948.
- Moore SE y JT Clarke. 2002. Potential impact of offshore human activities on gray whales (*Eschrichtius robustus*). **J Cetacean Res Manage.** 4(1):19-25.
- Mulligan CJ, A Kitchen y MM Miyamoto. 2006. Comment on Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. **Science.** DOI: 10.1126/science.1132585
- Munguía-Vega A, Y Esquer-Garrigos, L Rojas-Bracho, R Vázquez-Juárez, A Castro-Prieto y S Flores-Ramírez. 2007. Genetic drift vs. natural selection in a long-term small isolated population: major histocompatibility complex class II variation in the Gulf of California endemic porpoise (*Phocoena sinus*). **Mol Ecol.** doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03319.x
- Murray BW, S Malik y BN White. 1995. Sequence variation at the major histocompatibility complex locus *DQB* in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). **Mol Biol Evol.** 12 (4): 582–593.
- Nabholz B, JF Mauffrey, E Bazin, N Galtier y S Glemin. 2008. Determination of Mitochondrial Genetic Diversity in Mammals. **Genetics.** 178:351-361.
- Najafabadi HS, N Torabi y M Chamankhah. 2008. Designing multiple degenerate primers via consecutive pairwise alignments. **Bioinformatics.** doi:10.1186/1471-2105-9-55
- Natoli A, VM Peddemors y AR Hoelzel. 2004. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. **J Evol Biol.** 17: 363–375.
- Natoli A, VM Peddemors y AR Hoelzel. 2008. Population structure of bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) impacted by bycatch along the east coast of South Africa. **Conserv Genet.** 9:627–636.
- Nei M. 2005. **Selectionism and Neutralism in Molecular Evolution.** Oxford University Press. 83 pp.
- Nei M y AP Rooney. 2005. Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. **Annu Rev Genet.** 39:121 – 152.
- Nigenda-Morales S, S Flores-Ramírez, J Urbán-Ramírez y R Vázquez-Juárez. 2008. MCH DQB-1 Polymorphism in the Gulf of California Fin Whale (*Balaenoptera physalus*) population. **J Hered.** 99(1): 14 – 21.

- Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center. Uppsala University, Sweden.
- O'Brien SJ y N Yuhki. 1999. Comparative genome organization of the major histocompatibility complex: lessons from the Felidae. **Immunol Rev.** 167:133-144.
- O'Corry-Crowe G, C Lydersen, MP Heide-Jørgensen, L Hansen, LM Mukhametov, O Dove y KM Kovacs. 2010. Population genetic structure and evolutionary history of North Atlantic beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from West Greenland, Svalbard and the White Sea. **Polar Biol.** 33:1179-1194.
- Orita M, H Iwahana, H Kanazana, K Hayashi y T Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. **P Natl Acad Sci USA.** 86:2766-2770.
- Palsbøll PJ, MP Heide-Jørgensen y R Dietz. 1997. Population structure and seasonal movements of narwhals, *Monodon monoceros*, determined from mtDNA analysis. **Heredity.** 78:284-292.
- Patenaude NJ, VA Portway, CM Schaeff, JL Bannister, PB Best, RS Payne, VJ Rowntree, M Rivarola y CS Baker. 2007. Mitochondrial DNA Diversity and Population Structure among Southern Right Whales (*Eubalaena australis*). **J Hered.** 98(2):147-157.
- Penn DJ y WK Potts. 1999. The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. **Am Nat.** 153(2):145-164.
- Perryman W, M Donahue, P Perkins y S Reilly. 2002. Gray whale calf production 1994-2000: are observed fluctuations related to changes in seasonal ice cover?. **Mar Mammal Sci.** 18:121-144.
- Rambaut A y AJ Drummond. 2007. Tracer v1.4. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Reeves RR y E Mitchell. 2006. Status report on the grey whale (Eastern North Pacific population) *Eschrichtius robustus* in Canada. **COSEWIC.** 36 pp.
- Rice DW, AA Wolman y HW Braham. 1984. The gray whale, *Eschrichtius robustus*. **Mar Fish Rev.** 46:7-14.
- Roman J y SR Palumbi. 2003. Whales before whaling in the North Atlantic. **Science.** 301:508 - 510.

- Ronquist F y JP Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg180
- Rooney AP, RL Honeycutt y JN Derr. 2001. Historical population size change of bowhead whales inferred from DNA sequence polymorphism data. **Evolution**. 55(8):1678 – 1685.
- Rozas J, JC Sánchez-Del Barrio, X Messeguer y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**. 19:2496 – 2497.
- Rugh DJ, RC Hobbs, JA Lerczak y JM Breiwick. 2005. Estimates of abundance of the eastern North Pacific stock of gray whales (*Eschrichtius robustus*) 1997-2002. **J Cetacean Res Manage**. 7(1):1-12.
- Rugh DJ, JM Breiwick, RC Hobbs y M Muto. 2008. Eastern North Pacific gray whale abundance in the winter of 2006-2007. **IWC doc. SC/60/BRG6-revised**.
- Schneider S, D Roessly y L Excofier. 2000. ARLEQUIN v 2.0. A Software for Population Genetic Analysis. Genetic and Biometry Laboratory. University of Genove, Switzerland.
- SEMARNAP 2000. Norma Oficial Mexicana NOM-131-ECOL-1998. (publicada en el D.O.F. el 10 de enero de 2000).
- Shiels PG, AS Huett, SR Buchanan y DA Innes. 2000. Characterization of SLA-DQB and DRB genes in a line of inbred swine. Unpublished.
- Slade RW. 1992. Limited MHC polymorphism in the southern elephant seal: implications for MHC evolution and marine mammal population biology. **P Roy Soc Lond B Bio**. 249:163-171.
- Slade RW, C Moritz, AR Hoelzel y HR Burton. 1998. Molecular Population Genetics of the Southern Elephant Seal *Mirounga leonine*. **Genetics**. 149: 1945–1957.
- Schmidt D y J Pool. 2002. The effect of population history on the distribution of the Tajima's D statistic.
- Steeves TE, JD Darling, PE Rosel, CM Schaeff y RC Fleischer. 2001. Preliminary analysis of mitochondrial DNA variation in a southern feeding group of Eastern North Pacific gray whales. **Conserv Genet**. 2:379-384.
- Stern LJ, JH Brown, TS Jardetzky, JC Gorga, RG Urban, JL Strominger y DC Wiley. 1994. Crystal structure of human class II MHC

- protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. **Nature**. 368:215-221.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**. 123:585–595.
- Takahashi K, AP Rooney y M Nei. 2000. Origins and Divergence Times of Mammalian Class II MHC Gene Clusters. **J Hered**. 91(3):198-204.
- Tamura K, J Dudley, M Nei y S Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**. 24:1596-1599.
- Tershy B y D Breese. 1991. Sightings and feeding of gray whales in the northern Gulf of California. **J Mammal**. 72(4):830–1.
- Trowsdale J, V Groves y A Arnason. 1989. Limited MHC polymorphism in whales. **Immunogenetics**. 29:19-24.
- Van Tienderen PH, AA de Haan, CG van der Linden y B Vosean. 2002. Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. **Trends Ecol Evol** 17(12): 577–582.
- Vassilakos D, A Natoli, M Dahlheim y AR Hoelzel. 2009. Balancing and Directional Selection at Exon-2 of the MHC *DQB1* Locus among Populations of Odontocete Cetaceans. **Mol Biol Evol**. 26(3):681 – 689.
- Villegas-Castagnasso EE, S Diaz, G Giovambatista, FN Dulout y P Peral-Garcia. 2003. Analysis of ELA-DQB exon 2 polymorphism in Argentine Creole horses by PCR-RFLP and PCR-SSCP. **J Vet Med A**. 50:280-285.
- Watterson GA. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. **Theor Popul Biol**. 7:256–276.
- Weitkamp LA, RC Wissman y CA Simenstad. 1992. Gray whale foraging on ghost shrimp (*Callinassa californiensis*) in littoral sand flats of Puget Sound, U.S.A. **Can J Zoolog**. 70:2275 – 2285.
- Weller DW, AM Burdin, B Wursig, BL Taylor y RL Brownell. 2002. The western gray whale: a review of past exploitation, current status and potential threats. **J. Cetacean Res Manage**. 4(1):7-12.
- Whale and Dolphin Conservation Society. 2004. The Review of Significant Trade in the Narwhal (*Monodon monoceros*). **AC20 inf**. 9.
- Winston WL. 2004. Microsoft Excel Data Analysis and Business Modeling.

- Witting L. 2003. Reconstructing the population dynamics of Eastern Pacific gray whales over the past 150 to 400 years. **J Cetacean Res Manage.** 5:45-54.
- Wright S. 1945. Tempo and Mode in Evolution: A Critical Review. **Ecology.** 26:415-419.
- Yang G, L Shan, R Wenhua, Z Kaiya y W Fuwen. 2003. Mitochondrial control region variability of baiji and the Yangtze finless porpoises, two sympatric small cetaceans in the Yangtze River. *Acta Theriologica.* 48: 469-483.
- Yang G. J. Yan, K Zhou y F. Wei. 2005. Sequence Variation and Gene Duplication at MHC DQB Loci of Baiji (*Lipotes vexillifer*), a Chinese River Dolphin. **J Hered.** 96(4):310–317.
- Yang WC, JM Hu y LS Chou. 2006. Characterization of DQB and DRB genes in bottlenose dolphins. Unpublished.
- Yang WC, JM Hu y LS Chou. 2008. Sequence Variation of MHC Class II *DQB* Gene in Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) from Taiwanese Waters. **Taiwania.** 53(1):42-50.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1

#### Datos de los individuos analizados de las lagunas de reproducción:

##### a) Laguna San Ignacio

| Número | ID   | Haplotipo LeDuc<br><i>et al.</i> 2002 | Sexo | Fecha de<br>muestreo | ID Fuente     |
|--------|------|---------------------------------------|------|----------------------|---------------|
| 1      | SI01 | C                                     | H    | 1997                 | Er 095 UABCS  |
| 2      | SI02 | C                                     | H    | 1997                 | Er 096 UABCS  |
| 3      | SI03 | K                                     | H    | 1997                 | Er 090 UABCS  |
| 4      | SI04 | A                                     | H    | 1997                 | Er 092 UABCS  |
| 5      | SI05 | T                                     | -    | 1997                 | Er 103 UABCS  |
| 6      | SI06 | H                                     | H    | 1997                 | Er 115 UABCS  |
| 7      | SI07 | D                                     | H    | 1998                 | Er 154 UABCS  |
| 8      | SI08 | AD                                    | H    | 1998                 | Er 161 UABCS  |
| 9      | SI09 | X                                     | H    | 1998                 | Er 183 UABCS  |
| 10     | SI10 | G                                     | H    | 1998                 | Er 198 UABCS  |
| 11     | SI11 | A                                     | H    | 1998                 | Er 172 UABCS  |
| 12     | SI12 | A                                     | M    | 1998                 | Er 156 UABCS  |
| 13     | SI13 | R                                     | H    | 1998                 | Er 191 UABCS  |
| 14     | SI14 | G                                     | M    | 1998                 | Er 165 UABCS  |
| 15     | SI15 | AD                                    | H    | 1999                 | Biop 22 UABCS |
| 16     | SI16 | J                                     | M    | 1999                 | Biop 19 UABCS |
| 17     | SI17 | V                                     | H    | 1999                 | Biop 20 UABCS |
| 18     | SI18 | Z                                     | H    | 1999                 | Biop 18 UABCS |
| 19     | SI19 | B                                     | H    | 1999                 | Biop 23 UABCS |
| 20     | SI20 | T                                     | H    | 1999                 | Biop 09 UABCS |
| 21     | SI21 | R                                     | H    | 1999                 | Biop 10 UABCS |
| 22     | SI22 | C                                     | H    | 1999                 | Biop 14 UABCS |
| 23     | SI23 | C                                     | M    | 6-Ene-00             | Er 07 UABCS   |
| 24     | SI24 | B                                     | M    | 5-Ene-00             | Er 04 UABCS   |
| 25     | SI25 | L                                     | M    | 8-Ene-00             | Er 09 UABCS   |
| 26     | SI26 | O                                     | H    | 2000                 | Er 12 UABCS   |
| 27     | SI27 | G                                     | M    | 2000                 | Er 11 UABCS   |
| 28     | SI28 | D                                     | H    | 31-Ene-00            | Er 02 UABCS   |
| 29     | SI29 | R                                     | H    | 28-Ene-00            | VHF 08 UABCS  |
| 30     | SI30 | H                                     | H    | 6-Ene-00             | Er 08 UABCS   |

LSI = Laguna San Ignacio; - = sexo no identificado; UABCS = Universidad Autónoma de Baja California Sur.

**b) Bahía Magdalena**

| <b>Número</b> | <b>ID</b> | <b>Haplotipo LeDuc<br/><i>et al.</i> 2002</b> | <b>Sexo</b> | <b>Fecha de<br/>muestreo</b> | <b>Fuente</b> |
|---------------|-----------|-----------------------------------------------|-------------|------------------------------|---------------|
| 1             | BM01      | A                                             | M           | 3-Mar-06                     | SF            |
| 2             | BM02      | V                                             | H           | 3-Mar-06                     | SF            |
| 3             | BM03      | D                                             | H           | 3-Ene-06                     | SF            |
| 4             | BM04      | M                                             | H           | 3-Mar-06                     | SF            |
| 5             | BM05      | T                                             | H           | 3-Mar-06                     | SF            |
| 6             | BM06      | A                                             | H           | 4-Mar-06                     | SF            |
| 7             | BM07      | Z                                             | H           | 4-Mar-06                     | SF            |
| 8             | BM08      | A                                             | H           | 4-Mar-06                     | SF            |
| 9             | BM09      | C                                             | H           | 4-Mar-06                     | SF            |
| 10            | BM10      | A                                             | H           | 4-Mar-06                     | SF            |
| 11            | BM11      | AB                                            | M           | 4-Mar-06                     | SF            |
| 12            | BM12      | ENPGW28 *                                     | H           | 4-Mar-06                     | SF            |
| 13            | BM13      | AI                                            | H           | 4-Mar-06                     | SF            |
| 14            | BM14      | AI                                            | H           | 4-Mar-06                     | SF            |
| 15            | BM15      | ENPGW15 *                                     | H           | 5-Mar-06                     | SF            |
| 16            | BM16      | B                                             | H           | 5-Mar-06                     | SF            |
| 17            | BM17      | G                                             | H           | 5-Mar-06                     | SF            |
| 18            | BM18      | D                                             | -           | 5-Mar-06                     | SF            |
| 19            | BM19      | G                                             | M           | 5-Mar-06                     | SF            |
| 20            | BM20      | AC                                            | M           | 5-Mar-06                     | SF            |
| 21            | BM21      | H                                             | M           | 6-Mar-06                     | SF            |
| 22            | BM22      | K                                             | H           | 6-Mar-06                     | SF            |
| 23            | BM23      | C                                             | H           | 6-Mar-06                     | SF            |
| 24            | BM24      | C                                             | H           | 6-Mar-06                     | SF            |
| 25            | BM25      | D                                             | H           | 6-Mar-06                     | SF            |
| 26            | BM26      | G                                             | H           | 6-Mar-06                     | SF            |
| 27            | BM27      | AJ                                            | H           | 6-Mar-06                     | SF            |
| 28            | BM28      | N                                             | -           | 7-Mar-06                     | SF            |
| 29            | BM29      | B                                             | H           | 7-Mar-06                     | SF            |
| 30            | BM30      | B                                             | H           | 7-Mar-06                     | SF            |
| 31            | BM31      | AA                                            | H           | 7-Mar-06                     | SF            |
| 32            | BM32      | AB                                            | H           | 7-Mar-06                     | SF            |
| 33            | BM33      | AB                                            | H           | 7-Mar-06                     | SF            |
| 34            | BM34      | AB                                            | H           | 7-Mar-06                     | SF            |

BM = Bahía Magdalena; - = sexo no identificado; \* = haplotipos únicos de este trabajo;  
SF = Dr. Sergio Flores.

**c) Laguna Ojo de Liebre**

| <b>Número</b> | <b>ID</b> | <b>Haplotipo LeDuc<br/><i>et al.</i> 2002</b> | <b>Sexo</b> | <b>Fecha de<br/>muestreo</b> | <b>Fuente</b> |
|---------------|-----------|-----------------------------------------------|-------------|------------------------------|---------------|
| 1             | OL01      | A                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 2             | OL02      | ENPGW20 *                                     | H           | 2007                         | SF            |
| 3             | OL03      | V                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 4             | OL04      | R                                             | M           | 2007                         | SF            |
| 5             | OL05      | G                                             | M           | 2007                         | SF            |
| 6             | OL06      | R                                             | M           | 2007                         | SF            |
| 7             | OL07      | ENPGW28 *                                     | H           | 2007                         | SF            |
| 8             | OL08      | B                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 9             | OL09      | E                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 10            | OL10      | B                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 11            | OL11      | C                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 12            | OL12      | B                                             | M           | 2007                         | SF            |
| 13            | OL13      | T                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 14            | OL14      | AC                                            | M           | 2007                         | SF            |
| 15            | OL15      | M                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 16            | OL16      | K                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 17            | OL17      | AG                                            | H           | 2007                         | SF            |
| 18            | OL18      | M                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 19            | OL19      | B                                             | M           | 2007                         | SF            |
| 20            | OL20      | AD                                            | M           | 2007                         | SF            |
| 21            | OL21      | X                                             | M           | 2007                         | SF            |
| 22            | OL22      | X                                             | M           | 2007                         | SF            |
| 23            | OL23      | AG                                            | H           | 2007                         | SF            |
| 24            | OL24      | AF                                            | H           | 2007                         | SF            |
| 25            | OL25      | Y                                             | H           | 2007                         | SF            |
| 26            | OL26      | A                                             | M           | 2007                         | SF            |
| 27            | OL27      | L                                             | M           | 2007                         | SF            |
| 28            | OL28      | C                                             | M           | 2007                         | SF            |
| 29            | OL29      | A                                             | M           | 2007                         | SF            |

LOL = Laguna Ojo de Liebre; \* = haplotipos únicos de este trabajo; SF = Dr. Sergio Flores.

## Anexo 2

### Simulación de Trayectorias Demográficas de la población de ballena gris del Pacífico Nororiental con base en el Modelo Logístico Generalizado de Dinámica Poblacional (IWC, 1999).

| Periodo | Total Capturas | Fuente | ABUNDANCIAS HISTÓRICAS |                    |                  |        |       |                        |  | CV | Fuente |
|---------|----------------|--------|------------------------|--------------------|------------------|--------|-------|------------------------|--|----|--------|
|         |                |        | Alter et al.*          | Modelo Tradicional | Modelo Corregido | SOLVER | ADMB  | Abundancias Observadas |  |    |        |
| 1600    | 160            | 1      | 96400                  | 151689             | 26871            | 21638  | 21642 |                        |  |    |        |
| 1610    | 160            | 1      | 95055                  | 150345             | 25521            | 20403  | 20459 |                        |  |    |        |
| 1620    | 160            | 1      | 94149                  | 149442             | 24588            | 19679  | 19831 |                        |  |    |        |
| 1630    | 160            | 1      | 93533                  | 148833             | 23924            | 19215  | 19465 |                        |  |    |        |
| 1640    | 160            | 1      | 93113                  | 148420             | 23443            | 18904  | 19242 |                        |  |    |        |
| 1650    | 160            | 1      | 92826                  | 148141             | 23088            | 18688  | 19102 |                        |  |    |        |
| 1660    | 160            | 1      | 92628                  | 147951             | 22823            | 18536  | 19013 |                        |  |    |        |
| 1670    | 160            | 1      | 92493                  | 147822             | 22624            | 18426  | 18955 |                        |  |    |        |
| 1680    | 160            | 1      | 92399                  | 147734             | 22474            | 18346  | 18918 |                        |  |    |        |
| 1690    | 160            | 1      | 92335                  | 147674             | 22359            | 18288  | 18893 |                        |  |    |        |
| 1700    | 160            | 1      | 92291                  | 147633             | 22272            | 18245  | 18877 |                        |  |    |        |
| 1710    | 160            | 1      | 92260                  | 147605             | 22205            | 18213  | 18867 |                        |  |    |        |
| 1720    | 160            | 1      | 92239                  | 147586             | 22154            | 18190  | 18860 |                        |  |    |        |
| 1730    | 160            | 1      | 92224                  | 147573             | 22114            | 18173  | 18855 |                        |  |    |        |
| 1740    | 160            | 1      | 92214                  | 147565             | 22084            | 18160  | 18852 |                        |  |    |        |
| 1750    | 160            | 1      | 92207                  | 147559             | 22060            | 18150  | 18851 |                        |  |    |        |
| 1760    | 260            | 1      | 91423                  | 146778             | 21227            | 17334  | 18076 |                        |  |    |        |
| 1770    | 260            | 1      | 90806                  | 146174             | 20486            | 16608  | 17454 |                        |  |    |        |
| 1780    | 260            | 1      | 90376                  | 145759             | 19886            | 16000  | 16986 |                        |  |    |        |

| Periodo | Total Capturas | Fuente | ABUNDANCIAS HISTÓRICAS |                    |                  |        |       |                        |       | CV | Fuente |
|---------|----------------|--------|------------------------|--------------------|------------------|--------|-------|------------------------|-------|----|--------|
|         |                |        | Alter <i>et al.*</i>   | Modelo Tradicional | Modelo Corregido | SOLVER | ADMB  | Abundancias Observadas |       |    |        |
| 1790    | 260            | 1      | 90075                  | 145474             | 19389            | 15469  | 16618 |                        |       |    |        |
| 1800    | 260            | 1      | 89864                  | 145278             | 18969            | 14990  | 16319 |                        |       |    |        |
| 1810    | 260            | 1      | 89715                  | 145143             | 18610            | 14544  | 16070 |                        |       |    |        |
| 1820    | 260            | 1      | 89611                  | 145049             | 18299            | 14120  | 15857 |                        |       |    |        |
| 1830    | 260            | 1      | 89537                  | 144985             | 18026            | 13705  | 15674 |                        |       |    |        |
| 1840    | 260            | 1      | 89485                  | 144940             | 17784            | 13293  | 15513 |                        |       |    |        |
| 1850    | 328            | 1      | 89190                  | 144652             | 17300            | 12601  | 15103 |                        |       |    |        |
| 1860    | 676            | 1      | 87252                  | 142732             | 15020            | 9977   | 12882 |                        |       |    |        |
| 1870    | 328            | 1      | 85992                  | 141541             | 12651            | 6766   | 10441 |                        |       |    |        |
| 1880    | 141            | 1      | 87232                  | 142826             | 12730            | 5682   | 10368 |                        |       |    |        |
| 1890    | 100            | 1      | 89016                  | 144600             | 13959            | 5603   | 11474 |                        |       |    |        |
| 1900    | 40             | 1      | 90900                  | 146443             | 15950            | 6290   | 13437 |                        |       |    |        |
| 1910    | 30             | 1      | 92398                  | 147887             | 18088            | 7382   | 15652 |                        |       |    |        |
| 1920    | 22             | 1      | 93451                  | 148890             | 20010            | 8709   | 17634 |                        |       |    |        |
| 1930    | 35             | 1      | 93944                  | 149342             | 21370            | 10003  | 18904 |                        |       |    |        |
| 1940    | 125            | 1      | 94355                  | 149724             | 22526            | 11562  | 19815 |                        |       |    |        |
| 1950    | 11             | 1      | 94597                  | 149945             | 23355            | 13151  | 20336 |                        |       |    |        |
| 1960    | 173            | 1      | 94489                  | 149820             | 23708            | 14564  | 20336 |                        |       |    |        |
| 1968    | 201            | 1      | 93623                  | 148949             | 23090            | 14725  | 19596 | 13776                  | 0.078 | 3  |        |
| 1969    | 214            | 1      | 93529                  | 148854             | 23018            | 14739  | 19521 | 12869                  | 0.055 | 3  |        |
| 1970    | 151            | 1      | 93426                  | 148751             | 22936            | 14741  | 19437 | 13431                  | 0.056 | 3  |        |
| 1971    | 153            | 1      | 93390                  | 148714             | 22920            | 14806  | 19420 | 11416                  | 0.051 | 3  |        |
| 1972    | 182            | 1      | 93352                  | 148677             | 22901            | 14868  | 19402 | 10406                  | 0.059 | 3  |        |
| 1973    | 178            | 1      | 93288                  | 148612             | 22855            | 14901  | 19355 | 16098                  | 0.051 | 3  |        |
| 1974    | 184            | 1      | 93229                  | 148553             | 22813            | 14938  | 19315 | 15960                  | 0.054 | 3  |        |

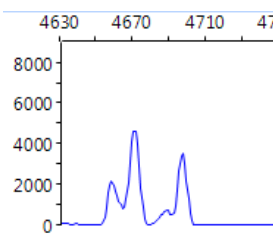
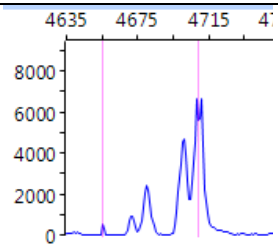
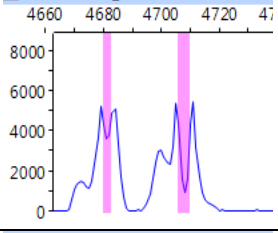
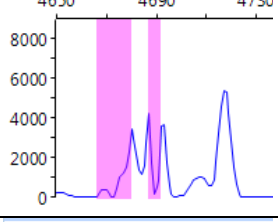
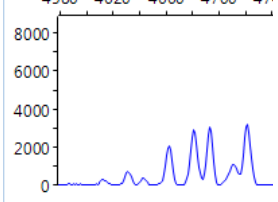
**ABUNDANCIAS HISTÓRICAS**

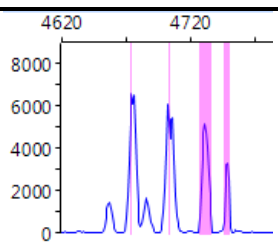
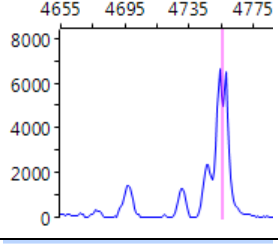
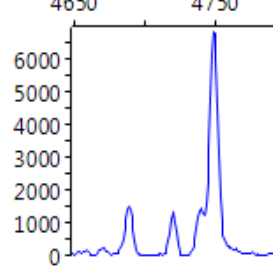
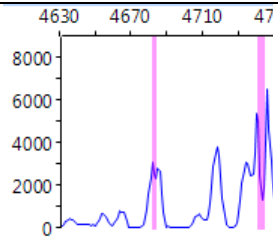
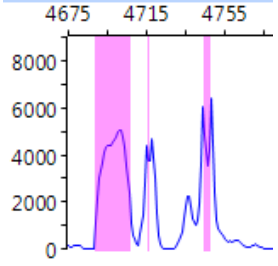
| <b>Periodo</b> | <b>Total Capturas</b> | <b>Fuente</b> | <b>Alter <i>et al.</i>*</b> | <b>Modelo Tradicional</b> | <b>Modelo Corregido</b> | <b>SOLVER</b> | <b>ADMB</b> | <b>Abundancias Observadas</b> | <b>CV</b> | <b>Fuente</b> |
|----------------|-----------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------|-------------|-------------------------------|-----------|---------------|
| 1975           | 171                   | 1             | 93167                       | 148491                    | 22767                   | 14969         | 19271       | 13812                         | 0.0565    | 3             |
| 1976           | 165                   | 1             | 93120                       | 148444                    | 22735                   | 15012         | 19241       | 15481                         | 0.06      | 3             |
| 1977           | 187                   | 1             | 93081                       | 148405                    | 22710                   | 15061         | 19219       | 16317                         | 0.0501    | 3             |
| 1978           | 184                   | 1             | 93021                       | 148346                    | 22664                   | 15088         | 19176       | 17996                         | 0.0694    | 3             |
| 1979           | 183                   | 1             | 92967                       | 148292                    | 22622                   | 15117         | 19138       | 13971                         | 0.0539    | 3             |
| 1980           | 181                   | 1             | 92915                       | 148240                    | 22582                   | 15147         | 19103       | 17447                         | 0.0564    | 3             |
| 1985           | 170                   | 2             | 92768                       | 148095                    | 22483                   | 15383         | 19030       | 22862                         | 0.0603    | 3             |
| 1986           | 171                   | 2             | 92737                       | 148064                    | 22460                   | 15424         | 19012       | 21444                         | 0.0522    | 3             |
| 1988           | 151                   | 2             | 92689                       | 148016                    | 22425                   | 15515         | 18989       | 22250                         | 0.0501    | 3             |
| 1993           | 0                     | 2             | 92742                       | 148072                    | 22507                   | 15894         | 19099       | 18844                         | 0.0632    | 3             |
| 1994           | 44                    | 2             | 92881                       | 148212                    | 22654                   | 16100         | 19249       | 24638                         | 0.0599    | 3             |
| 1996           | 43                    | 2             | 93018                       | 148349                    | 22806                   | 16374         | 19400       | 24065                         | 0.0579    | 3             |
| 1998           | 125                   | 2             | 93153                       | 148483                    | 22957                   | 16646         | 19545       | 29758                         | 0.1049    | 3             |
| 2000           | 115                   | 2             | 93152                       | 148482                    | 22975                   | 16783         | 19552       |                               |           |               |
| 2001           | 112                   | 2             | 93162                       | 148492                    | 22993                   | 16860         | 19566       | 19448                         | 0.0967    | 3             |
| 2002           | 131                   | 2             | 93174                       | 148504                    | 23013                   | 16938         | 19582       | 18178                         | 0.0979    | 3             |
| 2003           | 128                   | 2             | 93167                       | 148497                    | 23015                   | 16996         | 19577       |                               |           |               |
| 2004           | 111                   | 2             | 93163                       | 148493                    | 23019                   | 17055         | 19577       |                               |           |               |
| 2005           | 124                   | 2             | 93176                       | 148506                    | 23040                   | 17130         | 19593       |                               |           |               |
| 2006           | 134                   | 2             | 93200                       | 148529                    | 23071                   | 17215         | 19619       |                               |           |               |
| 2007           | 132                   | 2             | 93223                       | 148552                    | 23101                   | 17298         | 19644       | 20110                         | 0.0878    | 4             |
| 2008           | 130                   | 2             | 93245                       | 148574                    | 23131                   | 17379         | 19668       |                               |           |               |

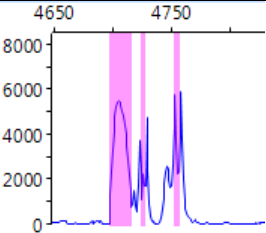
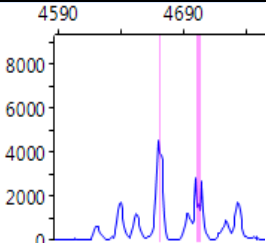
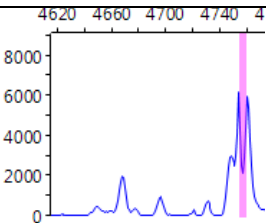
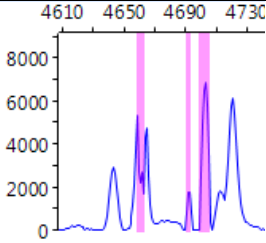
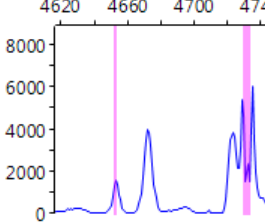
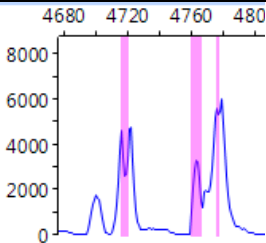
\* Alter *et al.* 2007, abundancia histórica de 96,400 individuos; CV = Coeficiente de Variación;  
1 = Butterworth *et al.* 2002; 2 = IWC 2010; 3 = Rugh *et al.* 2005; 4 = Rugh *et al.* 2008

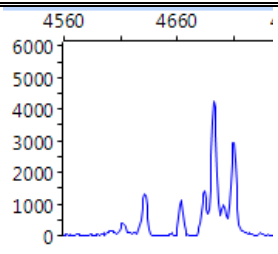
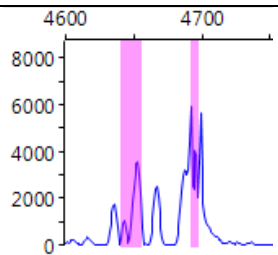
### Anexo 3

#### Perfiles SSCP para la segregación de alelos DQB exón 2 *Mhc-II* de ballena gris del Pacífico Nororiental.

| Patrón | Perfil                                                                              | Frecuencia |    |     |       | Individuos | Individuos Clonados |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|----|-----|-------|------------|---------------------|
|        |                                                                                     | LSI        | BM | LOL | Total |            |                     |
| A      |    | 10         | 7  | 12  | 29    | OL04       |                     |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | OL05       | SI08                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM01       | OL09                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM06       | SI10                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM17       | SI13                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM20       | OL11                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM24       | SI16                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM33       | OL13                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM34       | SI23                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       |            | OL14                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       |            | OL05                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       |            | OL09                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       |            | OL14                |
| Aa     |   | 2          | 3  | 2   | 7     | BM02       | OL03                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM07       | SI09                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM25       | SI14                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       |            | OL16                |
| Ab     |  | 0          | 2  | 0   | 2     | BM03       |                     |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM11       | -                   |
| Ac     |  | 0          | 1  | 0   | 1     | BM09       | -                   |
|        |                                                                                     |            |    |     |       |            | -                   |
| B      |  | 0          | 3  | 1   | 4     | BM05       |                     |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM08       | OL26                |
|        |                                                                                     |            |    |     |       | BM10       | -                   |
|        |                                                                                     |            |    |     |       |            | BM10                |

| Patrón | Perfil                                                                              | Frecuencia |    |     |       | Individuos           |                                                              | Individuos Clonados                                                  |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|----|-----|-------|----------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|        |                                                                                     | LSI        | BM | LOL | Total |                      |                                                              |                                                                      |
| Ba     |    | 1          | 0  | 0   | 1     | -                    | -                                                            | SI03                                                                 |
| C      |    | 3          | 3  | 0   | 6     | BM04<br>BM29<br>BM30 | -                                                            | SI02<br>SI18<br>SI19<br>BM29                                         |
| Ca     |   | 8          | 2  | 8   | 18    | BM13<br>BM26         | OL02<br>OL12<br>OL18<br>OL19<br>OL21<br>OL24<br>OL27<br>OL29 | SI04<br>SI11<br>SI12<br>SI17<br>SI20<br>SI21<br>SI22<br>SI25<br>SI25 |
| D      |  | 0          | 1  | 1   | 2     | BM15                 | OL08                                                         | -<br>BM15                                                            |
| E      |  | 1          | 0  | 0   | 1     | -                    | -                                                            | SI15<br>SI15                                                         |

| Patrón | Perfil                                                                              | Frecuencia |    |     |       | Individuos   |      |      | Individuos Clonados |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|----|-----|-------|--------------|------|------|---------------------|
|        |                                                                                     | LSI        | BM | LOL | Total |              |      |      |                     |
| Ea     |    | 0          | 1  | 0   | 1     | BM16         | -    | -    | BM16                |
| F      |    | 1          | 0  | 1   | 2     | -            | OL20 | SI06 | OL20                |
| G      |   | 0          | 1  | 1   | 2     | BM31         | OL01 | -    | OL01                |
| Ga     |  | 0          | 1  | 0   | 1     | BM12         | -    | -    | BM12                |
| H      |  | 0          | 2  | 0   | 2     | BM14<br>BM19 | -    | -    | -                   |
| Ha     |  | 0          | 1  | 0   | 1     | BM22         | -    | -    | -                   |

| Patrón | Perfil                                                                            | Frecuencia |    |     |       | Individuos | Individuos Clonados |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|----|-----|-------|------------|---------------------|
|        |                                                                                   | LSI        | BM | LOL | Total |            |                     |
| Hb     |  | 0          | 0  | 1   | 1     | - OL07     | -                   |
| I      |  | 0          | 0  | 1   | 1     | - OL06     | -                   |
|        |                                                                                   | Total      |    |     |       | 83         | 15                  |

## Anexo 4

### Perfiles SSCP poco frecuentes y exclusivos de las Lagunas de Reproducción de ballena gris del Pacífico Nororiental.

| Laguna          | Num. Perfiles SSCP | Perfiles SSCP exclusivos | Hembras Haplotipos | Machos Haplotipos |
|-----------------|--------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|
| Bahía Magdalena | 13                 | Ab                       | D                  | AB                |
|                 |                    | Ac                       | C                  |                   |
|                 |                    | Ea                       | B                  |                   |
|                 |                    | Ga                       | ENPGW28            |                   |
|                 |                    | H                        | AI                 | G                 |
|                 |                    | Ha                       | K                  |                   |
|                 |                    | B©                       | A (2 ind)<br>T     |                   |
|                 |                    | D©<br>G©                 | ENPGW15<br>AA      |                   |
| Ojo de Liebre   | 9                  | Hb                       | ENPGW28            |                   |
|                 |                    | I                        |                    | R                 |
|                 |                    | B©                       |                    | A                 |
|                 |                    | D©                       | B                  |                   |
|                 |                    | F©                       |                    | AD                |
|                 |                    | G©                       | A                  |                   |
| San Ignacio     | 7                  | Ba                       | K                  |                   |
|                 |                    | E                        | AD                 |                   |
|                 |                    | F©                       | H                  |                   |
| Total           |                    |                          | 17                 | 5                 |

© = Perfiles SSCP que se comparten entre lagunas. Los perfiles SSCP exclusivos para cada laguna de reproducción se resaltan en negrita.

## Anexo 5

**Total de individuos clonados, y número de clonas secuenciadas para el locus DQB exón 2 *Mhc*-II.**

### a) Ballena gris del Pacífico Nororiental

| Número       | Individuo | Haplotipo materno | # Clonas secuenciadas | # Secuencias utilizadas | # Alelos distintos |
|--------------|-----------|-------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| 1            | SI03      | hK                | 5                     | 1                       | 1                  |
| 2            | SI15      | hAD               | 10                    | 6                       | 4                  |
| 3            | SI25      | hL                | 5                     | 2                       | 2                  |
| 4            | BM03      | hD                | 5                     | 1                       | 1                  |
| 5            | BM10      | hA                | 5                     | 1                       | 1                  |
| 6            | BM12      | ENPGW28           | 5                     | 2                       | 1                  |
| 7            | BM15      | ENPGW15           | 5                     | 5                       | 5                  |
| 8            | BM16      | hB                | 5                     | 2                       | 2                  |
| 9            | BM29      | hB                | 5                     | 2                       | 2                  |
| 10           | OL01      | hA                | 35                    | 28                      | 13                 |
| 11           | OL05      | hG                | 5                     | 3                       | 3                  |
| 12           | OL09      | hE                | 5                     | 1                       | 1                  |
| 13           | OL14      | hAC               | 5                     | 4                       | 3                  |
| 14           | OL16      | hK                | 5                     | 1                       | 1                  |
| 15           | OL20      | hAD               | 5                     | 1                       | 1                  |
| <b>Total</b> |           |                   | <b>110</b>            | <b>60</b>               |                    |

SI = Laguna San Ignacio, BM = Bahía Magdalena, OL = Laguna Ojo de Liebre

### b) Ballena azul del Golfo de California

| Número       | Individuo | # Clonas secuenciadas | # Secuencias utilizadas | # Alelos distintos |
|--------------|-----------|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| 1            | 395Bm     | 4                     | 3                       | 2                  |
| 2            | 638Bm     | 7                     | 6                       | 4                  |
| <b>Total</b> |           | <b>11</b>             | <b>9</b>                |                    |

Bm = *Balaenoptera musculus*

**c) Ballena de aleta del Golfo de California**

| <b>Número</b> | <b>Individuo</b> | <b># Clonas<br/>secuenciadas</b> | <b># Secuencias<br/>utilizadas</b> | <b># Alelos<br/>distintos</b> |
|---------------|------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| <b>1</b>      | 30Bp             | 5                                | 5                                  | 5                             |
| <b>2</b>      | 39Bp             | 4                                | 2                                  | 2                             |
| <b>Total</b>  |                  | <b>9</b>                         | <b>7</b>                           |                               |

Bp = *Balaenoptera physalus*

## Anexo 6

### Secuencias utilizadas para la reconstrucción filogenética de la historia evolutiva de secuencias *Mhc-II* de mamíferos.

#### a) Secuencias para el gen DQB exón 2

| No. Acceso al banco de genes | Especie                         | Alelo           |
|------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| DQ354635                     | <i>Eschrichtius robustus</i>    | EsroWa397-DQB*1 |
| DQ354636                     | <i>Eschrichtius robustus</i>    | EsroWa002-DQB*2 |
| DQ300261                     | <i>Balaenoptera physalus</i>    | BaphGC-DQB*01   |
| DQ300262                     | <i>Balaenoptera physalus</i>    | BaphGC-DQB*02   |
| DQ300263                     | <i>Balaenoptera physalus</i>    | BaphGC-DQB*03   |
| AB164202                     | <i>Balaenoptera bonaerensis</i> | Babo-a          |
| AB164203                     | <i>Balaenoptera bonaerensis</i> | Babo-b          |
| AB164204                     | <i>Balaenoptera bonaerensis</i> | Babo-c          |
| AB164205                     | <i>Balaenoptera bonaerensis</i> | Babo-d          |
| DQ354625                     | <i>Balaena mysticetus</i>       | Bamy92004-DQB*3 |
| DQ354624                     | <i>Balaena mysticetus</i>       | Bamy92004-DQB*2 |
| DQ354623                     | <i>Balaena mysticetus</i>       | Bamy92004-DQB*1 |
| DQ354630                     | <i>Eubalaena australis</i>      | Euau-DQB*1c     |
| DQ354631                     | <i>Eubalaena australis</i>      | Euau-DQB*2c     |
| DQ354632                     | <i>Eubalaena australis</i>      | Euau-DQB*3c     |
| DQ354633                     | <i>Eubalaena australis</i>      | Euau-DQB*4c     |
| DQ354634                     | <i>Eubalaena australis</i>      | Euau-DQB*5c     |
| DQ354664                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>   | MenoSEA-DQB*23c |
| DQ354663                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>   | MenoSEA-DQB*22c |
| DQ354662                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>   | MenoSEA-DQB*21c |
| DQ354661                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>   | MenoSEA-DQB*20c |
| DQ354660                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>   | MenoSEA-DQB*19c |
| DQ354659                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>   | MenoSEA-DQB*18c |
| DQ354658                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>   | MenoSEA-DQB*17c |
| AB164200                     | <i>Balaenoptera musculus</i>    | Bamu-a          |
| AB302044                     | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*1      |
| AB302045                     | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*2      |
| AB302046                     | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*3      |
| AB302047                     | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*4      |
| AB302048                     | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*5      |
| AB302049                     | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*6      |
| AB302050                     | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*7      |

| <b>No. Acceso al banco de genes</b> | <b>Especie</b>                  | <b>Alelo</b>       |
|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| AB302051                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*8         |
| AB302053                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*10        |
| AB302054                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*11        |
| AB302055                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*12        |
| AB302056                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*13        |
| AB302057                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*14        |
| AB302058                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*15        |
| AB302059                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*16        |
| AB302060                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*17        |
| AB302061                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*18        |
| AB302062                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*19        |
| AB302063                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*20        |
| AB302064                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*21        |
| AB302065                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*22        |
| AB302066                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*23        |
| AB302067                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*24        |
| EF690298                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*06        |
| EF690297                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*05        |
| EF690296                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*04        |
| EF690295                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*03        |
| EF690294                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*02        |
| EF690293                            | <i>Tursiops truncatus</i>       | Tutr-DQB*01        |
| AY177153                            | <i>Lipotes vexillifer</i>       | MHC DQB-Live-DQB*4 |
| AY177152                            | <i>Lipotes vexillifer</i>       | MHC DQB-Live-DQB*3 |
| AY177151                            | <i>Lipotes vexillifer</i>       | MHC DQB-Live-DQB*2 |
| AY177150                            | <i>Lipotes vexillifer</i>       | MHC DQB-Live-DQB*1 |
| AY170897                            | <i>Phocoena sinus</i>           | Phsi-DQB*01        |
| DQ914412                            | <i>Phocoena spinipinnis</i>     | DQB*0101           |
| AB164211                            | <i>Phocoena phocoena</i>        | Phph-a             |
| AB164212                            | <i>Neophocaena phocaenoides</i> | Neph-a             |
| AB164213                            | <i>Neophocaena phocaenoides</i> | Neph-b             |
| AB164214                            | <i>Neophocaena phocaenoides</i> | Neph-c             |
| U16986                              | <i>Delphinapterus leucas</i>    | Dele-DQ beta-0101  |
| U16988                              | <i>Delphinapterus leucas</i>    | Dele-DQ beta-0103  |
| U16989                              | <i>Delphinapterus leucas</i>    | Dele-DQ beta-0201  |
| U16990                              | <i>Delphinapterus leucas</i>    | Dele-DQ beta-0202  |
| DQ354628                            | <i>Cephalorhynchus hectori</i>  | CeheBP02-DQB*1     |
| DQ354629                            | <i>Cephalorhynchus hectori</i>  | CeheBP02-DQB*2     |

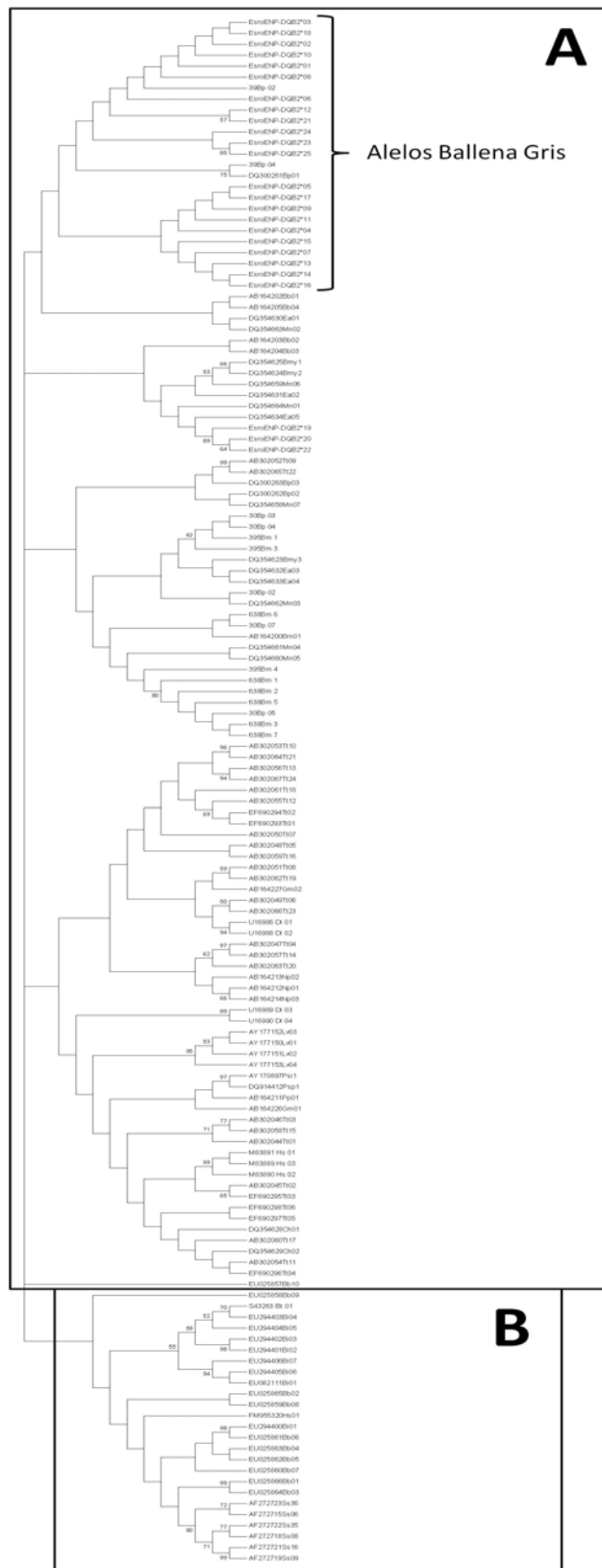
| <b>No. Acceso al banco de genes</b> | <b>Especie</b>                    | <b>Alelo</b> |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| AB164227                            | <i>Globicephala macrorhynchus</i> | Glma-b       |
| FM955320                            | <i>Homo sapiens</i>               | HLA-DQB*03   |
| M83891                              | <i>Homo sapiens</i>               | HUMHLAAC     |
| M83890                              | <i>Homo sapiens</i>               | HUMHLAAB     |
| S43263                              | <i>Bos taurus</i>                 | BoLA-DQB     |
| EU294406                            | <i>Bos indicus</i>                | BoLA-DQB*7   |
| EU294405                            | <i>Bos indicus</i>                | BoLA-DQB*6   |
| EU294404                            | <i>Bos indicus</i>                | BoLA-DQB*5   |
| EU294403                            | <i>Bos indicus</i>                | BoLA-DQB*4   |
| EU294402                            | <i>Bos indicus</i>                | BoLA-DQB*3   |
| EU294401                            | <i>Bos indicus</i>                | BoLA-DQB*2   |
| EU294400                            | <i>Bos indicus</i>                | BoLA-DQB*1   |
| EU082111                            | <i>Bos indicus</i>                | BoLA-DQB*a   |
| EU025866                            | <i>Bubalus bubalis</i>            | MHC-DQB*J    |
| EU025865                            | <i>Bubalus bubalis</i>            | MHC-DQB*I    |
| EU025864                            | <i>Bubalus bubalis</i>            | MHC-DQB*H    |
| EU025863                            | <i>Bubalus bubalis</i>            | MHC-DQB*G    |
| EU025862                            | <i>Bubalus bubalis</i>            | MHC-DQB*F    |
| EU025861                            | <i>Bubalus bubalis</i>            | MHC-DQB*E    |
| EU025860                            | <i>Bubalus bubalis</i>            | MHC-DQB*D    |
| EU025859                            | <i>Bubalus bubalis</i>            | MHC-DQB*C    |
| EU025858                            | <i>Bubalus bubalis</i>            | MHC-DQB*B    |
| EU025857                            | <i>Bubalus bubalis</i>            | MHC-DQB*A    |
| AF272723                            | <i>Sus scrofa</i>                 | SLA-DQB*P36  |
| AF272722                            | <i>Sus scrofa</i>                 | SLA-DQB*P35  |
| AF272721                            | <i>Sus scrofa</i>                 | SLA-DQB*P16  |
| AF272719                            | <i>Sus scrofa</i>                 | SLA-DQB*P09  |
| AF272718                            | <i>Sus scrofa</i>                 | SLA-DQB*P08  |
| AF272715                            | <i>Sus scrofa</i>                 | SLA-DQB*P06  |

## b) Secuencias para el gen DRB exón 2

| No. Acceso al banco de genes | Especie                        | Alelo               |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| DQ354678                     | <i>Eschrichtius robustus</i>   | EsroWa408-DRB*1c    |
| DQ354689                     | <i>Phocarcos hookeri</i>       | Phho93-32-DRB*0402  |
| DQ354688                     | <i>Physeter catodon</i>        | Phma04-DRB*c        |
| DQ354687                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>  | MenoWA94020-DRB*5   |
| DQ354686                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>  | MenoWA94016-DRB*3   |
| DQ354685                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>  | MenoSEA88060-DRB*4c |
| DQ354684                     | <i>Megaptera novaeangliae</i>  | MenoSEA88060-DRB*2c |
| DQ354672                     | <i>Balaenoptera physalus</i>   | BaphM08-DRB*1       |
| DQ354673                     | <i>Balaenoptera physalus</i>   | BaphM08-DRB*2       |
| DQ354674                     | <i>Balaenoptera physalus</i>   | BaphM08-DRB*3       |
| DQ354668                     | <i>Balaenoptera musculus</i>   | Bamu94003-DRB*2     |
| DQ354667                     | <i>Balaenoptera musculus</i>   | Bamu94003-DRB*1     |
| DQ354666                     | <i>Balaenoptera musculus</i>   | Bamu94001-DRB*3c    |
| DQ354675                     | <i>Cephalorhynchus hectori</i> | CeheBP18-DRB        |
| DQ354676                     | <i>Eubalaena australis</i>     | EuauWA9511-DRB2*1c  |
| DQ914413                     | <i>Phocoena sinus</i>          | DRB*0101            |
| DQ914414                     | <i>Phocoena sinus</i>          | DRB*0102            |
| DQ914415                     | <i>Phocoena spinipinnis</i>    | DRB*0101            |
| DQ914416                     | <i>Phocoena spinipinnis</i>    | DRB*0102            |
| DQ914417                     | <i>Phocoena spinipinnis</i>    | DRB*0103            |
| AF012939                     | <i>Monodon monoceros</i>       | Momo-DRB*0101       |
| AF012940                     | <i>Monodon monoceros</i>       | Momo-DRB*0102       |
| AF012938                     | <i>Delphinapterus leucas</i>   | DRB2*0601           |
| AF458914                     | <i>Ursus maritimus</i>         | Urma-DRB*01         |
| AF458915                     | <i>Ursus maritimus</i>         | Urma-DRB*02         |
| AF458916                     | <i>Ursus maritimus</i>         | Urma-DRB*03         |
| AF458917                     | <i>Ursus maritimus</i>         | Urma-DRB*04         |
| DQ354665                     | <i>Bison bison</i>             | Bibi-DRB            |
| AM911051                     | <i>Macaca fascicularis</i>     | Mafa-DRB1*0701Like  |
| FJ210712                     | <i>Panthera tigris</i>         | Pati-DRB*0302       |
| AF272725                     | <i>Sus scrofa</i>              | SLA-DRB*P02         |
| AF272724                     | <i>Sus scrofa</i>              | SLA-DRB*P01         |
| EU918395                     | <i>Lynx lynx</i>               | Lyly-DRB*01         |
| EU918396                     | <i>Lynx lynx</i>               | Lyly-DRB*02         |
| EU918397                     | <i>Lynx lynx</i>               | Lyly-DRB*03         |

**c) Secuencias de cDNA para el gen DQB exón 2**

| <b>No. Acceso al<br/>banco de genes</b> | <b>Especie</b>                | <b>Alelo</b> |
|-----------------------------------------|-------------------------------|--------------|
| EF507876                                | <i>Tursiops aduncus</i>       | Tuad-DQB*03  |
| EF507875                                | <i>Tursiops aduncus</i>       | Tuad-DQB*02  |
| EF017816                                | <i>Tursiops aduncus</i>       | Tuad-DQB     |
| EF507877                                | <i>Tursiops truncatus</i>     | Tutr-DQB*02  |
| EF507878                                | <i>Tursiops truncatus</i>     | Tutr-DQB*03  |
| EF017815                                | <i>Tursiops truncatus</i>     | Tutr-DQB     |
| AF503397                                | <i>Zalophus californianus</i> | Zaca-DQB*01  |
| AF503398                                | <i>Zalophus californianus</i> | Zaca-DQB*02  |
| AF503399                                | <i>Zalophus californianus</i> | Zaca-DQB*03  |
| AF503400                                | <i>Zalophus californianus</i> | Zaca-DQB*04  |
| EF017819                                | <i>Hippopotamus amphibius</i> | Hiam-DQB     |
| AY135571                                | <i>Sus scrofa</i>             | SLA-DQB*t    |
| AY135569                                | <i>Sus scrofa</i>             | SLA-DQB*ax   |
| AY135568                                | <i>Sus scrofa</i>             | SLA-DQB*w    |
| DQ908903                                | <i>Bubalus bubalis</i>        | BuLA-DQB*1   |



**Anexo 7**

**Reconstrucción filogenética de la historia evolutiva de secuencias DQB exón 2 MHC-II de ballena gris y otros cetartiodáctilos. Modelo de sustitución nucleotídica GTR con Distribución Gamma (0.6144). Sobre las ramas se indican los valores de remuestreo (10,000 replicas) que las sustentan.**

## Anexo 8

**Asignación del sexo, haplotipo, patrón SSCP y alelos DQB por individuo clonado. SI = Laguna San Ignacio, BM = Bahía Magdalena, OL = Laguna Ojo de Liebre.**

|           | <b>Individuo</b> | <b>Sexo</b> | <b>Haplotipo materno</b> | <b>Patrón SSCP</b> | <b>Alelos DQB exón 2<br/><i>Mhc-II</i></b>                                                                                          |
|-----------|------------------|-------------|--------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1</b>  | SI03             | H           | hK                       | Ba                 | <i>Esro</i> ENP-DQB2*01                                                                                                             |
| <b>2</b>  | SI15             | H           | hAD                      | E                  | <i>Esro</i> ENP-DQB2*12<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*13<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*14<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*15                            |
| <b>3</b>  | SI25             | M           | hL                       | Ca                 | <i>Esro</i> ENP-DQB2*09<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*16                                                                                  |
| <b>4</b>  | BM03             | H           | hD                       | Ab                 | <i>Esro</i> ENP-DQB2*10                                                                                                             |
| <b>5</b>  | BM10             | H           | hA                       | B                  | <i>Esro</i> ENP-DQB2*20                                                                                                             |
| <b>6</b>  | BM12             | H           | ENPGW28                  | Ga                 | <i>Esro</i> ENP-DQB2*04                                                                                                             |
| <b>7</b>  | BM15             | H           | ENPGW15                  | D                  | <i>Esro</i> ENP-DQB2*04<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*05<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*10<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*11<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*19 |
| <b>8</b>  | BM16             | H           | hB                       | Ea                 | <i>Esro</i> ENP-DQB2*12<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*19                                                                                  |
| <b>9</b>  | BM29             | H           | hB                       | C                  | <i>Esro</i> ENP-DQB2*04<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*10                                                                                  |
| <b>10</b> | OL01             | H           | hA                       | G                  | <i>Esro</i> ENP-DQB2*01,<br>02, 03, 04, 06, 07,<br>08, 11, 17, 19, 23,<br>24, 25                                                    |
| <b>11</b> | OL05             | M           | hG                       | A                  | <i>Esro</i> ENP-DQB2*12<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*18<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*19                                                       |
| <b>12</b> | OL09             | H           | hE                       | A                  | <i>Esro</i> ENP-DQB2*19                                                                                                             |
| <b>13</b> | OL14             | M           | hAC                      | A                  | <i>Esro</i> ENP-DQB2*12<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*19<br><i>Esro</i> ENP-DQB2*22                                                       |
| <b>14</b> | OL16             | H           | hK                       | Aa                 | <i>Esro</i> ENP-DQB2*13                                                                                                             |
| <b>15</b> | OL20             | M           | hAD                      | F                  | <i>Esro</i> ENP-DQB2*21                                                                                                             |

## Anexo 9

### Características relevantes de la Demografía e Historia de Vida, Diversidad neutral y Diversidad Adaptativa de algunas especies de mamíferos marinos.

| Especie                                                                        | Demografía e Historia de Vida                                                                | Diversidad Neutral (# Haplotipos ADNmit)                               | Diversidad Adaptativa (# Alelos DQB exón 2)                    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>MISTICETOS</b>                                                              |                                                                                              |                                                                        |                                                                |
| <b><i>Eschrichtius robustus</i></b><br>Ballena gris<br>Pacífico Nororiental    | Intensamente cazada, actualmente recuperada                                                  | Alta (34); Le Duc <i>et al.</i> 2002, este trabajo                     | Alta con eventos de duplicación (25); este trabajo             |
| <b><i>Balaenoptera musculus</i></b><br>Ballena azul<br>Golfo de California     | Agregación invernal con actividades de crianza, población pequeña; ver Enríquez-Paredes 2005 | Moderada (17); Enríquez-Paredes 2005                                   | Moderada con eventos de duplicación (6)a; este trabajo         |
| <b><i>Balaenoptera physalus</i></b><br>Ballena de aleta<br>Golfo de California | Población aislada, con tamaño efectivo poblacional reducido; Bérubé <i>et al.</i> 2002       | Baja (3), consistente con población aislada; Bérubé <i>et al.</i> 2002 | Moderada con eventos de duplicación (7)a; este trabajo         |
| <b><i>Megaptera novaeangliae</i></b><br>Ballena jorobada                       | Intensamente cazada, en actual incremento poblacional; Baker <i>et al.</i> 1993              | Alta (37); Baker <i>et al.</i> 1993                                    | Alta con eventos de duplicación (23); Baker <i>et al.</i> 2006 |
| <b><i>Eubalaena australis</i></b><br>Ballena franca<br>Población del Sur       | Intensamente cazada, aparentemente recuperada y estructurada; Patenaude <i>et al.</i> 2007   | Alta (37); Patenaude <i>et al.</i> 2007                                | Alta con eventos de duplicación (5)b; Baker <i>et al.</i> 2006 |

| Especie                                                                 | Demografía e Historia de Vida                                                                                  | Diversidad Neutral (# Haplotipos ADN mit)                                                                            | Diversidad Adaptativa (# Alelos DQB exón 2)                                    |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ODONTOCETOS</b>                                                      |                                                                                                                |                                                                                                                      |                                                                                |
| <b><i>Lipotes vexillifer</i></b><br>Baiji, Delfin chino del Río Yangtze | Extinta debido a actividad humana e impacto a su hábitat; Yang <i>et al.</i> 2005                              | Baja; Yang <i>et al.</i> 2003                                                                                        | Alta con eventos de duplicación (43); Yang <i>et al.</i> 2005                  |
| <b><i>Neophocaena phocaenoides</i></b><br>Marsopa sin aleta             | Población del Indo-Pacífico, estructurada. Pob. del Río Yangtze en declive y en peligro; Xu <i>et al.</i> 2007 | Baja (17), debido a una divergencia poblacional reciente; Yang <i>et al.</i> 2002                                    | Moderada con eventos de duplicación (14); Xu <i>et al.</i> 2007                |
| <b><i>Orcinus orca</i></b><br>Orca                                      | Pob. grandes, altamente sociales, con tamaño efectivo poblacional reducido; Hoelzel <i>et al.</i> 2002         | Baja (13), debido a cuello de botella histórico, y expansión matrilineal de pob. locales; Hoelzel <i>et al.</i> 2002 | Baja (5 por población); Vassilakos <i>et al.</i> 2009                          |
| <b><i>Tursiops truncatus</i></b><br>Tonina ecotipo pelágico             | Cosmopolita, con morfotipos; Natoli <i>et al.</i> 2004                                                         | Alta (66); Natoli <i>et al.</i> 2004                                                                                 | Baja (7 por población), con altos valores de dN; Vassilakos <i>et al.</i> 2009 |
| <b><i>Tursiops aduncus</i></b><br>Tonina ecotipo costero                | Costero del Sur de África, en peligro por muerte incidental, población estructurada; Natoli <i>et al.</i> 2008 | Baja (6), consistente con efecto fundador; Natoli <i>et al.</i> 2008                                                 | Baja (7), con altos valores de dN; Vassilakos <i>et al.</i> 2009               |
| <b><i>Delphinapterus leucas</i></b><br>Beluga                           | Protegida, en peligro, y vulnerable. Poblaciones pequeñas; ver Murray <i>et al.</i> 1995                       | Baja (7); O'Corry-Crowe <i>et al.</i> 2010                                                                           | Baja (5); Murray <i>et al.</i> 1995                                            |

| Espece                                                             | Demografía e Historia de Vida                                                                      | Diversidad Neutral (# Haplotipos ADN mit)                                                 | Diversidad Adaptativa (# Alelos DQB exón 2) |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>ODONTOCETOS</b>                                                 |                                                                                                    |                                                                                           |                                             |
| <b><i>Monodon monoceros</i></b><br>Narval                          | Moderadamente cazada, población regulada, poco conocimiento sobre parámetros biológicos; WDCS 2004 | Baja (5); Palsbøll <i>et al.</i> 1997                                                     | Baja (1); Murray <i>et al.</i> 1995         |
| <b><i>Phocoena sinus</i></b><br>Vaquita marina                     | Endémica del Alto Golfo de California, población históricamente reducida                           | Baja (1); ver Munguía-Vega <i>et al.</i> 2007                                             | Baja (1); Munguía-Vega <i>et al.</i> 2007   |
| <b>PINÍPEDOS</b>                                                   |                                                                                                    |                                                                                           |                                             |
| <b><i>Phocarctos hookeri</i></b><br>Leon marino de Nueva Zelanda   | Endémico, intensamente cazada, NO recuperada; ver Lento <i>et al.</i> 2003                         | Baja, consistente con declive poblacional y de distribución; ver Lento <i>et al.</i> 2003 | Baja (2); Lento <i>et al.</i> 2003          |
| <b><i>Mirounga angustirostris</i></b><br>Elefante marino del norte | Severamente cazada, remarcablemente recuperada; ver Weber <i>et al.</i> 2004                       | Baja (2), consistente con cuello de botella poblacional; Hoelzel <i>et al.</i> 2002       | Baja (2); Weder <i>et al.</i> 2004          |
| <b><i>Mirounga leonina</i></b><br>Elefante marino del sur          | Estructura geográfica entre poblaciones, sin flujo genético; Slade <i>et al.</i> 1998              | Alta (38); Slade <i>et al.</i> 1998                                                       | Moderada (8); Hoelzel <i>et al.</i> 1999    |

a = Resultado de dos individuos analizados, b = Resultado de un individuo analizado