

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



Parentesco entre ballenas azules (*Balaenoptera musculus*) con distintos patrones de asociación en el Golfo de California, México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

NELVA LORENA VICTORIA COTA

Ensenada, Baja California, México.
Agosto de 2010

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

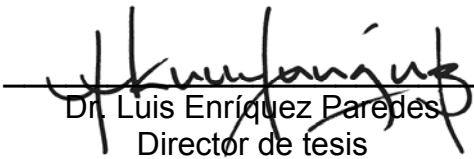
Parentesco entre ballenas azules (*Balaenoptera musculus*) con
distintos patrones de asociación en el Golfo de California, México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA

NELVA LORENA VICTORIA COTA

Aprobada por


Dr. Luis Enriquez Paredes
Director de tesis


M. en C. Iviza Martínez Serrano
Sinodal


Dra. Diane Gendron
Sinodal

RESUMEN

La incorporación de marcadores genéticos moleculares al estudio de la organización social en poblaciones silvestres ofrece una poderosa alternativa en la construcción de un modelo de su estructura social a través del análisis de las relaciones de parentesco y las afinidades sociales. Con base en el historial de avistamientos y las muestras de tejido epidérmico de 92 ballenas azules foto-identificadas, se exploró por primera vez, la influencia del nivel de parentesco en los distintos patrones de asociación de la especie en el Golfo de California. Para ello, se estimaron los niveles de parentesco entre los individuos con base en los genotipos *multilocus* (16 microsatélites), integrando además la información sobre los patrones de asociación y la identificación molecular del sexo y de los haplotipos mitocondriales reportada en un par de estudios previos. Se realizaron comparaciones del nivel de parentesco dentro y entre grupos de individuos con distintos patrones de asociación, definidos con base en las frecuencias de avistamiento y asociación directa, así como bajo criterios de asociación indirecta a escala espacial y temporal. El parentesco global fue muy bajo ($R= 0.06 \pm 0.01$), indicando que la mayoría de los individuos no están relacionados cercanamente. En ninguno de los patrones y criterios de asociación considerados se encontraron valores de parentesco significativamente diferentes al promedio global, lo que sugiere que las asociaciones se dan tanto entre parientes cercanos, como entre individuos sin parentesco. No obstante, se evidenció cierta tendencia a que los individuos que se asocian con mayor frecuencia entre ellos, no tienen lazos fuertes de parentesco. Por otro lado, pese a que se observaron relaciones filiales entre individuos de distinto clado mitocondrial, se detectaron diferencias significativas en el parentesco entre los dos clados de linajes maternos que se han reportado para la zona. En conjunto, los resultados del presente estudio sugieren que alguna ventaja ecológica a nivel individual o grupal, y no la selección por parentesco, está mediando los patrones de asociación y la críptica organización social de la ballena azul. Finalmente, tomando en cuenta el elevado polimorfismo de los microsatélites empleados, los bajos niveles de parentesco y la baja frecuencia de valores de parentesco esperados para poblaciones con depresión endogámica, estos resultados también permiten inferir que las agregaciones de ballena azul del Golfo de California reflejan un tamaño efectivo poblacional y un estado de salud genética adecuados, confirmando así la importancia del área como un hábitat crítico para la crianza, el reclutamiento y la preservación de la diversidad genética de la especie.

ABSTRACT

The incorporation of genetic molecular markers to the study of social organization of wildlife populations provides a powerful alternative in the construction of a model on their social structure through the analysis of relatedness and social affinities. Based on the sighting history and epidermal tissue samples from 92 photoidentified blue whales, the present study explores, for the first time, the influence of relatedness in the association patterns of the species in the Gulf of California. To accomplish this, relatedness was estimated from *multilocus* genotyping (16 microsatellites) individuals, for which previous data on association patterns, gender and mitochondrial haplotypes were available. Mean relatedness was estimated within and among individuals grouped in terms of direct sighting and association frequency, as well as with a criterion for indirect association on a temporal and spatial scale. Overall relatedness was very low ($R = 0.06 \pm 0.01$), thus indicating that most individuals are not close relatives. None of the association patterns or grouping criteria tested showed significantly higher relatedness than overall mean relatedness, suggesting that associations occur between both related and non-related individuals. However, there was slight evidence pointing out that, individuals which frequently associate between them, have no strong relatedness ties. In the other hand, even when filial relationships were found between individuals from different mitochondrial clade, there was a significant difference in the mean relatedness between the two clades of maternal lineages that are known to occur in the study area. All together, the results here presented suggest that some ecological advantage at the individual level, but not kinship, in mediating the association patterns and the cryptic social organization of the blue whales. Finally, considering the high polymorphism of the microsatellites employed, the weak overall relatedness and the low frequency of relatedness values expected for endogamic depressed populations, these results allow also to infer that blue whale aggregations from the Gulf of California have a good effective population size and genetic health status, thus highlighting the study area as a critical habitat for nursing, recruitment and preservation of genetic diversity for the species.

AGRADECIMIENTOS

Por todo el apoyo proporcionado durante estos tres años de posgrado quiero expresar mi eterna gratitud al Dr. Luis Enríquez. Por incluirme en el proyecto de ballena azul, por tenerme paciencia en el laboratorio y por inculcarme las bases sobre las técnicas moleculares. Aún más importante fue la confianza (proporcionada la suya e incrementada la propia) y el haber aprendido lo que cuesta obtener resultados que sean confiables y reproducibles...y además ¡emocionantes! El lograr descifrar códigos antes totalmente inaccesibles para mi, aplicados a una especie tan complicada como el pequeño ratón barbudo, me llevó a comprender los múltiples caminos que pueden seguirse para llegar a conocer una mínima parte de su historia de vida. Sin el entusiasmo de Luis por este proyecto probablemente me hubiera perdido entre las olas. Aunque no hay palabras para demostrar lo mucho que te agradezco, espero esta pequeña aportación haya dado aunque sea un poco de lo que desde el inicio imaginaste.

A la M en C Ibiza Martínez por su ayuda en esto del animal social y del que usa algoritmos, que en algunas ocasiones era el mismo. Por sus grandes aportes al desarrollo y fin (parcial) de este trabajo. Por adoptarme y brindarme su amistad, sus conocimientos y apoyo moral. Especialmente por haberme dedicado bastante de su limitado tiempo, ya que al tiempo que revisaba este trabajo tenía también que terminar el de su doctorado.

A la Dra. Diane Gendron por permitirme participar en el proyecto Ballena azul, por proporcionarme toda la información de la base de datos y el tejido para los análisis moleculares. Mayor es mi agradecimiento por haber aceptado formar parte de mi comité y por sus valiosas observaciones a este trabajo. Definitivamente tus revisiones ayudaron a mejorar el escrito para dar una idea más clara de lo obtenido.

A Azucena Ugalde por su excepcional esfuerzo y dedicación por mantener actualizada la base de datos de ballena azul, que fue la fuente de gran parte de la información utilizada en esta tesis. Su experiencia y su arduo trabajo con el catálogo de fotoidentificación resolvieron muchas de mis dudas. Gracias!

A mi compañera de generación y de laboratorio Sandra Moreno, por ayudarme con los programas de parentesco y compartir su gigantesca biblioteca molecular de artículos. Y aunque no nos viéramos tan seguido, por ser tan optimista e inyectarme parte de su entusiasmo por el estudio molecular de los cetáceos sociales y antisociales.

Quiero agradecer también a la Dra. Raquel Muñoz por haberme facilitado su laboratorio en tiempos de crisis, cuando en el de Ecología Molecular fallaba el termociclador. También el voto de confianza y la invitación para integrarme laboralmente a su laboratorio, justo cuando terminó mi beca.

A mi generación de maestría por los grupos de trabajo y estudio. Aunque no siempre el esfuerzo se vea reflejado en los resultados, agradezco la unión de mentes y dos o tres ideas de índole

filosófico y tres o cuatro comidas con la treinta-ñera que quiere ser próspera y coqueta (chiste local, disculpe ud.).

Todos agradecen a sus compañeros de laboratorio, pero en ese lugar tan pequeño llamado laboratorio de Ecología Molecular había demasiada gente.... Como no quiero omitir nombres, mejor agradezco de manera global tanto a aquellas como a aquellos (y ya que los agradecimientos no son curriculares, no debe haber problema por no enlistar nombres...) por andar en el camino y por no incendiar el lugar.

También agradezco a quienes nada tuvieron que ver con trabajo pero me apoyaron en tiempos de crisis bipolares y no se pandearon. Principalmente a mi familia porque casi no me ven y de todos modos no reclaman que no esté mucho tiempo con ellos (bueno sólo a veces, lo cual aplica también para los no consanguíneos). A mis hermanas putativas, las que me dieron sobrinos que no he tenido tiempo de maleducar y las que no pretenden tenerlos pronto pero me dejan comportar como uno (¿mani manito?). A amigos que he dejado (no en el olvido) por vivir en el estrés y antisocialismo; a los que veo de lejos, a los que veo de cerca, a los que ya no me quieren ver y a los que ya no puedo ver ☺.

Especialmente a Luis, Denise e Ibiza por vivir tan de cerca este trabajo y mis momentos más oscuros, por darme ánimos siempre que fue necesario (sospecho agoté recursos), cuando me parecía que no podía con la chamba y pensaba seriamente en irme a vender mole a la primera. Por el apoyo de aquí o de allá y porque aguantaron como los machos... y espero sigan aguantando (sí no es mucho pedir).

Sin duda esta tesis refleja años de esfuerzo para la toma de datos y muestras, por ello quiero agradecer de manera especial a todos los cicimareños involucrados en este proyecto, tanto en laboratorio como en campo, porque sin el trabajo de todos ellos no se tendría tanta información sobre este minúsculo cetáceo. Lamentablemente no los he podido conocer a todos, pero aquí les dejo todas mis gratitudes.

De igual forma, agradezco a la Facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas, autoridades, secretarías y administrativos en general por todo su apoyo y por aguantar lo fastidioso del papeleo y mi falta de entusiasmo por el mismo.

Finalmente, aunque no menos importante, agradezco CONACyT por proporcionarme la beca 208425, que financió mi vida académica y no académica por dos largos años, lo que me permitió sacar adelante esta investigación.

No sé de mojo o las chicas, sólo espero que siga todo bajo control...

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Estudio de la organización social en misticetos.	5
2.2. Estudio de la organización social en la ballena azul en el Golfo de California.....	8
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo general	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
4. METODOLOGÍA.....	12
4.1. Selección de individuos y estimación de la matriz de asociación.....	15
4.1.1. Actualización de los registros de asociación individual: Categorías y patrones de asociación.....	15
4.1.2. Actualización de los datos moleculares: Identificación del sexo y de los linajes maternos.	18
4.1.3. Criterios de selección de conjunto de individuos para el análisis de los niveles de parentesco.	18
4.1.4. Estimación de la frecuencia de asociación.....	19
4.2. Estimación de la distancia genética haplotípica.	20
4.3. Genotipado y estimación de los coeficientes de parentesco.....	20
4.3.1. Optimización y control de calidad de la amplificación de los microsatélites.	20
4.3.2. Control de calidad del genotipado.	23
4.3.3. Estimación de los coeficientes de parentesco.....	27
4.4. Análisis estadísticos: Comparación de los niveles de parentesco entre categorías y patrones de asociación.	29
5. RESULTADOS	31
5.1. Selección de Individuos.....	31
5.2. Matriz de asociación.....	33
5.3. Matriz de divergencia genética haplotípica.	34
5.4. Genotipado y matriz de parentesco.....	35
5.4.1. Genotipado.....	35
5.4.2. Desempeño de los estimadores de parentesco.	36
5.4.3. Matriz de parentesco.	37

5.5. Correlación entre las matrices de asociación, parentesco y divergencia haplotípica.	39
5.6. Comparación de los niveles de parentesco entre individuos con distintos patrones de asociación indirecta.	43
5.6.1. Categorías basadas en las frecuencias de asociación y la frecuencia de avistamiento en la zona.	44
5.6.2. Asociación indirecta: Grupos núcleo.	45
5.6.3. Asociación indirecta: Temporal.....	47
5.7. Comparación de los niveles de parentesco entre clados de linajes maternos.....	49
5.8. Análisis multidimensional.	50
6. DISCUSIÓN	53
6.1. Aspectos metodológicos.....	54
6.1.1. Confiabilidad del genotipado.	54
6.1.2. Confiabilidad de la estimación de los coeficientes de parentesco.....	55
6.1.3. Representatividad de la muestra de individuos seleccionados.	56
6.2. Parentesco entre individuos de ballena azul con distintos patrones de asociación en el Golfo de California.	58
6.3. Parentesco entre individuos de ballena azul con respecto a los linajes maternos.....	60
6.4. La organización social de la ballena azul en el Golfo de California y su relación con el uso del hábitat.	62
6.5. Aspectos relacionados con el estado actual de la población y las estrategias de conservación.	66
6.5.1. Estado actual de la población.....	66
6.5.2. El Golfo de California como hábitat crítico de la ballena azul.....	68
7. CONCLUSIONES.....	70
8. LITERATURA CITADA.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Condiciones para la amplificación por PCR de los microsatélites analizados en ballenas azules del Golfo de California..	23
Tabla II. Características de las categorías de asociación.....	32
Tabla III. Diversidad genética por microsatélite.....	35
Tabla IV. Correlación entre las matrices de asociación, parentesco y divergencia haplotípica incluyendo toda la muestra.....	40
Tabla V. Correlación entre las matrices de asociación, parentesco y divergencia haplotípica incluyendo sólo a los individuos con asociación directa.....	42
Tabla VI. Estadísticos descriptivos por categoría de asociación.	45
Tabla VII. Estadísticos descriptivos por grupo núcleo	46
Tabla VIII. Estadísticos descriptivos por año.	48
Tabla IX. Estadísticos descriptivos por mes.	48
Tabla X. Estadísticos descriptivos por clado mitocondrial.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio. Ubicación de la zona donde se ha hecho el registro de ballenas azules (Porción Sur del Golfo de California).	13
Figura 2. Distribución de frecuencia de las asociaciones directas observadas en las parejas de individuos analizadas (92 ballenas azules con 4186 parejas).....	33
Figura 3. Distribución de frecuencia de los valores de divergencia genética haplotípica obtenidos mediante el método de Tamura-Nei.	34
Figura 4. Correlación entre los métodos de verosimilitud (ML) y momentos (MER) para los valores de parentesco.	37
Figura 5. Distribución de frecuencia de los valores de parentesco de las ballenas analizadas.....	38
Figura 7. Análisis dimensional (ACP) de las distancias genéticas entre clados mitocondriales (A) y entre las categorías de asociación núcleos - solitarios (B).....	50
Figura 8. Análisis de componentes principales de las categorías de asociación de núcleos - crías (A) y solitarios - crías (B).....	52

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Protocolos de amplificación por PCR del sistema ZFX-ZFY de los cromosomas sexuales y del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial (dHVI-RC-mt).	80
Apéndice 2. Microsatélites polimórficos reportados para la ballena azul que fueron probados en el presente estudio	81
Apéndice 3. Árbol filogenético y frecuencias relativas de los linajes maternos de ballena azul en el Golfo de California.	85
Apéndice 4. Coeficiente de parentesco y distancia genética mitocondrial de las parejas madre-cría conocidas incluidas en el presente estudio.	86
Apéndice 5. Correlación entre las frecuencias de asociación, el parentesco y la distancia genética mitocondrial.....	87
Apéndice 6. Correlación entre la frecuencia de asociación y el parentesco entre parejas con asociación directa.....	88
Apéndice 7. Ejemplos puntuales de algunas de las relaciones de parentesco observadas en las ballenas azules que ocupan el Golfo de California.....	89
Apéndice 8. Proporción de sexos, haplotipos y parentesco promedio de las categorías de asociación.	90
Apéndice 9. Grupos núcleo obtenidos mediante los algoritmos de Martínez-Serrano (2005).....	91
Apéndice 10. Proporción de sexos, haplotipos y parentesco promedio de los grupos núcleo.	93
Apéndice 11. Proporción de sexos, haplotipos y parentesco promedio de los años analizados.....	94
Apéndice 12. Proporción de sexos, haplotipos y parentesco promedio de los meses analizados.	95
Apéndice 13. Proporción de sexos y parentesco promedio de los clados mitocondriales donde se agrupan los 92 individuos analizados.	96

1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad a nivel mundial enfrenta una crisis severa ya que, como consecuencia de la sobreexplotación y el deterioro del hábitat, muchas especies se encuentran amenazadas o en peligro de extinción (Rocha y Gasca 2007).

Dado que la reducción en la abundancia conlleva a la pérdida de la diversidad genética y a la endogamia, una de las estrategias de conservación que ha tomado auge en los últimos años es la protección de aquellos hábitat donde la diversidad de una especie es estable, para asegurar su variabilidad genética y que su capacidad de respuesta ante cambios ambientales se mantenga (Erwin 1991, Moritz 2002).

Para llevar a cabo un manejo efectivo que permita la conservación de las especies, es necesario entender a detalle aspectos como las causas de su comportamiento y el uso del hábitat. Esto es particularmente relevante en especies que exhiben cierto nivel de organización o en las que el desarrollo de lazos sociales estrechos, la preferencia por el uso del hábitat y los recursos alimentarios pueden hacerlos altamente dependientes y más susceptibles a los cambios del hábitat (Goerlitz *et al.* 2003).

En el estudio de la organización social se exploran las causas de las interacciones de los individuos, desde pares hasta grupos complejos con el fin de elucidar las fuerzas de cohesión subyacente, así como su magnitud y

estabilidad (e.g. Wolf y Trillmich 2008). Es esta estabilidad en las interacciones sociales la que define el destino genético y evolutivo de las poblaciones, al mediar el flujo de genes entre ellas (O'Brien 1994, Avise 1998, Hughes 1998, Oliehoek *et al.* 2006).

De acuerdo con Alexander (1974), el establecimiento de las asociaciones entre individuos estará en función de que los beneficios superen los costos (Krause y Ruxton 2002). En consecuencia, el desarrollo y mantenimiento de los grupos sociales estará fuertemente influenciado tanto por la disponibilidad de recursos como por el hábitat. Evolutivamente, la razón costo-beneficio del comportamiento social se traduce en el éxito reproductivo de cada individuo o la prevalencia de sus genes en la siguiente generación (Hamilton 1964); aunque el éxito reproductivo puede estimarse fácilmente a través del pedigrí, para la mayoría de las poblaciones silvestres no existe información detallada de esto.

Comúnmente, el estudio de las interacciones en poblaciones silvestres se ha efectuado a través de observaciones directas de los individuos. Sin embargo, además de requerir una gran cantidad de tiempo y esfuerzo para reunir los datos, en diversas ocasiones no es posible establecer de manera confiable el nivel de parentesco en la mayoría de los individuos de la población. Con el acelerado desarrollo tecnológico en el campo de la biología molecular, los marcadores genéticos (e.g. microsatélites o SSRs y los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs) se han convertido en una poderosa herramienta en la

inferencia de las relaciones de parentesco cuando no se cuenta con el pedigrí (Barnard 1983, 2004; Queller y Goodnight 1989, Ross 2001, Yu *et al.* 2001, Wang 2004, Weir *et al.* 2006, Pemberton 2008, Wolf y Trillmich 2008).

La incorporación de las técnicas moleculares a estudios poblacionales ha evidenciado que la organización social de las poblaciones silvestres es mucho más compleja de lo que se había inferido. Sin embargo, con ayuda de estas técnicas, actualmente puede integrarse de manera más rápida y precisa, información referente al sexo de los individuos y sus relaciones de parentesco; elementos clave en el estudio de la dispersión, las interacciones sociales y las estrategias reproductivas. Todas estas aproximaciones marcan la pauta para entender la relación entre los cambios ambientales y la evolución del comportamiento social (Hughes 1998, Crnokrak y Roff 1999, Hedrick y Kalinowski 2000, Reed y Frankham 2001, Keller y Waller 2002).

Este escenario tan prometedor cobra aún mayor importancia cuando las especies de interés se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, y en las que además, por la naturaleza de su comportamiento y las características de su hábitat, presentan dificultades logísticas que limitan en gran medida la colecta de datos y muestras, requiriendo de estudios a largo plazo para obtener información relevante para su conservación.

Tal es el caso de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) que, al igual que otros mysticetos, estuvo sujeta a una intensa caza comercial que redujo considerablemente sus poblaciones; razón por la que se ha catalogado como especie amenazada. Su amplia distribución, sus movimientos migratorios y su capacidad de comunicación a larga distancia, hacen que el número efectivo de interacciones sociales observables en el campo sea reducido (Whitehead *et al.* 2000, Hucke *et al.* 2004, McDonald *et al.* 2006, Bourret *et al.* 2008).

Pese a lo anterior, existe un importante conjunto de datos sobre los individuos de ballena azul que migran hacia el Golfo de California durante la temporada invernal. Esta información, hizo posible estudiar por primera vez su nivel de organización social a través de sus relaciones de parentesco. Para ello, en este trabajo se integraron los registros de asociación individual, así como la información molecular sobre el sexo y los linajes maternos analizados anteriormente (Enríquez-Paredes 2005, Martínez-Serrano 2005), a la estimación del parentesco a través del genotipado con microsatélites.

2. ANTECEDENTES

2.1. Estudio de la organización social en misticetos.

La organización social de los misticetos, tanto en altas como en bajas latitudes, no exhibe la estabilidad y la cohesión característica de muchas especies de odontocetos, donde se observa una clara estructura social en la que los individuos pueden permanecer asociados por varios años (Connor *et al.* 1998), como en el caso de los cachalotes (*Physeter macrocephalus*: Richard *et al.* 1996, Gero 2008), las orcas (*Orcinus orca*: Bigg *et al.* 1990) y las ballenas piloto de aleta larga (*Globicephala melas*: Amos *et al.* 1991; Ottensmeyer y Whitehead, 2003), en los que la cohesión entre los individuos aparentemente esta mediada por la afinidad al grupo materno.

En contraste, se conoce muy poco sobre el comportamiento y la organización social de los misticetos debido a que presentan en general una distribución geográfica más amplia y a que sus patrones de migración aún no se conocen con detalle (Hoelzel 1998). Si bien, eventualmente pueden observarse grandes agregaciones de misticetos en las zonas de alimentación, no existe evidencia sólida que indique si en tales grupos hay una estructura social subyacente o si reflejan simplemente la coincidencia y aprovechamiento simultáneo del recurso (Clapham 1996, Valsecchi *et al.* 2002).

El escaso número de trabajos donde se abordan aspectos sobre las afiliaciones de grupo o los patrones de asociación en misticetos, es un claro reflejo de las dificultades logísticas del estudio de este grupo de cetáceos. Aunque se reconoce una cierta diferencia en la sociabilidad de los individuos en función del sexo, siendo las hembras más sociables (e.g. ballena jorobada: Weinrich y Kuhlberg 1991, Clapham 1996, Valsecchi 2002, Szabo y Duffus 2008; ballena franca: Best *et al.* 2005; ballena azul: Sears *et al.* 2001, Martínez-Serrano 2005), los grupos pequeños y las asociaciones de corta duración parecen ser el patrón común de los misticetos (Connor 2000).

A pesar de que el uso de marcadores genéticos moleculares, particularmente de los haplotipos mitocondriales y de los microsatélites, se ha extendido ampliamente en el estudio de las poblaciones de misticetos (Valsecchi y Amos 1996, Bourret *et al.* 2008), en muy pocas de las especies se han aplicado métodos que permitan avanzar en la construcción de un modelo de estructura social (Whitehead 2000).

Los contados estudios en los que se aborda la organización social en misticetos a través de la información obtenida con marcadores moleculares, se han realizado hasta ahora en la ballena jorobada. Al ser la especie de misticeto mejor y más ampliamente estudiada a nivel mundial, cuenta con un sólido marco de referencia teórico y gran cantidad de observaciones de campo sobre los patrones de asociación, lo que ha permitido el planteamiento de hipótesis

sobre la influencia de las relaciones de parentesco en la organización social de esta especie. Por ejemplo, Valsecchi y colaboradores (2002), reportaron un patrón de asociación inestable entre las ballenas jorobadas durante su fase de migración, así como niveles de parentesco bajos en las asociaciones. Por otro lado, considerando que los individuos de esta especie forman asociaciones más estables (Weinrich y Kuhlberg 1991), particularmente en una zona de alimentación del Atlántico Norte, Weinrich y sus colaboradores (2006) encontraron que dichas asociaciones aparentemente están mediadas por del linaje materno.

El potencial de los marcadores moleculares para el estudio de las poblaciones de misticetos se ha orientado principalmente a la delimitación de stocks con base en la distribución de los haplotipos mitocondriales y las frecuencias alélicas de marcadores microsatélites. En la gran mayoría de las especies se han evidenciado poblaciones estructuradas y una fuerte filopatría materna. Este es el caso tanto para la ballena azul *Balaenoptera musculus* (LeDuc *et al.* 2007), como para el rorcual común *Balaenoptera physalus* (Bérubé *et al.* 1998), la ballena jorobada *Megaptera novaeangliae* (Palsbøll *et al.* 1995, Valsecchi *et al.* 2002, Weinrich *et al.* 2006), la ballena de cabeza arqueada *Balaena mysticetus* (Rooney *et al.* 1999, Jorde *et al.* 2007) y la ballena gris *Eschrichtius robustus* (LeDuc *et al.* 2002, Lang *et al.* 2010).

Aunque todos estos estudios sugieren la existencia de una organización social críptica, cuya estructura aparentemente esta mediada por las hembras, el potencial que ofrece el importante número de microsatélites específicos disponibles en misticetos, no ha sido utilizado para explorar con mayor detalle el nivel de parentesco de los individuos inmersos en este esquema de estructura social materna.

2.2. Estudio de la organización social en la ballena azul en el Golfo de California.

Un número importante de ballenas azules de la población del Océano Pacífico Norte migra a lo largo de la costa occidental de la Península de Baja California e ingresa al Golfo de California durante el invierno, en donde permanece hasta finales de primavera (Calambokidis *et al.* 1990, Gendron 1990, 2002). Estudios de fotoidentificación a largo plazo de estos individuos han evidenciado que los tiempos de residencia y las tasas de retorno interanual son significativamente mayores en las hembras, lo que ha llevado a sugerir que esta zona es un hábitat crítico para la crianza y posiblemente para la reproducción (Gendron, 2002). Además, con base en los niveles de polimorfismo de la región control del ADN mitocondrial, Enríquez-Paredes (2005) encontró 18 linajes maternos entre las ballenas azules que ocupan el Golfo de California. De acuerdo con este

último autor, dichos linajes conforman dos clados divergentes que se distribuyen espacial y temporalmente de forma simultánea en la zona.

Lo anterior coincide con el patrón descrito en las poblaciones de otros misticetos, en el que aparentemente la estructura social está fuertemente influenciada por la filopatría matrilineal. No obstante, debido a que los linajes son uniparentales, no ha sido posible establecer si estos clados operan como una sola unidad poblacional en la zona o si existen diferencias importantes que mantengan los clados segregados o aislados reproductivamente (e.g. estructura social materna).

Martínez-Serrano (2005) estudió la organización social a través del análisis de la frecuencia de asociación espacio-temporal en ballenas azules fotoidentificadas en el Golfo de California y encontró que ciertos individuos exhiben patrones de asociación (afinidad con otros). De acuerdo a sus observaciones, algunos individuos, en su mayoría hembras reproductivamente activas, posiblemente mantienen la cohesión entre los miembros de los grupos. Esto la llevó a concluir que existe una organización social basada en asociaciones de corto plazo tipo fusión-fisión que, en conjunto, influyen la asociación de individuos a mayor escala. De nueva cuenta, las evidencias parecen indicar una fuerte presencia materna como base de la estructura social de este misticeto.

Para dar continuidad a los esfuerzos de investigación sobre esta especie, el siguiente paso hacia el entendimiento de su organización social requiere no sólo el análisis integral de la información referente a los linajes maternos y a los patrones de asociación entre los individuos, sino la incorporación de un marcador que permita establecer las relaciones de parentesco con un alto nivel de confiabilidad, de manera fácil y rápida. Los microsatélites ofrecen todas estas características (Lynch y Ritland 1999; Schlotterer 2004; Bourret *et al.* 2008), y es por ello que se eligieron como la herramienta molecular para el análisis de las relaciones de parentesco en individuos de ballena azul.

Ya que las agregaciones de ballena azul del Golfo de California constituyen parte del remanente poblacional más grande de la especie, considerado disminuido y estratégico para la conservación (Calambokidis y Barlow 2004); además de que la zona se ha reconocido como un hábitat crítico para su crianza y reclutamiento (Gendron 1990, 2002; Enríquez-Paredes 2005, Martínez-Serrano 2005), la información generada en este trabajo permitirá una planificación más completa de las estrategias de conservación necesarias para la especie.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el nivel de organización social de la ballena azul a través de la estimación de las relaciones de parentesco entre individuos con distintos patrones de asociación e interacción social.

3.2. Objetivos específicos

Evaluar y optimizar los marcadores microsatélites reportados para misticetos e identificar los más informativos para análisis de parentesco en ballena azul.

Estimar el coeficiente de parentesco entre las ballenas azules fotoidentificadas que visitan el Golfo de California durante la temporada invernal.

Comparar los niveles de parentesco entre y dentro de diferentes categorías de individuos definidas con base en su frecuencia de avistamiento, sus patrones de asociación y las relaciones filogenéticas de sus linajes maternos.

4. METODOLOGÍA

Desde 1988, el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN) inició un estudio a largo plazo sobre las ballenas azules que migran hacia el Golfo de California durante las temporadas de invierno y primavera. El área de estudio primaria se localiza en la porción suroeste del Golfo de California (Fig. 1), en un polígono que abarca la región costera entre Loreto y La Paz, así como las aguas adyacentes a las tres islas mayores de la zona (Isla Espíritu Santo, Isla San José, Isla Carmen e Isla Cerralvo). Es aquí donde se han registrado la mayoría de las ballenas fotoidentificadas (Gendron 2002) y en donde realizó el estudio previo sobre el patrón de asociaciones (Martínez-Serrano 2005). Para el desarrollo de la presente tesis se incluyeron principalmente a los individuos observados dentro de dicho polígono, pero también algunos individuos observados en otras zonas del Golfo de California.

Como primera etapa en el desarrollo del presente trabajo, se buscó integrar una muestra de individuos de ambos sexos en la que estuvieran representados distintos linajes maternos y distintos patrones de asociación o interacción social. Para ello, se actualizó y revisó específicamente la información sobre los patrones de asociación, la identificación molecular del sexo y la asignación de

los haplotipos maternos derivada de la base de datos y el catálogo de fotoidentificación de ballena azul propiedad del CICIMAR-IPN.

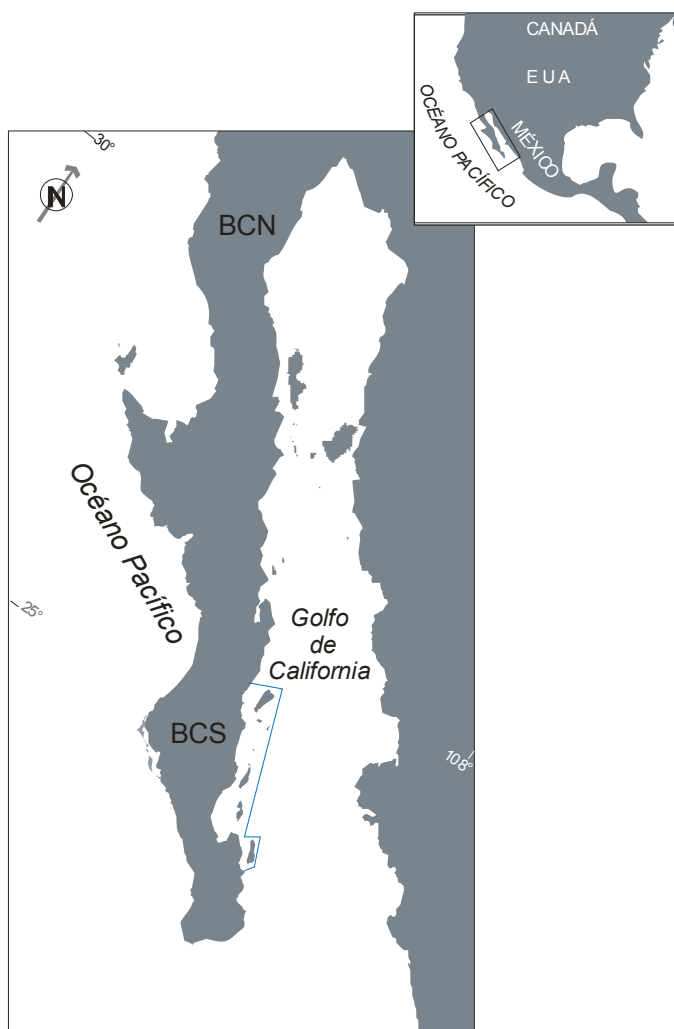


Figura 1. Área de estudio. Localización del polígono primario de búsqueda y fotoidentificación de las ballenas azules en el Golfo de California.

Una vez seleccionado el conjunto de individuos, se registro el número de asociaciones entre cada uno de ellos y se construyó una matriz de frecuencia de asociación.

En una segunda etapa y como primera aproximación a las relaciones de parentesco entre el conjunto de individuos seleccionados, se estimó la distancia genética a partir de sus linajes maternos.

Posteriormente, considerando que dentro de cada linaje materno pueden encontrarse relaciones de parentesco de diferente nivel (madres-hijos, hermanos, tíos, primos, abuelos, etc.), como tercera etapa se empleó un conjunto de *loci* microsatélites para estimar con mayor resolución el nivel de parentesco entre los individuos.

Finalmente, se integró la información y se contrastaron los niveles de parentesco entre los diferentes patrones de asociación a través de análisis estadísticos.

Las estrategias metodológicas seguidas en cada una de las cuatro etapas arriba referidas se describen con detalle a continuación.

4.1. Selección de individuos y estimación de la matriz de asociación.

4.1.1. Actualización de los registros de asociación individual: Categorías y patrones de asociación.

Para el desarrollo del presente trabajo, se actualizó la base de datos de ballena azul integrando la información de las temporadas más recientes hasta este análisis (2005-2006). Para ello se emplearon los algoritmos reportados por Martínez-Serrano (2005), los cuales mediante rutinas programadas en lenguaje Matlab filtraron el historial de avistamientos de individuos fotoidentificados y permitieron determinar el número de avistamientos y de asociaciones de cada individuo a la escala espacial y temporal requerida. Las categorías y patrones de asociación utilizados se describen a continuación:

Asociación directa: Frecuencias de avistamiento individual y de asociación directa entre individuos.

- Individuos exclusivamente solitarios (IES): Aquellos que fueron observados al menos una vez en la zona y en todos sus registros estuvieron solos.
- Individuos frecuentemente solitarios (IFS): Aquellos observados en la zona de estudio frecuentemente solos, aunque ocasionalmente se encontraron asociados con otros.

- Individuos núcleo (IN): Aquellos animales observados al menos cinco años en la zona de estudio, cuentan con al menos diez asociaciones con otros individuos y al menos 5 reavistamientos en la zona.
- Socios compartidos (SC): Organismos que se han observado asociados al menos a dos individuos núcleo en la zona de estudio.
- Socios exclusivos (SE): Animales que han sido observados asociados exclusivamente a un individuo núcleo en la zona de estudio.

Además de las categorías de asociación arriba mencionadas, se decidió incluir un par de filtros para otras dos categorías que, si bien no representan propiamente una asociación directa, ofrecen un importante punto de referencia para contrastar los patrones de asociación y los niveles de parentesco:

- Individuos foráneos (IF): Individuos que sólo se han observado fuera del área primaria de estudio y que, por lo tanto, no han sido registrados como asociados con ninguno de los individuos de las otras categorías (IES, IFS, IN, SC, y SE). Aparentemente no muestran preferencias por la zona donde la mayoría de los individuos han sido avistados.
- Crías (C): Individuos de talla menor a la de un adulto (entre $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{3}$ de la longitud del individuo que lo acompaña) y que pueden ser considerados como animales que nacieron durante la temporada. Al estar generalmente acompañados de un adulto, que se asume como su madre, representan una categoría de asociación en la que de antemano

se espera un alto parentesco y que funciona como centinela de los niveles de incertidumbre del genotipado y las estimaciones de parentesco.

Asociación indirecta: Grupos núcleo.

Los grupos núcleo están conformados por: el individuo núcleo (IN), sus socios exclusivos (SE) y sus socios compartidos (SC). Así por ejemplo, aunque dos individuos no se hayan observado juntos, pertenecen al mismo grupo núcleo por el hecho de haberse avistado, al menos en una ocasión, con el mismo individuo núcleo.

Asociación indirecta: Frecuencia de avistamiento a escala temporal.

Tomando en cuenta el carácter migratorio de la especie, se planteó la comparación de los niveles de parentesco de los individuos usando dos criterios de agrupación temporal (anual y mensual). Esto con el objeto de evaluar si, independientemente de que los individuos se asocien o no, diferentes grupos familiares ocupan el Golfo de California en diferentes años o bien si, conforme avanza la temporada invernal, distintos grupos familiares ingresan y permanecen en la zona (cronología migratoria).

A pesar de que el registro mensual incluyó individuos que se han observado desde principios de enero y hasta finales de julio en el área de estudio, para este análisis se consideraron sólo los meses de febrero a abril debido a que la mayoría de individuos presentes no se observaron en los meses extremos de la temporada (enero, mayo- julio).

4.1.2. Actualización de los datos moleculares: Identificación del sexo y de los linajes maternos.

Se actualizó la información referente a la identificación molecular del sexo y de los linajes maternos a través del análisis de las muestras correspondientes a las temporadas 2005-2006. Esta actualización incluyó la amplificación del sistema de genes ZFX-ZFY de los cromosomas sexuales y la secuenciación del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial (Apéndice 1).

4.1.3. Criterios de selección de conjunto de individuos para el análisis de los niveles de parentesco.

Las muestras de tejido epidérmico de ballena azul de banco de muestras del CICIMAR-IPN, corresponden a dos tipos de muestreo: invasivo (biopsia) y no invasivo (piel descamada).

Debido a que se ha demostrado que la cantidad y la calidad del ADN en las muestras de piel descamada son menores a las de las biopsias (Gendron y Mesnick 2001; Enríquez-Paredes 2005), y a que la degradación o la baja cantidad del ADN de una muestra puede generar la asignación incorrecta de los genotipos (Van Nieuwerburgh *et al.* 2009), se seleccionaron exclusivamente individuos con biopsia. De esta forma, además de reducir la probabilidad de introducir errores de genotipado, se garantizó de cierta forma la disponibilidad de suficiente ADN para el análisis de los marcadores genéticos.

Con la base de datos actualizada y tomando en cuenta los aspectos arriba mencionados, se seleccionó un conjunto de individuos en el que estuvieran representadas equitativamente las distintas categorías de asociación, ambos sexos y todos los linajes maternos. Con este grupo de individuos fue con el que se procedió a estimar el número de asociaciones, la distancia genética haplotípica y el coeficiente de parentesco entre ellos.

4.1.4. Estimación de la frecuencia de asociación.

Con base en los historiales individuales de avistamiento, se construyó una matriz de asociación en la que se registró el número de veces que cada par de

individuos se había observado asociado para después contrastarla con otros tipos de datos.

4.2. Estimación de la distancia genética haplotípica.

Se calculó la divergencia molecular entre las secuencias correspondientes al linaje materno de cada par de individuos. La matriz de distancias genéticas mitocondriales se construyó usando el programa MEGA v4 (Tamura *et al.* 2007) y con base en el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei con corrección Gamma ($\alpha = 0.2084$) reportado por Enríquez-Paredes (2005).

4.3. Genotipado y estimación de los coeficientes de parentesco.

4.3.1. Optimización y control de calidad de la amplificación de los microsatélites.

Como primer paso para realizar el genotipado se realizó una revisión bibliográfica para seleccionar un conjunto de marcadores microsatélites previamente probados en misticetos y en los que al menos dos alelos se hubieran reportado para ballena azul. Un total de 23 *loci* fueron probados en un par de muestras de ballena azul del Golfo de California con el objeto de

optimizar las condiciones de amplificación y evaluar su eficiencia para el genotipado (Apéndice 2). La optimización de las reacciones de amplificación por PCR de los microsatélites se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf MasterCycler® Gradient, bajo un estricto control de calidad.

Después de probar diferentes temperaturas, concentraciones de cloruro de magnesio y concentraciones de cebadores, se seleccionaron aquellos microsatélites con un producto de PCR claramente definido y con una intensidad adecuada (cantidad de producto) en los geles de agarosa.

Los productos de PCR de cada uno de los microsatélites se purificaron y secuenciaron para confirmar la presencia del microsatélite (unidades repetitivas) y la ausencia de artefactos de PCR (productos accesorios de tamaño diferente al fragmento esperado). De igual forma, los controles negativos de amplificación de cada microsatélite optimizado fueron secuenciados para evaluar la presencia de dímeros de primers que pudieran ser confundidos con alelos durante el genotipado.

En la tabla I se muestran las condiciones optimizadas de amplificación para los 21 microsatélites que fueron seleccionados para el genotipado en el presente estudio. Todas las amplificaciones se efectuaron en un termociclador Eppendorf MasterCycler® Gradient con una mezcla de reacción con una concentración final de 0.22 mM de Tris (pH 8.4), 55 mM de KCl, 0.22mM de dNTP's, 1.2 U de

Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen™) y a partir de 15 - 30ng/ μ L de ADN. El cebador hacia adelante (forward) de cada *locus* fue marcado con diferentes fluorocromos (6-FAM®, VIC® y NED® Applied Biosystems) para su posterior detección en un secuenciador automático.

Se utilizaron dos perfiles de amplificación (“L” y “C”). El perfil “L” consistió de 2 min de desnaturalización inicial a 94°C seguido de siete ciclos de 1 min a 96°C, 1 min $T^{\circ}C_1$ y 1 min a 72°C para desnaturalización, alineación y extensión respectivamente; después 25 ciclos de 1 min a 90°C, 1 min a $T^{\circ}C_2$ y 1 min a 72°C, para finalizar con una extensión de 15 min a 70°C. Para el perfil “C” se usó la misma desnaturalización inicial, pero seguida de siete ciclos de 20 s a 96°C, 30 s a $T^{\circ}C_1$ y 30 s a 72°C; una segunda sección de 25 ciclos a 20 s a 95°C, 30 s a $T^{\circ}C_2$ y 30 s a 72°C, adicionando por último un ciclo de extensión de 15 min a 70°C.

Tabla I. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR de los microsatélites con los que obtuvieron los genotipos multilocus de las ballenas azules del Golfo de California. Se indica el fluorocromo con el que se marcó el cebador, así como las temperaturas de alineamiento, las concentraciones de cloruro de magnesio y de los cebadores. El volumen referido corresponde al de la reacción de amplificación y el programa empleado en el termociclador.

Cebador	Fluorocromo	T°C ₁	T°C ₂	MgCl ₂ (mM)	Cebador (μM)	Volumen	Programa
DirFCB017	VIC®	51	52	3.9	0.18	14	C
Ev037	6-FAM®				0.54	14	
GT142	6-FAM®	58	58	3.1	0.25	14	C
GT238	NED®				0.54		
GT023	6-FAM®	60	58	3.1	0.54	14	C
GATA417	NED®				0.25	14	
AC082	NED®	60	60	3.1	0.43	14	C
CA141	6-FAM®	60	58	3.9	0.2	25	C
GATA053	NED®	60	58	3.1	0.25	14	C
AC045	NED®	54	54	3.1	0.18	14	C
GT122	VIC®	55	54	3.1	0.36	14	C
GT129	6-FAM®						
AC137	VIC®	55	54	3.1	0.36	14	C
CA234	6-FAM®						
AC087	VIC®	56	55	3.1	0.36	14	C
GT227	6-FAM®						
CA232	NED®	56	55	3.1	0.36	14	C
GT541	VIC®						
CAAA074	NED®	58	57	3.9	0.3	25	L
GATA098	6-FAM®	51	52	4.7	0.28	25	L
GATA028	VIC®	58	57	3.1	0.54	14	L

4.3.2. Control de calidad del genotipado.

Para garantizar que las condiciones de amplificación del conjunto de muestras seleccionadas fueran las mismas, se preparó la mezcla de reacción para todas las muestras de cada corrida y se amplificaron en placas de 96 pozos. En cada corrida se incluyeron dos controles negativos (reactivos sin ADN) para monitorear problemas de contaminación y cinco muestras por duplicado para confirmar la reproducibilidad de la amplificación y la correcta asignación al nombrar los alelos por su tamaño en pares de bases (Apéndice 2). Tanto los

controles negativos como los duplicados se distribuyeron aleatoriamente dentro de las placas.

Para confirmar la calidad y la eficiencia de la amplificación, la mitad del volumen de cada reacción de PCR se evaluó en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Los productos de PCR con distinto fluorocromo se mezclaron y diluyeron con agua nanopura (4-8 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de cada producto) para su posterior análisis en el secuenciador automático.

Las placas con las diluciones de los microsatélites marcados se enviaron a un laboratorio comercial (Seqxcel, Inc), donde se realizó el análisis de los fragmentos, separando los productos de PCR según su peso molecular a través de una electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems). El tamaño de los alelos se estimó con respecto a un marcador de peso molecular (GeneScan™ 600® LIZ, Applied Biosystems) que se agregó a cada muestra durante la electroforesis.

Los archivos digitales de los electroferogramas, que son gráficos donde se registra la intensidad de la señal fluorescente para cada alelo y la estimación de su tamaño en pares de bases dependiendo del número de repeticiones, fueron analizados en el programa GeneMarker V1.85 (SoftGenetics LLC); el cual despliega los electroferogramas y permite la asignación del tamaño de los

alelos y la construcción del genotipo *multilocus* de cada individuo (ver Selkoe y Toonen 2006).

El registro del tamaño de los alelos (allele calling) se efectuó por tres observadores de forma independiente, contrastando posteriormente sus registros para evaluar la consistencia en la asignación de los alelos. Aquellas muestras en las que se detectaron ambigüedades fueron reamplificadas y reanalizadas para confirmar la asignación correcta de los genotipos.

Una vez que las ambigüedades del genotipado fueron depuradas, se procedió a una última fase de control de calidad para seleccionar el conjunto de microsatélites más informativo y maximizar la confiabilidad en la estimación del parentesco. Para ello, los genotipos *multilocus* fueron analizados con los programas MICRO-CHECKER v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004), ARLEQUIN v3.1 (Excoffier *et al.* 2005), GenALEX v6.3 (Peakall y Smouse 2006) y MSTOOLS v3.1.1 (Park 2008).

Estos programas calculan, con base en las frecuencias alélicas, la heterocigosidad (H_o) observada y la esperada (H_e) bajo las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg para cada microsatélite. Una diferencia significativa entre H_o y H_e puede ser reflejo de errores de genotipado asociados a la presencia de alelos nulos o subdivisión poblacional (efecto Wahlund), por lo que independientemente de la causa de tales diferencias, estas deben ser

tomadas en cuenta para corregir o eliminar los *loci* problemáticos y obtener una estimación no sesgada de los coeficientes de parentesco.

En particular, el programa MSTOOLS detecta la presencia de muestras con genotipos incompletos, alelos raros y con genotipos idénticos o casi idénticos, que pudieran representar problemas asociados con la calidad y la reproducibilidad en el genotipado. Por su parte, el programa MICRO-CHECKER permite la identificación de errores en el genotipado debido a alelos no amplificados (alelos nulos), amplificación diferencial de los alelos cortos (allelic dropout), tartamudeo de la polimerasa (stutter peaks) o errores tipográficos.

En el programa ARLEQUIN se analizó el desequilibrio en el ligamiento entre los microsatélites. Cuando dos *loci* se encuentran ligados, no pueden ser considerados como marcadores independientes ya que la información que aportan resulta redundante. Por lo tanto, cuando existen evidencias de desequilibrio, uno de los microsatélites de cada par ligado debe ser excluido del análisis.

Finalmente, se procedió a calcular el nivel o potencial informativo de cada microsatélite con el programa KININFO v1.0 (Wang 2006) y la probabilidad de identidad con el programa GIMLET v1.2.3 (Valière 2002). KININFO clasifica a los microsatélites dependiendo de su importancia relativa en la distinción de los genotipos individuales. La probabilidad de identidad (PI) es el estadístico más

comúnmente usado al cuantificar el poder de cada microsatélite para distinguir los genotipos individuales y representa la probabilidad de que dos individuos sin relación de parentesco tengan el mismo genotipo.

Con base en los resultados de todos estos análisis, se seleccionó el juego de microsatélites más informativo y con la menor probabilidad de introducir sesgo en la estimación del coeficiente de parentesco.

4.3.3. Estimación de los coeficientes de parentesco.

Aunque se han propuesto diversos estimadores que utilizan datos derivados de marcadores moleculares codominantes (e.g. microsatélites) para inferir las relaciones de parentesco entre pares de individuos, existen básicamente dos tipos de aproximaciones: estimadores basados en el método de los momentos (Querer y Goodnight 1989, Lynch-Ritland 1999, Wang 2002) y estimadores de máxima verosimilitud (Thompson 1975, Kalinowski *et al.* 2006, Anderson y Weir 2007).

Matemáticamente, ambas aproximaciones representan la probabilidad de que cada *locus* del genotipo de dos individuos contengan 0, 1 o 2 alelos idénticos por descendencia (Lynch y Walsh 1998, Blouin 2003). Sin embargo, diversos estudios en los que se compara el desempeño de estimadores de parentesco

de momentos (ME) y de máxima verosimilitud (ML), señalan que el factor que genera la mayor discrepancia entre ellos es la incertidumbre sobre las frecuencias alélicas reales en la población de interés (Milligan 2003; Bink *et al.* 2008).

Aunque los resultados de estos estudios indican que los estimadores ML son superiores a los ME, estos últimos resultan más robustos cuando no se cuenta con una estimación confiable de las frecuencias alélicas, por ejemplo al tener un tamaño de muestra pequeño. Tomando en cuenta que el presente estudio representa el primero en el que se analizan ballenas azules del Pacífico Norte a través de marcadores moleculares de tipo microsatélite, resultaba imposible determinar si la frecuencia alélicas de la muestra empleada era representativa de toda la población. Por esta razón, se decidió estimar el coeficiente de parentesco con ambos tipos de estimadores y comparar posteriormente su desempeño.

El coeficiente de parentesco se estimó a través de los programas MER (Moment Estimate of Relatedness, Wang 2002) y ML-RELATE (Maximum Likelihood Relatedness, Kalinowski *et al.* 2006).

El desempeño de estos estimadores se evaluó a través del coeficiente de correlación entre las matrices de parentesco obtenidas y, contrastando los valores de parentesco teóricos esperados para las parejas madre-cría incluidas

en la muestra con los valores arrojados por cada estimador para confirmar su congruencia y evaluar sus coeficientes de variación.

4.4. Análisis estadísticos: Comparación de los niveles de parentesco entre categorías y patrones de asociación.

Para el análisis de los datos, la información generada en las secciones anteriores se integró en tres matrices: una matriz de asociación, una matriz de distancia molecular haplotípica (linajes maternos mitocondriales) y una matriz de los coeficientes de parentesco. Estas matrices fueron la base de las comparaciones y análisis estadísticos subsecuentes. Todos estos análisis se efectuaron en el programa STATISTICA® v7.0 (StatSoft, Inc.) usando un nivel de significancia del 95%.

La matriz de asociación presenta el número de veces que un individuo se observó en asociación directa con otros. Por su parte, las matrices de distancias haplotípicas y de parentesco contienen, respectivamente, los estimadores de divergencia y similitud genética entre cada par de individuos.

Como primer paso para evaluar la relación entre las asociaciones y las relaciones de parentesco, se calcularon las distribuciones de frecuencia y se

calcularon los estadísticos descriptivos para cada una de las matrices, así como el nivel de independencia entre ellas a través de sus correlaciones.

Posteriormente, se comparó el parentesco promedio entre los individuos de cada una de las diferentes categorías o patrones de asociación. La significancia de las diferencias observadas se evaluó a través de pruebas estadísticas para dos muestras independientes o bien, mediante un análisis de varianza cuando se compararon más de dos categorías o patrones de asociación.

Finalmente, dada la dificultad para leer e interpretar los datos en formato de matrices por ser demasiado grandes, se recurrió un método gráfico multidimensional para contrastar las relaciones genéticas entre los individuos con diferentes patrones de asociación. Para ello, se calcularon las distancias genéticas entre todos los individuos con base en los genotipos *multilocus* y se analizaron a través de un análisis de componentes principales (PCA). Ambos procedimientos se efectuaron en el programa GenAlEx v6.3 (Peakall y Smouse 2006).

5. RESULTADOS

5.1. Selección de Individuos.

La actualización de las bases de datos de asociación individual, identificación molecular del sexo y asignación de linajes maternos para las temporadas 1993-2006, permitió la selección de 92 individuos que representaron a cada una de las distintas categorías y patrones de asociación (Tabla II).

De los 92 individuos seleccionados, el 30% fueron solitarios (IES y IFS), un 33% de asociados (IN, SC y SE) y un 35% de foráneos y crías (IF y C).

Aunque la proporción machos-hembras varió entre las diferentes categorías de asociación, la proporción global (1.2: 1) resultó ligeramente sesgada hacia las hembras (Tabla II).

En lo que respecta a los linajes maternos, de los 18 haplotipos reportados a la fecha para las ballenas azules del Golfo de California, sólo 13 estuvieron representados en el grupo de muestras seleccionadas (Tabla II, Apéndice 3). De estos haplotipos, el 87% correspondió al clado I y el 13% restante al clado II.

Tabla II. Individuos de las diferentes categorías de asociación directa seleccionados para el análisis de las relaciones de parentesco. Se indica el código de identificación individual^a, el número de individuos y las proporciones de sexos y de los clados maternos^b en cada categoría^c.

Categoría	Código de indentificación individual	n	Sexo		Linajes maternos	
			H(%)	M(%)	Clado I (%)	Clado II (%)
IES	Bm175 H01, Bm203 M16, Bm266 H02, Bm269 M14, Bm287 H01, Bm312 M07, Bm334 H01, Bm337 M01, Bm338 H15, Bm353 M02, Bm355 M01, Bm363 M01, Bm371 M01, Bm379 H10, Bm385 H14, Bm398 H16, Bm414 M07, Bm458 H06, Bm477 H01	19	52.6	47.4	78.9	21.1
IFS	Bm059 H16, Bm198 M01, Bm250 H01, Bm374 M13, Bm391 H10, Bm399 H01, Bm467 M01, Bm468 M01, Bm487 M01	9	44.4	55.6	88.9	11.1
IN	Bm004 H01, Bm012 M14, Bm035 H01, Bm041 H01, Bm050 H06, Bm060 M01, Bm065 H02, Bm119 H02, Bm124 H02, Bm127 H14, Bm129 H02, Bm131 H01, Bm136 H01, Bm142 M02	14	78.6	21.4	92.9	7.1
SE	Bm047 H05, Bm099 H01, Bm165 H05, Bm181 H01, Bm346 M09, Bm456D01	6	66.7	16.7	100.0	0.0
SC	Bm007 M01, Bm075 H14, Bm141 H13, Bm146 H01, Bm249 M14, Bm251 H14, Bm303 H07, Bm321 M01, Bm423 M01, Bm454 M06	10	50.0	50.0	80.0	20.0
C	Bm067 M01, Bm078 H02, Bm144D14, Bm166 M16, Bm240 M01, Bm281 H01, Bm299 H16, Bm300 H18, Bm306 H01, Bm307 M02, Bm376 M01, Bm394 M01, Bm405 M05, Bm415 H02, Bm418 M01, Bm420 H02, Bm425 M18, Bm455 M14, Bm459 M01, Bm478 H10, Bm505 H16, Bm529 H01	22	45.5	50.0	95.5	4.5
IF	Bm396 H14, Bm483 H01, Bm484 H10, Bm486 M12, Bm491 M07, Bm494 M14, Bm503 H01, Bm504 M06, Bm517 M06, Bm519 M01	10	40.0	60.0	70.0	30.0
Otro	Bm169 M01, Bm404 H05	2	50.0	50.0	100.0	0.0
Global		92	53.3	44.6	87.0	13.0

^a El código de identificación individual se compone de las siglas correspondientes a la especie (Bm= *Balaenoptera musculus*), el identificador numérico del individuo dentro del catálogo de fotoidentificación (tres primeros dígitos), el sexo (M o H, para machos y hembras respectivamente) y el identificador numérico del haplotipo o linaje materno (últimos dos dígitos).

^b Los clados maternos corresponden a los descritos previamente por Enríquez-Paredes (2005) y que se detallan en el Apéndice 3.

^c Las categorías de asociación corresponden a las descritas en la sección 4.1.1. IES= individuos exclusivamente solitarios, IFS= individuos frecuentemente solitarios, IN= individuos núcleo, SE= socios exclusivos, SC= socios comunes, C= crías, IF= individuos foráneos

5.2. Matriz de asociación.

El número promedio de asociaciones directas entre los 92 individuos fue menor a uno (0.0370 ± 0.2683). La distribución de frecuencias del número de asociaciones para cada par de individuos no se ajustó a una distribución normal (Shaphiro-Wilk, $W= 0.124$, $p< 0.05$, $N=4186$), con una marcada dominancia de la categoría de cero (Fig. 2). Aunque el patrón observado parecería indicar que son muy pocos los individuos que han sido observados en asociación directa, la interpretación correcta sería que la mayoría de los individuos de la muestra empelada se han observado asociados solo con unos cuantos individuos.

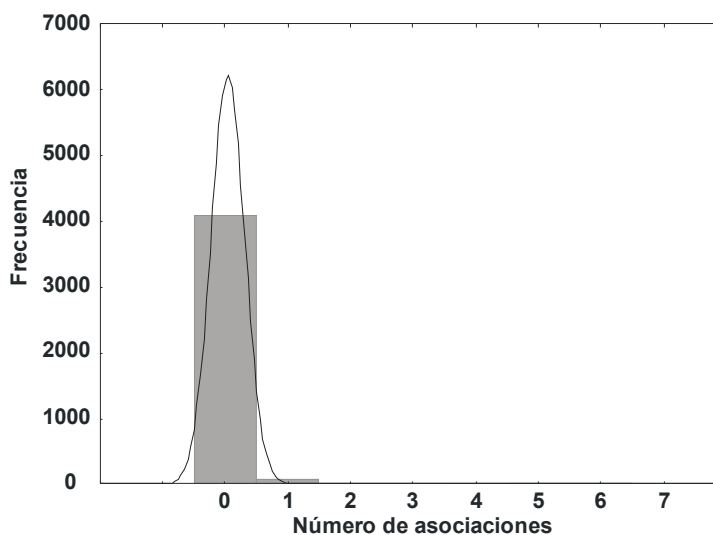


Figura 2. Distribución de frecuencias del número de asociaciones directas registradas de ballena con cada uno de los otros individuos (92 individuos y 4186 datos de asociación). La línea negra representa la distribución normal esperada.

5.3. Matriz de divergencia genética haplotípica.

La divergencia haplotípica promedio entre los 92 individuos fue baja ($D_{mt} = 0.007 \pm 0.006$) y su distribución de frecuencias no se ajustó a la normalidad (Shapiro-Wilk, $W = 0.880$; $p < 0.05$), mostrando un patrón bimodal (Fig. 3). Este patrón bimodal sugiere la presencia de al menos dos grupos de individuos con diferentes linajes, lo que concuerda con el patrón esperado por la inclusión de individuos de ambos clados mitocondriales reportados por Enríquez-Paredes (2005) (Apéndice 3).

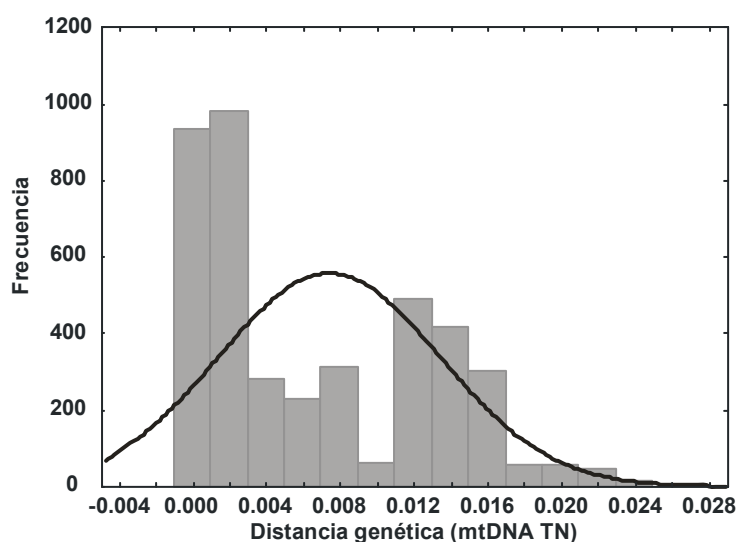


Figura 3. Distribución de frecuencias de los valores de divergencia haplotípica obtenidos mediante el modelo de sustitución de Tamura-Nei (92 individuos y 4186 estimaciones de distancia genética). La línea negra representa la distribución normal esperada.

5.4. Genotipado y matriz de parentesco.

5.4.1. Genotipado.

Una vez concluido el proceso de control de calidad (Apéndice 2), los genotipos *multilocus* quedaron integrados por la información alélica de 16 microsatélites. El número de alelos promedio por *locus* y su heterocigosidad combinada fue de 6.75 y 0.54, respectivamente (Tabla III).

Tabla III. Índices de diversidad genética y probabilidad de identidad para cada uno de los microsatélites empleados. Se indica el número de alelos (N_a), la heterocigosidad observada (H_o), la probabilidad de identidad por locus (PI_{locus}) y la probabilidad de identidad acumulada por la adición sucesiva de cada locus ($PI_{multilocus}$).

Microsatélite	N_a	H_o	PI_{locus}	$PI_{multilocus}$
GATA417	13	0.902	2.61 E-02	2.61 E-02
CA234	13	0.891	4.29 E-02	1.12 E-03
GATA028	8	0.717	4.75 E-02	5.32 E-05
AC087	11	0.804	5.01 E-02	2.66 E-06
CA232	7	0.793	9.37 E-02	2.49 E-07
Ev037	7	0.717	1.07 E-01	2.66 E-08
GATA098	8	0.707	1.07 E-01	2.85 E-09
GT541	9	0.739	1.25 E-01	3.54 E-10
GT023	6	0.652	1.81 E-01	6.43 E-11
AC082	4	0.630	2.15 E-01	1.38 E-11
AC137	9	0.630	2.30 E-01	3.19 E-12
GT129	4	0.380	4.37 E-01	1.39 E-12
AC045	2	0.370	4.45 E-01	6.19 E-13
DirFCB017	3	0.391	4.53 E-01	2.81 E-13
CAA074	2	0.272	5.67 E-01	1.59 E-13
GT227	2	0.076	8.58 E-01	1.37 E-13
<i>Multilocus</i>	6.75	0.539		1.37 E-13

Con los niveles de diversidad alélica de estos 16 microsatélites, la probabilidad de identidad se estimó en 1.37×10^{-13} , lo que representa que la probabilidad de que dos individuos sin parentesco exhiban genotipos idénticos es de 1 en poco

más de 7 billones de individuos, mientras que la probabilidad de que dos hermanos tengan el mismo genotipo es de 1 en 82,500.

5.4.2. Desempeño de los estimadores de parentesco.

Al contrastar los coeficientes de parentesco obtenidos por el método de los momentos y el de máxima verosimilitud, se observó una correlación muy alta ($r= 0.835$, $p < 0.05$) y un error cuadrático promedio bajo ($RMSE= 0.008$). Con esta evidencia puede considerarse que el desempeño de ambos estimadores fue similar (Fig. 4). No obstante, al comparar el valor de parentesco promedio entre las parejas madre-cría incluidas (Apéndice 4), el estimador ML fue más preciso y exacto con respecto al valor teórico esperado para relaciones progenitor-progenie ($R_{ML} = 0.513 \pm 0.019$; $R_{MER} = 0.494 \pm 0.054$). Por esta razón, se decidió reportar en lo sucesivo solo las estimaciones de parentesco obtenidas mediante el programa ML-RELATE.

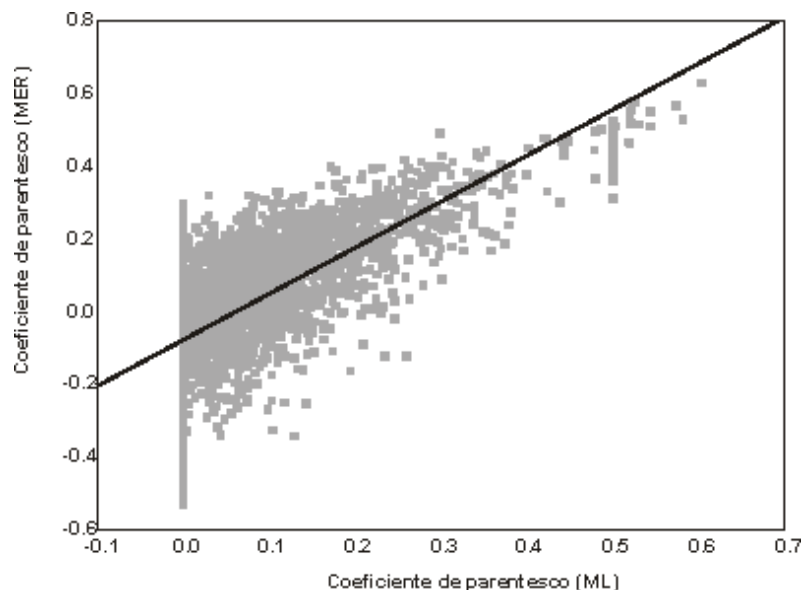


Figura 4. Correlación entre las estimaciones de parentesco obtenidas por el método de máxima verosimilitud (ML) y el método de los momentos (MER). La línea negra representa el ajuste lineal.

5.4.3. Matriz de parentesco.

Con los genotipos *multilocus* de las 92 ballenas analizadas se generó una matriz de 4186 comparaciones pareadas de parentesco. Del total de estas comparaciones, se obtuvo un valor promedio de parentesco bajo y una amplia desviación estándar ($R_{ML} = 0.056 \pm 0.091$). Debido a que este valor no disminuyó de manera notable después de remover las parejas madre-cría, que exhibieron los valores de parentesco más altos (Apéndice 4), indica que

efectivamente existe una baja frecuencia de individuos con valores de parentesco de primer orden ($R_{ML} = 0.055 \pm 0.088$).

La distribución de frecuencias de los coeficientes de parentesco no exhibió una distribución normal (Shapiro-Wilk, $W = 0.678$, $p < 0.05$), mostrando un marcado sesgo hacia los valores de parentesco cercanos a cero (Fig. 5). El comportamiento de esta variable indica que la mayor parte de los individuos analizados no presentan una relación de parentesco cercana.

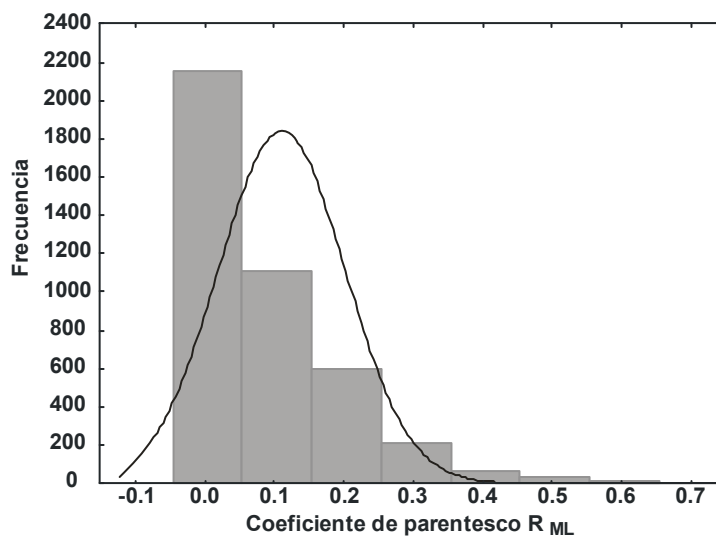


Figura 5. Distribución de frecuencias de los coeficientes de parentesco obtenidos por el método de máxima verosimilitud (92 individuos y 4186 estimaciones pareadas de parentesco). La línea negra representa la distribución normal esperada.

El 87% de las estimaciones (3462 comparaciones pareadas) correspondió a relaciones de parentesco de tercer o menor orden ($R_{ML} < 0.12$; sin parentesco cercano). Las parejas con coeficientes de parentesco de segundo orden ($0.125 > R_{ML} < 0.249$; tíos, primos o abuelos) representaron el 12.8% de las relaciones (537 comparaciones pareadas). Finalmente, sólo el 4.5% (153 comparaciones pareadas) presentaron relaciones de parentesco de primer orden ($0.250 > R_{ML} \leq 0.500$; medios hermanos, padres-hijos).

5.5. Correlación entre las matrices de asociación, parentesco y divergencia haplotípica.

Como primer paso para evaluar si existía evidencia de que la frecuencia de asociación entre individuos era dependiente de su similitud genética a nivel global, las matrices de asociación, parentesco y divergencia haplotípica se contrastaron a través de coeficientes de correlación. Dicha correlación fue débil en todos los casos (Tabla IV, Apéndice 5), lo que refleja que el linaje materno y el parentesco no influyen de manera importante en la frecuencia con la que los individuos se asocian.

Sin tomar en cuenta la magnitud de la correlación, esta fue positiva y significativa para la frecuencia de asociación y el parentesco (Tabla IV). Cabe señalar que al excluir las parejas madre-cría, la correlación fue negativa y no

significativa, sugiriendo que el resto de las asociaciones ocurren con mayor frecuencia entre individuos sin parentesco cercano.

Tabla IV. Correlaciones entre las matrices de asociación (A_s), divergencia haplotípica (D_{mt}) y parentesco (R_{ML}). Se indica el número de comparaciones pareadas (N_C), el coeficiente de correlación de Pearson ($r_{Pearson}$), el coeficiente de correlación de Spearman ($r_{Spearman}$) y el valor- p obtenido para un nivel de significancia al 95%.

Variables	N_C	$r_{Pearson}$	$r_{Spearman}$	p
Incluyendo parejas madre-cría				
As vs R_{ML}	4186	0.1062	0.0351	< 0.05
As vs D_{mt}	4186	-0.0474	-0.0575	< 0.05
R_{ML} vs D_{mt}	4186	-0.0567	-0.0508	< 0.05
Excluyendo parejas madre-cría				
As vs R_{ML}	4176	-0.0120	0.0074	> 0.05
As vs D_{mt}	4176	-0.0272	-0.0388	< 0.05
R_{ML} vs D_{mt}	4176	-0.0453	-0.0450	< 0.05

Se observó también una correlación negativa y significativa entre la frecuencia de asociación y la distancia genética haplotípica, que se mantuvo aún al excluir las parejas madre-cría. Aunque este resultado sugiere que los individuos se asocian más con otros miembros de su linaje materno o de linajes maternos filogenéticamente cercanos. Es importante tomar en cuenta que uno de los haplotipos representa a cerca del 50% de los individuos analizados. Por lo tanto, esta aparente mayor frecuencia de asociación entre individuos del mismo linaje debe ser considerada con cierta reserva.

Como era de esperarse, la correlación entre la distancia haplotípica y el coeficiente de parentesco resultó negativa y significativa (Tabla IV, 5B), lo que sin duda es reflejo de que los miembros del mismo linaje tienen en promedio relaciones de parentesco más cercanas entre ellos que con individuos de otros linajes.

Considerando que al correlacionar las matrices se está analizando el número de veces que cada individuo se ha asociado con el resto, la alta frecuencia de eventos de “no asociación” entre pares de individuos podría estar subestimando la magnitud de la relación entre las variables. Al excluir este evento, la correlación entre la frecuencia de asociación y el coeficiente de parentesco resultó también muy baja. De igual forma, al remover tanto a los individuos sin asociación directa como a las parejas madre-cría, las correlaciones resultaron negativas aunque no significativas (Tabla V).

Pese a los bajos valores de correlación, la relación negativa entre las variables indica una mayor frecuencia de asociación entre individuos sin parentesco cercano. Este patrón de asociación se observó no sólo para el total de las asociaciones directas, sino también al considerar aquellas en las que se involucraron parejas hembra-hembra, hembra-macho y macho-macho (Tabla V, Apéndice 6).

Tabla V. Correlaciones entre las matrices de asociación (A_s), divergencia haplotípica (D_{mt}) y parentesco (R_{ML}) para aquellos individuos que fueron observados en asociación directa (exclusión de los individuos sin asociación directa). Se indica el número de comparaciones pareadas (N_C), el coeficiente de correlación de Pearson ($r_{Pearson}$), el coeficiente de correlación de Spearman ($r_{Spearman}$) y el valor- p obtenido para un nivel de significancia al 95%.

Variables	N_C	$r_{Pearson}$	$r_{Spearman}$	p
Incluyendo parejas madre-cría				
As vs R_{ML} (Global)	122	0.2649	0.0533	< 0.05
As vs R_{ML} (H-H)	66	0.1755	0.0995	> 0.05
As vs R_{ML} (H-M)	48	0.3990	0.0938	< 0.05
As vs R_{ML} (M-M)	8	-0.3504	-0.4507	> 0.05
Excluyendo parejas madre-cría				
As vs R_{ML} (Global)	115	-0.0965	-0.1010	> 0.05
As vs R_{ML} (H-H)	64	-0.0023	0.0105	> 0.05
As vs R_{ML} (H-M)	43	-0.2374	-0.2106	> 0.05

Nota: Las correlaciones se efectuaron considerando a todos los individuos, así como para las asociaciones directas entre individuos con respecto al sexo de cada uno (M= machos, H= hembras).

Cabe mencionar que, a pesar de su baja frecuencia, algunas de las relaciones parentesco de primer orden observadas no correspondieron a individuos registrados como parejas madre-cría. Aunque estas relaciones de primer orden, así como otras de segundo y tercer orden pudieron ser detectadas entre algunos de los individuos, estos no fueron observados en asociación directa. En otras palabras, aunque dentro de las agregaciones del Golfo de California confluyen padres, hijos, tíos, primos y abuelos (Apéndice 7), estos no se asocian más frecuentemente entre ellos que con individuos sin lazos de parentesco.

Así pues, aunque estas relaciones de parentesco sugieren la presencia de familiares que representan al menos tres generaciones, la ausencia de registros de asociación directa entre ellos aporta evidencia adicional que sugiere que, a excepción de las parejas madre-cría, los individuos no se asocian frecuentemente con sus parientes cercanos.

5.6. Comparación de los niveles de parentesco entre individuos con distintos patrones de asociación indirecta.

Es importante señalar que pese a que inicialmente se consideró integrar la información referente al sexo y el linaje materno de los individuos al comparar los niveles de parentesco entre las diferentes categorías y patrones de asociación, el número de individuos dentro de cada una de ellas no permitió realizar comparaciones detalladas al respecto. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la proporción de sexos y de los clados mitocondriales fue similar dentro de cada una de las categorías y criterios de asociación considerados en este trabajo.

Por lo anterior, aunque para cada una de las comparaciones se detalla tanto la proporción de sexos como la de cada linaje y clado materno (Apéndices 8-13), los análisis estuvieron dirigidos principalmente a las estimaciones pareadas de parentesco del conjunto de individuos de las distintas categorías y patrones de asociación.

5.6.1. Categorías basadas en las frecuencias de asociación y la frecuencia de avistamiento en la zona.

Al comparar las categorías de asociación con base en las frecuencias de asociación y frecuencia de avistamiento en la zona de estudio, todas ellas exhibieron valores de parentesco muy similares al parentesco promedio de todo el conjunto de individuos analizados.

Los mayores valores de parentesco se observaron para los individuos núcleo y los foráneos, mientras que los más bajos se observaron entre los socios exclusivos (Tabla VI, Apéndice 8). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Kruskall-Wallis, $H= 3.750$; $p> 0.05$) y dentro de todas las categorías se pudieron encontrar tanto individuos con niveles de parentesco de primer orden (padres, hijos y hermanos), como individuos sin parentesco.

El resultado de esta comparación, concuerda con la débil correlación encontrada entre la frecuencia de asociación y el nivel de parentesco, apoyando la idea de que las interacciones sociales entre las ballenas azules no se presentan con mayor frecuencia entre parientes cercanos.

Tabla VI. Estadísticos descriptivos para las estimaciones de parentesco de los individuos dentro y entre cada categoría de asociación. Se indica el número de individuos por categoría (N_i), el número de comparaciones pareadas por categoría (N_c), la media y su desviación estándar (D.E.), la mediana y sus valores mínimos (Min) y máximos (Max), así como la suma de rangos de análisis de varianza no paramétrica para muestras independientes de Kruskal-Wallis (Σ Rangos K-W). Los códigos de las categorías corresponden a las descritas en la Tabla II.

Categoría de asociación	N_i	N_c	Media	D. E.	Mediana	Min	Max	Σ Rangos K-W
IES	19	171	0.053	0.078	0.010	0.000	0.420	54,057
IFS	9	36	0.068	0.126	0.010	0.000	0.530	11,381
IN	14	91	0.073	0.112	0.010	0.000	0.520	30,685
SE	6	15	0.046	0.074	0.000	0.000	0.210	4,228
SC	10	45	0.061	0.126	0.000	0.000	0.600	12,908
C	22	231	0.055	0.083	0.000	0.000	0.440	73,018
IF	10	45	0.082	0.127	0.000	0.000	0.570	15,020

5.6.2. Asociación indirecta: Grupos núcleo.

El parentesco dentro de los grupos núcleo resultó también bajo ($r= 0.046 - 0.082$, Tabla VII), indicando que la mayoría de los individuos analizados presentan relaciones genéticas lejanas o nulas. No se encontró evidencia de que alguno de los grupos núcleo estuviera conformado por individuos con lazos de parentesco más estrechos que los que exhibieron en promedio los individuos de la población (Kruskal-Wallis, $H= 8.08$; $p> 0.05$). Esto sugiere la presencia tanto de individuos con parentesco cercano como de individuos sin parentesco dentro de cada grupo núcleo, independientemente del sexo del individuo núcleo.

Aunque en dos de los grupos núcleo todos los socios resultaron ser hembras y en uno de ellos no se encontraron linajes maternos del clado II (Apéndices 9 y 10), en la mayoría se presentaron miembros de ambos sexos y de ambos clados mitocondriales.

Tabla VII. Estadísticos descriptivos para las estimaciones de parentesco de los individuos dentro y entre cada grupo núcleo. Los códigos de los estadísticos corresponden a los descritos en la Tabla VI y los códigos de los individuos a los descritos en la Tabla II.

Individuo Núcleo	N _i	N _c	Media	D. E.	Mediana	Min	Max	Σ Rangos K-W
Bm004 H01	7	21	0.077	0.129	0.030	0.000	0.520	8,208
Bm012 M14	7	21	0.046	0.069	0.000	0.000	0.230	7,175
Bm035 H01	7	21	0.041	0.057	0.010	0.000	0.190	7,293
Bm041 H01	5	10	0.082	0.112	0.025	0.000	0.310	4,167
Bm050 H06	12	66	0.054	0.115	0.000	0.000	0.540	21,775
Bm060 M01	9	36	0.059	0.110	0.000	0.000	0.540	11,977
Bm065 H02	11	55	0.075	0.129	0.000	0.000	0.540	19,900
Bm119 H02	7	21	0.072	0.124	0.000	0.000	0.500	7,501
Bm124 H02	14	91	0.072	0.111	0.020	0.000	0.500	34,108
Bm127 H14	9	36	0.059	0.109	0.015	0.000	0.520	12,936
Bm129 H02	11	55	0.064	0.114	0.000	0.000	0.500	18,975
Bm131 H01	20	190	0.072	0.121	0.000	0.000	0.600	68,346
Bm136 H01	10	45	0.066	0.143	0.000	0.000	0.540	14,422
Bm142 M02	10	45	0.080	0.114	0.030	0.000	0.440	17,761

5.6.3. Asociación indirecta: Temporal.

En las Tablas VIII y IX se detallan los valores promedio de parentesco de los individuos analizados agrupados en función de los años y los meses en los que fueron observados dentro del Golfo de California (Apéndices 11 y 12).

El análisis de varianza entre las agregaciones anuales de ballenas azules indicó que no existen diferencias significativas en los niveles de parentesco (Kruskal-Wallis, $H = 12.820$; $p > 0.05$) a una escala interanual. La misma situación se presentó al realizar las comparaciones entre meses (Kruskal-Wallis, $H = 1.144$; $p > 0.05$).

En conjunto, estos resultados no aportan evidencia de algún nivel de organización social mediada por el parentesco en relación con la presencia interanual de los individuos o en cuanto a su permanencia en el Golfo de California durante el periodo invernal (cronología migratoria). En otras palabras, año tras año y a lo largo de la temporada invernal, tanto parientes como individuos sin lazos de parentesco ocupan la zona de estudio.

Tabla VIII. Estadísticos descriptivos para las estimaciones de parentesco de los individuos dentro y entre cada temporada invernal (año). Los códigos de los estadísticos corresponden a los descritos en la Tabla VI.

Año	N _i	N _c	Media	D. E.	Mediana	Min	Max	Σ Rangos K-W
1994	12	66	0.053	0.083	0.010	0.000	0.520	102,682
1995	9	36	0.074	0.117	0.010	0.000	0.520	58,030
1996	14	91	0.061	0.107	0.000	0.000	0.500	138,118
1997	14	91	0.064	0.104	0.000	0.000	0.580	139,518
1998	11	55	0.104	0.135	0.030	0.000	0.600	99,270
1999	21	210	0.060	0.095	0.010	0.000	0.500	326,830
2000	16	120	0.059	0.108	0.000	0.000	0.520	180,977
2001	28	378	0.056	0.090	0.010	0.000	0.600	579,767
2002	35	595	0.061	0.096	0.000	0.000	0.540	914,411
2003	28	378	0.063	0.106	0.000	0.000	0.600	578,376
2004	29	406	0.050	0.091	0.000	0.000	0.540	592,886
2005	26	325	0.061	0.096	0.000	0.000	0.570	491,135
2006	25	300	0.060	0.094	0.010	0.000	0.520	466,187

Tabla IX. Estadísticos descriptivos para las estimaciones de parentesco de los individuos dentro y entre cada mes. Los códigos de los estadísticos corresponden a los descritos en la Tabla VI.

Meses	N _i	N _c	Media	D. E.	Mediana	Min	Max	Σ Rangos K-W
Febrero	43	903	0.058	0.094	0.000	0.000	0.520	2,006,327
Marzo	76	2850	0.056	0.091	0.000	0.000	0.600	6,242,061
Abril	36	630	0.055	0.094	0.000	0.000	0.600	1,359,149

5.7. Comparación de los niveles de parentesco entre clados de linajes maternos.

Al considerar la agrupación de individuos en función del clado al que pertenece su linaje materno (Apéndice 3), los valores promedio de parentesco dentro de cada grupo resultaron superiores al promedio global de la población (Tabla X, Apéndice 13).

Tabla X. Estadísticos descriptivos para las estimaciones de parentesco de los individuos dentro y entre cada uno de los clados mitocondriales. Los códigos de los estadísticos corresponden a los descritos en la Tabla VI. Se indica la suma de rangos de la prueba no paramétrica para dos muestras independientes Mann-Whitney (Σ Rangos M-W). Los códigos de los clados mitocondriales corresponden a los descritos en el Apéndice 3.

Clado materno	N _i	N _c	Media	D. E.	Mediana	Min	Max	Σ Rangos M-W
I	79	3081	0.058	0.093	0.000	0.000	0.604	19,374,085
II	13	156	0.089	0.117	0.048	0.000	0.544	587,636

El parentesco promedio entre ambos clados resultó significativamente diferente (Mann-Whitney, $U= 385,882$; $p < 0.05$) y más alto dentro del clado II. Este resultado indica la presencia de un mayor número de parientes cercanos dentro de uno de los clados mitocondriales y sugiere un posible aislamiento reproductivo entre ellos.

5.8. Análisis multidimensional.

Con el objeto de poder evaluar gráficamente la magnitud de las diferencias de parentesco entre los clados mitocondriales con respecto a las encontradas bajo los criterios de frecuencia de asociación, se contrastaron ambos criterios a través de análisis multidimensional (Fig. 6).

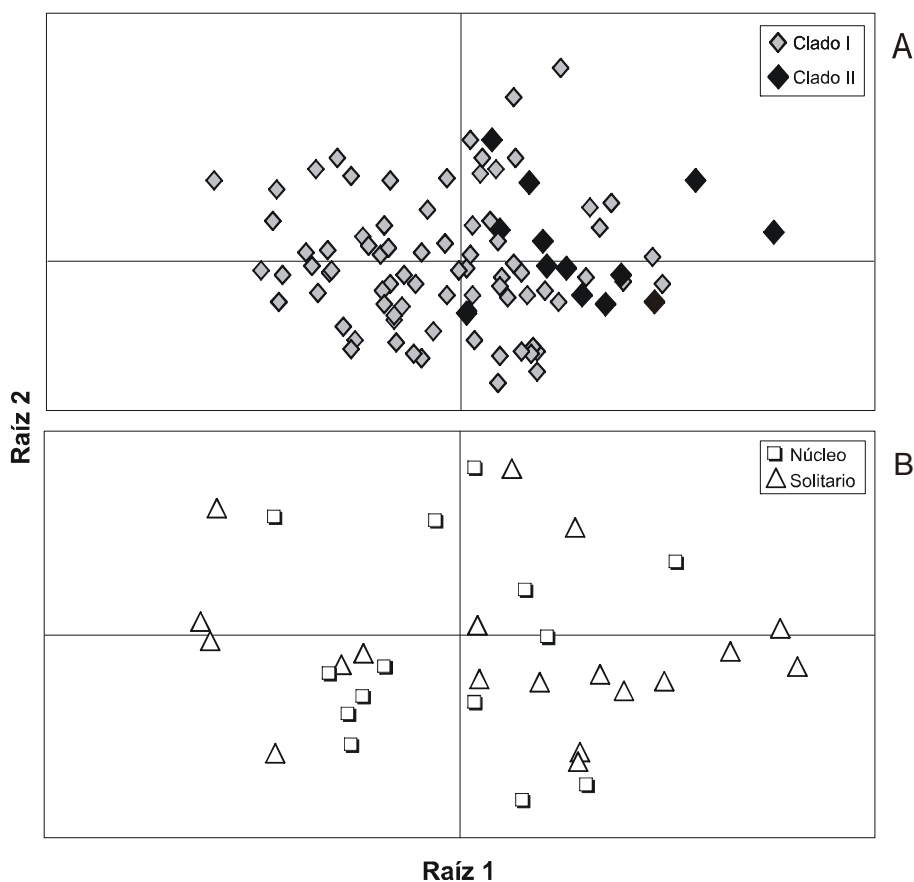


Figura 6. Análisis multidimensional de componentes principales (ACP) para las estimaciones pareadas de distancia genética euclidiana entre clados mitocondriales (A) y entre dos de las categorías por frecuencia de asociación contrastantes: núcleos y solitarios (B).

Como puede observarse en la figura 6A, aunque el análisis de componentes principales (ACP) indicó un claro traslape entre ambos clados, la agregación espacial de los individuos de diferentes linajes maternos es mucho más evidente que para dos de las categorías de frecuencia de asociación contrastante; los individuos núcleo y los solitarios (Fig. 6B). Esto concuerda con los resultados anteriores, confirmando que los individuos no se asocian de manera preferencial con individuos del mismo linaje materno o con parentesco cercano.

El patrón de agregación espacial multidimensional de los individuos con base en el clado mitocondrial, refleja una menor distancia genética (similitud o parentesco) dentro de los clados y sugiere la posible existencia de un esquema de organización social que genera cierto nivel de aislamiento reproductivo entre los grupos de linaje materno (clados).

Un aislamiento efectivo entre ambos clados mitocondriales se evidenciaría en forma de agregaciones espaciales discretas alrededor de las crías que pertenecieran a cada grupo reproductivo. No obstante, al contrastar el nivel de parentesco de las crías con los individuos núcleo y los solitarios, el análisis multidimensional no aportó evidencia que permita apoyar la existencia de dos grupos de crías (Fig. 7).

En conjunto, estos últimos resultados sugieren que a pesar de las diferencias significativas en el parentesco de los dos clados mitocondriales, aparentemente

no existe un aislamiento reproductivo completo entre ellos. El hallazgo de un individuo hembra del clado mitocondrial I (Bm529) con relaciones de parentesco de primer orden (progenitor-progenie, o hermanos) tanto con un individuo hembra del clado mitocondrial I (Bm004) y un macho del clado mitocondrial II (Bm517) aporta evidencia de la mezcla entre clados (Apéndice 7).

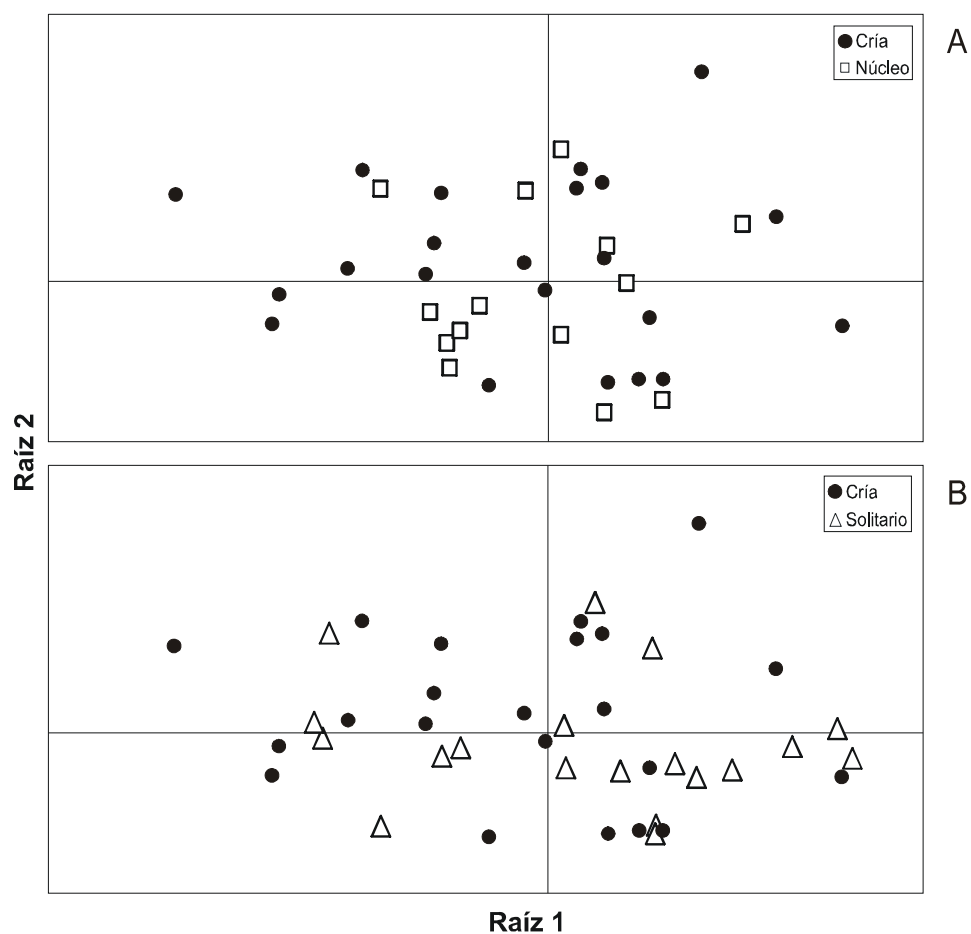


Figura 7. Análisis multidimensional de componentes principales (ACP) para las estimaciones pareadas de distancia genética euclidiana entre las crías y dos de las categorías por frecuencia de asociación contrastantes: núcleos (A) y solitarios (B).

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron las relaciones de parentesco entre ballenas azules con distintos patrones de asociación y linajes mitocondriales con el objeto de explorar el nivel de organización social de la especie. Si bien, las dificultades intrínsecas al estudio de este misticeto han limitado en gran medida el conocimiento de su genealogía a través de observaciones directas y la fotoidentificación, la incorporación de marcadores genéticos moleculares evidenció que éstos representan un complemento fundamental en el estudio de su comportamiento ecológico y su organización social.

Pese al potencial de los marcadores genéticos para estimar el parentesco, el uso de un número inadecuado de estos y de una muestra de individuos poco representativa, puede resultar en una estimación imprecisa de las frecuencias alélicas y en una alta incertidumbre al establecer las relaciones de parentesco. Por ello, la resolución y los niveles de certidumbre de los marcadores empleados son factores clave que deben ser evaluados antes de poder hacer inferencias sobre el comportamiento y la organización social.

En este sentido, la información generada en el presente estudio, se discute en cinco apartados. El primero aborda los aspectos metodológicos relacionados con la confiabilidad y el nivel de resolución del conjunto de datos analizados. En un segundo apartado, se contrastan los resultados de estudios previos sobre

los patrones de asociación individual y la organización social de la ballena azul a la luz de las estimaciones de parentesco. Un tercer apartado aborda la influencia de los linajes maternos en los patrones de asociación. Posteriormente, en el cuarto apartado se tocan aspectos relacionados con la organización social y el uso del hábitat. Para terminar, en un último apartado, se discute brevemente la información generada en términos de su aporte al conocimiento del estado actual de la población y las estrategias de conservación.

6.1. Aspectos metodológicos.

6.1.1. Confiabilidad del genotipado.

El estricto control de calidad con el que se realizó el genotipado, permitió depurar y seleccionar un conjunto de microsatélites que no sólo minimizó la probabilidad de introducir errores, sino que garantizó una alta resolución y la estimación no sesgada de los coeficientes de parentesco.

En un análisis de la resolución y eficiencia de grupos de microsatélites, a través de simulaciones, se estimó que para una heterocigosidad de 0.6 serían necesarios 15 *loci* (con cinco alelos cada uno) para obtener una probabilidad de identidad de 1 en cada 10,000 individuos (Waits *et al.* 2009). En este trabajo,

después de la exclusión de los microsatélites con ambigüedades en el genotipado, de aquellos que estaban fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg y de los que resultaron poco informativos, el conjunto de 16 microsatélites empleado presentó una resolución mayor a la simulada. De hecho, si se emplearan sólo los tres *loci* más informativos (Tabla IV), la probabilidad de identidad de las ballenas azules del Golfo de California sería de 1 en 13,000 individuos.

La evidencia más contundente del poder informativo del conjunto de microsatélites aquí empleado, fue el hallazgo de dos muestras con genotipos idénticos asignadas a distintos individuos en el catálogo de fotoidentificación. Considerando la baja probabilidad de que dos individuos tuvieran el mismo genotipo, al revisar detalladamente los registros fotográficos se confirmó que estos individuos eran el mismo y se corrigió la base de datos.

6.1.2. Confiabilidad de la estimación de los coeficientes de parentesco.

Todos los estimadores de parentesco exhiben distinta sensibilidad a los tamaños de muestra empleados. De acuerdo con Bink *et al.* (2008), una fuerte correlación entre los estimadores de parentesco obtenidos por los métodos de momentos y de máxima verosimilitud, es indicativo de la certeza de que las

frecuencias alélicas en la muestra empleada son las que realmente existen en la población. Aunado a la fuerte correlación que se observó entre los estimadores MER y ML para las relaciones de parentesco de las ballenas azules (Fig. 4), la evidencia más clara de que el estimador de máxima verosimilitud tuvo un mejor desempeño, fue el menor error estándar obtenido al calcular el parentesco entre el grupo de parejas madre-cría conocidas y analizadas en el presente estudio (Apéndice 4). Esto coincide con otros estudios que confirman que los estimadores de máxima verosimilitud ofrecen una estimación de parentesco sin sesgo y una alta certidumbre cuando las frecuencias alélicas de la población se conocen con exactitud (Milligan 2003; Bink *et al.* 2008).

6.1.3. Representatividad de la muestra de individuos seleccionados.

Si bien un riguroso control de calidad asegura la precisión en la estimación de los coeficientes de parentesco, la exactitud de los mismos depende más del tamaño muestral empleado. En el presente estudio, la congruencia en el desempeño de ambos estimadores de parentesco sugiere, en primera instancia, que la muestra seleccionada es representativa de las variantes genéticas que existen en la población y que el tamaño de muestra fue el adecuado.

Una evidencia adicional de la exactitud asociada al genotipado, la aporta la comparación del nivel de polimorfismo de los microsatélites encontrado en este análisis con los reportados por LeDuc *et al.* (2007) para las poblaciones de ballena azul de Antártica, del Océano Índico y del Pacífico Sudoriental. Aunque este autor empleó solamente seis de los 16 microsatélites aquí reportados, los niveles de heterocigosidad (0.681 vs. 0.710) y el número de alelos promedio (7.5 vs. 10.8) fue muy similar para los *loci* comunes a ambos estudios.

Por otra parte, debe aclararse que con el criterio de selección empleado se buscaba que los diferentes patrones de asociación que exhiben los individuos estuvieran representados homogéneamente en la muestra, por lo que el grupo de individuos analizados de ninguna manera refleja la frecuencia con la que se presentan dichas asociaciones. Es por ello que, aunque Martínez-Serrano (2005) reporta que la mayoría de los individuos presentan cierto nivel de asociación y que son pocos los de hábitos solitarios, dentro de la muestra analizada en el presente estudio, aproximadamente la mitad corresponde a individuos “sociables” (núcleos, socios exclusivos, socios compartidos y crías) y la otra mitad a las individuos “no sociables” o ajenos a la zona de estudio (frecuentemente solitarios, exclusivamente solitarios y foráneos).

Independientemente de la forma en la que se seleccionaron los individuos, la proporción de sexos y de los grupos de linajes maternos estuvieron representados de manera homogénea en todas las categorías de individuos

(Tabla II), coincidiendo además con los que han sido reportados previamente en la zona (Gendron 2002, Enríquez-Paredes 2005, Martínez-Serrano 2005).

En resumen, considerando los aspectos discutidos en esta sección, las evidencias indican que las estimaciones obtenidas para la muestra analizada, son reflejo fidedigno de los niveles de parentesco que presentan las ballenas azules en la porción sureste del Golfo de California.

6.2. Parentesco entre individuos de ballena azul con distintos patrones de asociación en el Golfo de California.

Comúnmente se ha reportado que la ballena azul es poco gregaria y solitaria (Tomilin 1967, Reeves *et al.* 2002), aunque la información sobre los patrones de agregación y asociación individual de la ballena azul es muy limitada. Sin embargo, Martínez-Serrano (2005), muestra evidencias de que las ballenas azules exhiben una críptica organización social basada en asociaciones de corta duración pero que, al menos entre algunos individuos, se presentan de forma recurrente.

El nivel de parentesco promedio entre los individuos que ocupan la porción sureste del Golfo de California fue muy bajo ($R_{ML} = 0.056$), aunque se encontró evidencia de que la zona es usada por individuos que representan al menos tres generaciones (Apéndice 7). Considerando que el tiempo generacional para

la especie es de entre 20 y 31 años (Enríquez-Paredes 2005, Taylor *et al.* 2007, Reilly *et al.* 2008), la zona es ocupada actualmente tanto por individuos de uno hasta al menos 60-90 años de edad. Esto resulta congruente con la longevidad estimada para la especie (Wilson y Ruff 1999) y confirma además, la fuerte filopatría y la importancia del Golfo de California como hábitat invernal de las ballenas azules en el Pacífico Nororiental (Gendron 2002, Enríquez-Paredes 2005, Martínez-Serrano 2005).

Debido a la posible presencia de tres generaciones de ballenas azules en la zona (Apéndice 7), la evidencia de patrones de asociación no aleatorios (Martínez-Serrano 2005) y la resolución del conjunto de marcadores moleculares aquí empleados, parece lógico inferir que si dichas asociaciones estuvieran mediadas por los linajes maternos o el nivel de parentesco, estas deberían haber sido detectadas al comparar patrones de asociación con base en los criterios de frecuencia de asociación directa o indirecta (grupos núcleo y agregaciones espacio-temporales). Sin embargo, exceptuando a las parejas madre-cría, bajo ninguno de los criterios de asociación analizados se encontró evidencia de una marcada preferencia de los individuos por asociarse con otros miembros de su linaje materno o con otros parientes cercanos (Tablas VII a XI).

Patrones similares de asociación se han reportado en agregaciones de ballenas jorobadas (Clapham 1992), donde se ha mencionado que las parejas madre-cría son los puntos de cohesión con otros individuos, estén genéticamente

relacionados o no. De acuerdo con estos autores, una organización social sin lazos estrechos de parentesco podría estar relacionada con la ausencia de fuertes presiones ambientales, tales como la competencia por los recursos o la presencia de depredadores. El caso contrario a lo anterior lo exhiben especies como el cachalote, donde las presiones por alimento o por depredadores provocan la integración de grupos familiares que maximizan el beneficio del grupo y brindan protección a las crías de forma cooperativa (Arnbom *et al.* 1987).

6.3. Parentesco entre individuos de ballena azul con respecto a los linajes maternos.

Como se mencionó anteriormente, al igual que otros mysticetos, la ballena azul exhibe una fuerte filopatría (Gendron 2002). La alta tasa de retorno interanual de los individuos núcleo al Golfo de California, sugiere la presencia de cierto nivel de estructura mediado por los linajes maternos en el que tanto las hembras, como sus crías y a su vez las crías de estas últimas, regresan año con año a sus sitios natales. Aunque la correlación entre la frecuencia de asociación y la divergencia haplotípica de los individuos analizados a nivel global fue muy baja, la tendencia indica un mayor parentesco entre los individuos del mismo linaje materno (Tablas IV - V).

Tomando en cuenta la dominancia del haplotipo NPBW01 en la población (Apéndice 3), su alta frecuencia dentro de cada grupo núcleo llevaría a sobrestimar las asociaciones entre linajes maternos y el nivel de organización social a nivel de grupos maternos. Ya que cerca del 50% de los individuos aquí analizados presentaron el mismo haplotipo, la mayor probabilidad de asociación entre individuos de este linaje podría estar generando un efecto falso de afinidad al linaje materno.

Con base en lo anterior, se consideró más adecuado el evaluar si dentro de los patrones de asociación existía una mayor frecuencia de los clados de linajes maternos descritos en el estudio sobre la estructura genética de la ballena azul de Enríquez-Paredes (2005), en el que se reporta la existencia de dos clados divergentes de linajes maternos, el clado I y el clado II, representados respectivamente por el 80% y el 20% de los individuos de la población.

Si los individuos de cada clado se asociaran preferentemente entre ellos, se esperaría que la mayoría de los individuos foráneos o solitarios pertenecieran a un mismo clado mitocondrial, así como la formación de grupos núcleo mayoritariamente representados por individuos de uno u otro clado. Sin embargo, al analizar las proporciones de estos clados dentro de las categorías de asociación, en todos los casos se encontró una proporción similar y consistente a la reportada por Enríquez-Paredes (*op.cit*). Por lo tanto, no se

encontró una evidencia sólida de que los individuos se asocian preferentemente con otros miembros de su linaje materno.

Los patrones de asociación observados para ballena azul pudieran tener cierta similitud con el que se presenta en el esquema de organización social de elefantes africanos. Al analizar los patrones de asociación entre hembras reproductivamente activas en una población de elefantes africanos, Wittemyer y sus colaboradores (2009) encontraron que la formación de los grupos sociales no tenían como base principal el parentesco, pero que si había cierta afinidad entre individuos por su linaje materno. Estos autores sugieren que dichas asociaciones no tienen como fin beneficiar la eficacia inclusiva a nivel familiar, sino que los beneficios directos individuales juegan un papel importante para la formación y mantenimiento de lazos sociales entre individuos, independientemente de su nivel de parentesco.

6.4. La organización social de la ballena azul en el Golfo de California y su relación con el uso del hábitat.

Si bien se ha argumentado ampliamente que el beneficio ecológico a nivel individual es la base de las relaciones sociales entre individuos sin parentesco cercano (Armitage 1987), la razón costo-beneficio del comportamiento social se traduce finalmente en el éxito reproductivo de cada individuo (Hamilton 1964).

Mediante la comparación de las diferentes criterios de asociación entre las ballenas azules aquí estudiadas, se evidenciaron relaciones de parentesco de todos los niveles; los individuos solitarios exhibieron niveles de parentesco similares a los observados entre los individuos asociados, se encontraron parientes cercanos y lejanos entre los individuos foráneos y las parejas madre-cría, e incluso entre los individuos núcleo, que utilizan con mayor frecuencia la porción sureste del Golfo de California (Gendron 2002, Martínez-Serrano 2005), los niveles de parentesco resultaron muy variables.

Durante el invierno y la primavera, existen en esta zona importantes agregaciones del eufáusido *Nictyphanes simplex* que constituye una de las principales fuentes de alimento de las ballenas azules (Gendron 1990, 2002, Del Ángel-Rodríguez 1997, Jiménez-Pinedo *et al.* 2010), por lo que con frecuencia pueden observarse en la zona agregaciones dispersas de varias ballenas azules inmersas en actividades de alimentación.

Aunque también en otras especies de misticetos este tipo de agregaciones alimentarias se observan comúnmente (Watkins *et al.* 1976), solo en la ballena jorobada se ha reportado un comportamiento altruista en el que los individuos maximizan el uso del recurso al alimentarse de forma cooperativa. No obstante, recientemente se ha demostrado que los individuos involucrados en los grupos cooperativos no tienen un parentesco cercano (Valsecchi 2002; Pomilla y Rosenbaum 2006). De forma similar, en el presente estudio tampoco se

encontraron diferencias en los niveles de parentesco entre las agregaciones indirectas evaluadas con base en la presencia o ausencia de la zona en la escala temporal (años o meses, Tablas VIII y IX), que es la escala en la que se presentan las agregaciones de alimentación.

Por otro lado, aunque los grupos núcleo descritos para la ballena azul por Martínez-Serrano (2005) no son tan compactos y están conformados por individuos de ambos sexos, además de tener una estabilidad aparentemente menor a la que se presenta en los grupos de ballenas jorobadas en sus agregaciones invernales (e.g. Weinrich 2006), estos pudieran estar también relacionados con las actividades reproductivas.

Aunque se ha inferido, con base en datos de captura, que las actividades reproductivas de la ballena azul se presentan durante invierno-primavera (Lockyer 1984, Yochem y Leatherwood 1985) y se ha reconocido al Golfo de California como una importante zona para la crianza y el reclutamiento, no existen evidencias claras que indiquen que en la zona se llevan a cabo conductas de cortejo y/o cópula (Gendron 2002; Martínez-Serrano 2005). No obstante, la extremadamente baja probabilidad de identidad, así como la baja frecuencia de valores de parentesco superiores a 0.5 (Fig. 5, Tabla III), que son característicos de la cruce entre parientes de primer orden (Cronin *et al.* 1999), sugieren la posible existencia de estrategias que minimizan la endogamia.

Si en la zona se estuviesen llevando a cabo actividades relacionadas con el cortejo y la cópula, la asociación de individuos sin relaciones fuertes de parentesco con las hembras reproductivamente activas (grupos núcleo) podría explicar los valores de parentesco tan bajos (ausencia de endogamia).

La función social de los grupos núcleo, así como de resto de los patrones de asociación que exhibe la ballena azul en el Golfo de California, no resulta clara. Si bien el estudio de Martínez-Serrano (2005) evidenció patrones claros de asociación, surge aún la incógnita sobre el por qué en la ballena azul ciertos individuos se asocian con mayor frecuencia. Sin duda las interacciones sociales están relacionadas con las necesidades particulares de los individuos, que cambiarán en función del lugar y el momento en que se hayan observado; por ejemplo alimentación, crianza o reproducción. Por ahora, las estimaciones de parentesco de los distintos patrones de asociación que aquí se presentan, sugieren que son las estrategias a nivel individual, y no la selección por parentesco, las que aparentemente rigen la organización social de la especie y sobre las que deberán enfocarse los estudios futuros.

6.5. Aspectos relacionados con el estado actual de la población y las estrategias de conservación.

6.5.1. Estado actual de la población.

Las ballenas azules que ocupan el Golfo de California durante la temporada invernal, se consideran parte de la población del Pacífico Nororiental, cuyo tamaño poblacional se estima actualmente en cerca de 3000 individuos (Wade y Gerrodette 1993, Mate *et al.* 1999, Calambokidis y Barlow 2004, Calambokidis *et al.* 2009).

Aunque se desconoce el impacto que tuvo la captura comercial sobre esta población, actualmente la especie está clasificada como en peligro de extinción (IUCN). Sin embargo, la población de ballenas azules del Pacífico Nororiental representa el mayor remanente poblacional de la especie y existen algunas evidencias que apuntan hacia su recuperación, por lo que esta población se considera estratégica para la conservación (Calambokidis 1995; NOAA 2009).

Los niveles de heterocigosidad de los microsatélites analizados resultaron intermedios a los reportados para otras especies de mysticetos con tamaños poblacionales mayores y menores a los estimados para la población de ballena azul del Pacífico Nororiental. Por ejemplo, la población de rorcual común en el Atlántico Norte, cuya abundancia se ha estimado en más de 40,000 individuos, exhibe valores de heterocigosidad de 0.82 (Bérubé *et al.* 1998). Por otro lado, la

población de esta misma especie que habita en el Golfo de California, estimada en 300 individuos (Enríquez 1996), presenta una heterocigosidad de 0.42 (Bérubé *op.cit.*).

Considerando lo anterior, el valor de 0.56 encontrado para la ballena azul, resulta congruente con la estimación de 3,000 individuos arriba mencionada y ofrece evidencia adicional que concuerda no solo con la idea de que los individuos que ocupan el Golfo de California constituyen una importante porción de la población que se distribuye en el Pacífico Nororiental, sino también con las evidencias que sugieren que la captura comercial no redujo esta población a niveles críticos y que se ha recuperado a niveles cercanos al 70% de su abundancia original (Enríquez-Paredes, 2005). Una reducción significativa en el número de individuos se reflejaría en valores de heterocigosidad menores y en valores de parentesco mayores a los aquí detectados.

En resumen, los niveles de heterocigosidad y de parentesco que exhiben los individuos de esta especie en el Golfo de California, indican un buen estado de salud genética y no reflejan un tamaño efectivo poblacional reducido.

6.5.2. El Golfo de California como hábitat crítico de la ballena azul.

Una de las principales estrategias para la conservación de la ballena azul es la identificación y la protección de aquellos hábitat esenciales para la supervivencia y la recuperación de la especie (Reeves *et al.* 1998). Pese a que el Golfo de California ha sido ampliamente reconocido como un hábitat crítico para la crianza y el reclutamiento de la ballena azul (Gendron 2002, Enríquez-Paredes 2005, Martínez-Serrano 2005), los resultados del presente estudio aportan evidencia adicional que resalta aún más la importancia de esta zona.

Dado que las estimaciones de parentesco observadas indican la presencia de por lo menos tres generaciones de ballenas azules que utilizan el Golfo de California durante la temporada invernal y que el parentesco entre las crías tiene un valor medio similar al encontrado entre el resto de los individuos (Tabla VI), es posible mencionar que dichas crías representan a la progenie de individuos de todos los niveles de parentesco y no sólo de un grupo reducido de reproductores. En otras palabras, la cópula entre las ballenas azules que utilizan el Golfo de California, ya sea que se lleve a cabo o no en esta zona, debe presentarse entre individuos sin parentesco cercano. Si sucediera lo contrario, los valores de parentesco de las crías serían superiores al del promedio de los adultos, al representar solo una porción de las variantes génicas presentes en la población (*e.g.* Cronin *et al.* 1999).

Por otro lado, aún cuando las diferencias en el parentesco observadas entre los clados de linajes maternos apoyan la idea planteada por Enríquez-Paredes (2005) con respecto a la presencia de dos grupos filogenéticamente divergentes de ballenas azules en el Golfo de California, en el presente estudio se encontró evidencia que sugiere que no existen limitantes para que se reproduzcan individuos entre ambos clados mitocondriales (Figura 6A).

Así, ballenas de distintas generaciones, los linajes maternos y la ausencia de una organización social mediada por el parentesco (que pudiera promover el aislamiento reproductivo), resalta la importancia del Golfo de California como un hábitat crítico para la conservación de la ballena azul al representar no solo una zona de crianza y de reclutamiento, sino también el hábitat invernal de los reproductores.

7. CONCLUSIONES

- El alto polimorfismo y los valores de heterocigosidad del conjunto de microsatélites empleado permitió identificar a nivel individual a las ballenas azules que ocupan el Golfo de California y estimar confiablemente sus relaciones de parentesco.
- Dentro de cada categoría de asociación, directa o indirecta, los individuos exhibieron valores de parentesco variables, por lo que debe ser otra la fuerza de cohesión que mantiene los lazos sociales en las ballenas azules durante su estancia invernal dentro del Golfo de California.
- Las ballenas azules tienden a asociarse preferentemente con individuos con lazos de parentesco débiles, lo que permite suponer que son los beneficios ecológicos a nivel individual y no la selección de parentesco, los que están mediando las asociaciones de la especie dentro del Golfo de California.
- Los niveles tan bajos de parentesco promedio entre los individuos analizados, en conjunto con la baja probabilidad de identidad individual estimada con los microsatélites, sugieren una condición genética “saludable” para las agregaciones del Golfo de California, con un tamaño efectivo poblacional suficiente y sin depresión endogámica.

8. LITERATURA CITADA

- Alexander RD. 1974. The evolution of social behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5: 325-83.
- Aljanabi SM e I Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-base techniques. *Nucleic Acid Research* 25: 4692-4693.
- Amos W, J Barret y GA Dover. 1991. Breeding behaviour of pilot whales revealed by DNA fingerprinting. *Heredity* 67: 49-55.
- Armitage K. 1987. Social dynamics of mammals: Reproductive success, kinship and individual fitness. *Trends in Ecology and Evolution* 2(9): 279-284.
- Anderson AD y BS Weir. 2007. A maximum-likelihood method for the estimation of pairwise relatedness in structured populations. *Genetics* 176: 421-440.
- Arnbom T, V Papastavrou, LS Weilgart y H Whitehead. 1987. Sperm whales react to an attack by killer whales. *Journal of Mammalogy* 8: 450-53.
- Awise JC. 1998. Conservation genetics in the Marine Realm. *Journal of Heredity* 89: 377-382.
- Barnard CJ. 1983. *Animal Behaviour: Ecology and evolution*. London, Croom Helm. 339 pp.
- Barnard CJ. 2004. *Animal Behavior. Mechanisms, development, function and evolution*. Prentice Hall. England. 726 pp.
- Bérubé M y P Palsbøll. 1996. Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and SFY specific primers. *Molecular Ecology* 5(2): 283-287.
- Bérubé M, A Aguilar, D Dendanto, F Larsen, GN Disciara, R Sears, J Sigurjónsson, J Urbán-Ramírez y PJ Palsboll. 1998. Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758): analysis of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Ecology* 7: 585-599.
- Bérubé M, MB Rew, H Skaug, H Jorgensen, J Robbins, P Best, R Sears y PJ Palsbøll. 2005. Polymorphic microsatellite loci isolated from humpback whale, *Megaptera novaeangliae* and fin whale, *Balaenoptera physalus*. *Conservation Genetics* 6: 631-636.

- Best BP, CM Schaeff, D Reeb y PJ Palsbøll. 2005. Composition and possible function of social groupings of southern right whales in South African waters. *Behaviour* 140: 1469-1494.
- Bigg M, P Olesiuk, G Ellis, J Ford y K Balcomb. 1990. Social organization and genealogy of resident killer whales (*Orcinus orca*) in the coastal waters of British Columbia and Washington State. *Reports of the International Whaling Commission* (Special Issue 12): 383–405.
- Bink MCA, AD Anderson, WE van de Weg y EA Thompson. 2008. Comparison of marker-based pairwise relatedness estimators on a pedigreed plant population. *Theoretical and Applied Genetics* 117(6): 843-855.
- Blouin MS. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* 18(10): 503-511.
- Bourret V, M Macé, M Bonhomme y B Crouau-Roy. 2008. Microsatellites in cetaceans: an overview. *The Open Marine Biology Journal* 2: 38-42.
- Buchanan FC, MK Friesen, RP Littlejohn, JW Clayton. 1996. Microsatellites from the beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *Molecular Ecology* 5: 571-575.
- Calambokidis J. 2009. Insights into the population structure of blue whales in the Eastern North Pacific from recent sightings and photographic identification. *Marine Mammal Science* 25(4): 816-832.
- Calambokidis J y J Barlow. 2004. Abundance of blue and humpback whales in the eastern North Pacific estimated by capture-recapture and line-transect methods. *Marine Mammal Science* 21(1): 63-85.
- Calambokidis J, R Sears, GH Steiger y J Evenson. 1995. Movement and stock structure of blue whales in the eastern North Pacific. En: Abstracts 11th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Orlando, Florida, 14-18 December 1995. Society for Marine Mammalogy, Lawrence, KA.
- Calambokidis J, GH Steiger, JC Cabbage, KC Balcomb, C Ewald, S Kruse, R Wells y R Sears. 1990. Sightings and movements of blue whales off Central California 1986-1988 from photoidentification of individuals. *Reports of the International Whaling Commission* (Special Issue 12): 343-348.
- Clapham P, P Palsbøll, DK Mattila y O Vasquez. 1992. Composition and dynamics of humpback whale competitive groups in the West Indies. *Behaviour* 122(3/4): 182-194.
- Clapham PJ. 1996. The social and reproductive biology of humpback whales: an ecological perspective. *Mammal Review* 26(1): 27-49.

- Connor RC, J Mann, PL Tyack y H Whitehead. 1998. Social evolution in toothed whales. *Trends in Ecology and Evolution* 13(6): 228-232.
- Connor RC, Wells R, Mann J y A Read. 2000. The bottlenose dolphin: social relationships in a fission–fusion society. En: Mann J, RC Connor, PL Tyack y H Whitehead (Eds). *Cetaceans societies: field studies of dolphins and whales*. The University of Chicago Press. Chicago. p91–126.
- Crnokrak P y DA Roff. 1999. Inbreeding depression in the wild. *Heredity* 83: 260-270.
- Cronin M, R Shideler, J Hechtel, C Strobeck y D Paetkau. 1999. Genetic relationships of grizzly bears (*Ursus arctos*) in the Prudhoe Bay region of Alaska: Inference from microsatellite DNA, mitochondrial DNA, and field observations. *Journal of Heredity* 90: 622-628.
- Del Ángel-Rodríguez J. 1997. Hábitos alimentarios y distribución espacio-temporal de los rorcuales común (*Balaenoptera physalus*) y azul (*Balaenoptera musculus*) en la Bahía de La Paz, B .C. S., México. Tesis de Maestría. Centro interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. La Paz, Baja California Sur, México. 68 pp.
- Enríquez L. 1996. Ocurrencia, movimientos, tamaño y estructura de las agregaciones de rorqual común *Balaenoptera physalus* en el Golfo de California, México. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma de Baja California.
- Enríquez-Paredes L. 2005. Identidad genética de la población de ballena azul (*Balaenoptera musculus*) en el Pacífico Nororiental: Agregaciones Mexicanas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California. México. 198 pp.
- Erwin TL. 1991. An evolutionary basis for conservation strategies. *Science* 253: 750-752.
- Excoffier L, G Laval y S Schneider. 2005. Arlequin v3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Gendron D. 1990. Relación entre la abundancia de eufaúsidos y de ballenas azules (*Balaenoptera musculus*) en el Golfo de California. Tesis de maestría. Centro interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. La Paz, Baja California Sur, México. 64 p.
- Gendron D y S Mesnick. 2001. Sloughed skin: a method for the systematic collection of tissue samples from Baja California blue whales. *Journal of Cetacean Research and Management* 3(1): 77-79.

- Gendron D. 2002. Ecología poblacional de la ballena azul, *Balaenoptera musculus*, de la Península de Baja California. Tesis de doctorado. CICESE. Ensenada, B.C. 112 p.
- Gero S, D Engelhaupt y H Whitehead. 2008. Heterogeneous social associations within a sperm whale, *Physeter macrocephalus*, unit reflect pairwise relatedness. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63(1): 143-151.
- Goerlitz DS, J Urbán-Ramírez, 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. *Canadian Journal of Zoology* 81: 1965–1972.
- Hamilton WD. 1964. The genetical evolution of social behaviour I. *Journal of Theoretical Biology* 7: 1-52.
- Hedrick PW y ST Kalinowski. 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 139-162.
- Hoelzel AR. 1998. Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: implications for conservation policy. *Journal of Heredity* 89: 451-458.
- Hughes C. 1998. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. *Ecology* 79(2): 383-399.
- Hucke-Gaete R, LP Osman, CA Moreno, KP Findlay y DK Ljungblad. 2004. Discovery of a blue whale feeding and nursing ground in southern Chile. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271: 170-173.
- Jiménez-Pinedo C, D Gendron y K Acevedo-Whitehouse. 2010. Dieta de dos rorcuales simpátricos mediante análisis morfológicos y moleculares en muestras fecales. En: Resúmenes de la XXXII Reunión internacional para el estudio de los mamíferos marinos. Veracruz, México.
- Jorde PE, T Schweder, JW Bickham, GH Givens, R Suydam, D Hunter y NC Stenseth. 2007. Detecting genetic structure in migrating bowhead whales off the coast of Barrow, Alaska. *Molecular Ecology* 16(10): 1993-2004.
- Kalinowski ST, AP Wagner, ML Taper. (2006) ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6: 576–579.
- Keller LF y DM Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 230-241.
- Krause J y GD Ruxton. 2002. Living in groups. Oxford University Press. USA. 240 pp.

- Lang AR, DW Weller, RG LeDuc, AM Burdin y RL Brownell. 2010. Genetic differentiation between western and eastern (*Eschrichtius robustus*) gray whale populations using microsatellite markers. Paper SC/62/BRG11 presented to the IWC Scientific Committee of the International Whaling Commission, Agadir, June 2010. Available from: IWC Secretariat, Cambridge, UK.
- LeDuc RG. 1997 Mitochondrial systematics of the Delphinidae. Tesis de doctorado. Scripps Institute of Oceanography. University of California, USA.
- LeDuc RG, DW Weller, J Hyde, AM. Burden, PE Rosel, RL Brownell Jr, B Würsig y AE Dizon. 2002. Genetic differences between western and eastern gray whales (*Eschrichtius robustus*). *Journal of Cetacean Research Management* 4(1): 1-5.
- LeDuc RG, AE Dizon, M Goto, LA Pastene, H Kato, S Nishiwaki, CA LeDuc, y RL Brownell. 2007. Patterns of genetic variation in Southern Hemisphere blue whales and the use of assignment test to detect mixing on the feeding grounds. *The Journal of Cetacean Research and Management* 9(1): 73-80.
- Lynch M y K Ritland. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152: 1753-1766.
- Lynch M y B Walsh. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Canada. 980 pp.
- Lockyer CH. 1984. Review of baleen whale reproduction and implications for management. *Report of the International Whaling Commission* (Special issue 6): 27-50.
- McDonald MA, SL Mesnick y JA Hildebrand. 2006. Biogeographic characterization of blue whale song worldwide: using song to identify populations. *Journal of Cetacean Research and Management* 8(1): 55-65.
- Martínez-Serrano I. 2005. Patrón de asociaciones entre individuos de ballena azul (*Balenoptera musculus*) en el suroeste del Golfo de California, México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, BCS. México. 95 pp.
- Mate BR y BA Lagerquist. 1999. Movements of North Pacific blue whales during the feeding season off Southern California and their Southern Fall migration. *Marine Mammal Science* 15(4): 1246-1257.
- Milligan B. 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 163: 1153-1167.
- Moritz C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* 51(2): 238-254.

- NOAA. 2009. Blue whale (*Balaenoptera musculus*): Eastern North Pacific stock. 177-182.
- O'Brien SJ. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Science* 91: 5748-5755.
- Oliehoek PA, JJ Winding, JAM van Arendonk y P Bijma. 2006. Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservations programs. *Genetics* 173: 483-496.
- Ottensmeyer CA y H Whitehead. 2003. Behavioural evidence for social units in long-finned pilot whales. *Canadian Journal of Zoology* 81(8): 1327-1338.
- Palsbøll PJ, PJ Clapham, DK Matila, F Larsen, R Sears, HR Siegismund, J Sigurjonsson, O Vázquez y P Arcantader. 1995. Distribution of the mtDNA haplotypes in the North Atlantic humpback whales: the influence of behavior on population structure. *Marine Ecology Progress Series* 116: 1-10.
- Park SDE. 2008. Trypanotolerance in west african cattle and the population genetic effects of selection. Tesis de doctorado. University of Dublin.
- Peakall R y PE Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pemberton JM. 2010. Wild pedigrees: the way forward. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 613-621.
- Pomilla C y HC Rosenbaum. 2006. Estimates of relatedness in groups of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on two wintering grounds of the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 15(9): 2541-2555.
- Queller DC y KF Goodnight. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43(2): 258-275.
- Reed DH y R Frankham. 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55:1095-1103.
- Reeves RR, PJ Clapham y SE Wetmore. 2002. Humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) occurrence near the Cape Verde Islands based on American 19th century whaling records. *Journal of Cetacean Research and Management* 4(3): 235-253.
- Reilly SB, JL Bannister, PB Best, M Brown, Jr. Brownell, RL Butterworth, DS Clapham, PJ Cooke, J Donovan, J Urbán y AN Zerbini. 2008. *Balaenoptera musculus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. <www.iucnredlist.org>

- Richard KR, MC Dillon, H Whitehead y JM Wright. 1996. Patterns of kinship in groups of free-living sperm whales (*Physeter macrocephalus*) revealed by multiple molecular genetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 8792-8795.
- Rocha M y J Gasca. 2007. Ecología molecular de la conservación. En: Eguiarte LE, V Souza y X Aguirre (Eds). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, 251–272 pp.
- Rooney AP, DB Merritt y JN Derr. 1999. Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Heredity* 90 (1): 228-253.
- Ross KG. 2001. Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology* 10: 265-284.
- Schlotterer C. 2004. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 63–69.
- Sears R, C Berchok, P Palsboll, T Doniol-Valcrose y C Ramp. 2001. Gender related structure in blue whale (*Balaenoptera musculus*) pairs from eastern Canadian waters. Abstracts of Thirteen Biennial Conferences on the Biology of Marine Mammals. Wailea, Hawaii. 169 p.
- Selkoe K y RJ Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Szabo A y D Duffus. 2008. Mother-offspring association in the humpback whale, *Megaptera novaeangliae*: following behaviour in an aquatic mammal. *Animal Behaviour* 75: 1085-1092.
- Tamura K, J Dudley, M Nei y S Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Taylor BL, SJ Chivers J, Larese y WF Perrin. 2007. Generation length and percent mature estimates for IUCN assessments of cetaceans. Administrative Report LJ-07-01, Southwest Fisheries Science Center, 8604 La Jolla Shores Blvd., La Jolla, CA 92038, USA. 24 pp.
- Tomilin AG. 1967. Mammals of the U.S.S.R. and adjacent countries. Vol. IX. Cetacea. Israel program for Scientific Translations, Jerusalem 72-112.

- Thompson EA. 1975. Estimation of pairwise relationships. *Annals of Human Genetics* 39: 173-188.
- Valière N. 2002. GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2: 377-379.
- Valsecchi E y W Amos. 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology* 5(1): 151-156.
- Valsecchi E, P Hale, P Corkeron y W Amos. 2002. Social structure in migrating humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Molecular Ecology* 11: 507-518.
- Van Nieuwerburgh F, E Goetghebeur, M Vandewoestyne y D Deforce. 2009. Impact of allelic dropout on evidential value of forensic DNA profiles using RMNE. *Bioinformatics* 25(2): 225–229.
- Van Oosterhout C, WF Hutchinson y P Shipley. (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Wade PR y T. Gerrodette. 1993. Estimates of cetacean abundance and distribution in the Eastern Tropical Pacific. *Reports of the International Whaling Commission (SC/44/O 18)* 43: 477-494.
- Waits LP, G Luikart y P Taberlet. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10: 249-256.
- Wang J. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203-1215.
- Wang J. 2004. Estimating pairwise relatedness from dominant genetic markers. *Molecular Ecology* 13: 3169–3178.
- Wang J. 2006. Informativeness of genetic markers for pairwise relationship and relatedness inference. *Theoretical Population Biology* 70(3): 300-321.
- Watkins WA y WE Schevill. 1976. Right whale feeding and baleen rattle. *Journal of Mammalogy* 57(1): 58-66.
- Weinrich MT y AE Kuhlberg. 1991. Short-term association patterns of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) groups on their feeding grounds in the southern Gulf of Maine. *Canadian Journal of Zoology* 69(12): 3005-3011.

- Weinrich MT, H Rosenbaum, CS Baker, AL Blackmer y H Whitehead. 2006. The influence of maternal lineages on social affiliations among humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on their feeding grounds in the Southern Gulf of Maine. *Journal of Heredity* 97(3): 226-234.
- Weir BS, AD Anderson y AB Helper. 2006. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Genetics* 7: 771-780.
- Whitehead H, J Christal y PL Tyack. 2000. Studying cetacean social structure in space and time. En: Mann J, RC Connor, PL Tyack y H Whitehead. (Eds). *Cetacean Societies. Field studies of dolphins and whales*. The University of Chicago Press. Chicago. 65-87 pp.
- Wilson DE y S Ruff. 1999. *The Smithsonian book of North American mammals*. Smithsonian Institution Press. Washington, D.C. 740 pp.
- Wolf JB y F Trillmich. 2008. Kin in space: social viscosity in a spatially and genetically substructured network. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 2063-2069.
- Wittemyer G, JBA Okello, HB Rasmussen, P Arctander, S Nyakaana, I Douglas-Hamilton y HR Siegismund. 2009. Where sociality and relatedness diverge: the genetic basis for hierarchical social organization in African elephants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276: 3513-3521.
- Yochem PK y S Leatherwood. 1985. Blue whale. En: S. H. Ridgeway y R. Harrison (Eds), *Handbook of Marine Mammals Vol. 3: The sirenians and baleen whales*. Academic Press. NY. p193-240.
- Yu HT, YY Liao y CH Kao. 2001. Relatedness structure and individual identification in a semi-fossorial shrew (Soricidae: *Anourosorex squamipes*) – an application of microsatellite DNA. *Zoological Studies* 40(3): 226-232.

Apéndice 1

Protocolos de amplificación por PCR del sistema ZFX-ZFY de los cromosomas sexuales y del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial (dHvI-RC-mt).

La extracción del ADN total se realizó a partir de 30 mg de tejido epidérmico (biopsia o piel descamada) mediante el método de sales-Proteinasa K (Aljanabi y Martínez 1997). La calidad del ADN obtenido fue evaluada a través de una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.5 µg/µL) y cuantificada en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000). Las muestras de ADN fueron diluidas a una concentración de entre 15 y 30 ng/µL para su posterior amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Tanto para la identificación molecular del sexo como para la asignación del linaje materno se utilizó las siguiente mezcla de reacción para la amplificación por PCR a partir de 15 ng de DNA: solución amortiguadora con Tris-HCl 22 mM (pH 8.4), cloruro de potasio (KCl) 55 mM, cloruro de magnesio (MgCl₂) 3.0 mM, mezcla de nucleótidos (dNTPs) 0.22 mM, 280 picomoles de cada cebador y 1.1 U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen™).

Región amplificada	Tamaño del amplicon	Cebadores	Referencia
ZFX/ZFY	328 pb ZFX 254 pb ZFY	ZFX 0582 (5'-ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA-3') ZFY 0785 (5'-CACTTATGGGGGTAGTCCTTT-3') ZFY 0752 (5'-ATTACATGTCGTTTCAAATCA-3')	Bérubé y Palsboll 1996
dHvI-RC-mt	540 pb	Tro (5'-CCTCCCTAAGACTCAAGG-3') Dxx (5'-CCTGAAGTAAGAAACCAGATG-3')	LeDuc <i>et al.</i> 1997

El perfil de temperaturas empleado para amplificar ambos marcadores fue el siguiente: desnaturalización inicial de 4 min a 94°C seguido de 35 ciclos de amplificación con 45 s de desnaturalización a 95°C, 45 s de alineación a 52°C, 60 s de extensión de la cadena a 72°C. Por último, un ciclo de 7 min a 70°C de extensión para permitir la extensión completa de los productos de PCR.

Apéndice 2

Microsatélites polimórficos reportados para la ballena azul que fueron probados en el presente estudio

En la siguiente tabla se enlistan los microsatélites polimórficos reportados para la ballena azul (*locus*), las secuencias de los cebadores, el tamaño de los alelos (pares de bases) y el número de alelos encontrados en otros estudios y los problemas encontrados durante la optimización y el proceso de control de calidad.

Locus	Cebadores	Tamaño (pb)	Alelos	Control de calidad
DirFCB017 ^a	5'-TCAGCCTCTATAACGTCCTGAGC-3' 5'-ATGGGGACTGCCTATATTAGTCAG-3'	138-225	?	
GT023 ^b	5'-GTTCCAGGCTCTGCACTCTG-3' 5'-CATTTCCTACCCACCTGTCAT-3'	122-136	8	
GATA028 ^c	5'-AAAGACTGAGATCTATAGTTA-3' 5'-CGCTGATAGATTAGCTAGG-3'	146-202	15	
Ev037 ^d	5'-AGCTTGATTGGAAGTCATGA-3' 5'-TAGTAGAGCCGTGATAAAGTGC-3'	178-224	?	
AC045 ^e	5'-AGCAGCCCAACACATTCAAGA-3' 5'-TGACCACTCACCTTCACACTTC-3'	178-182	3	
GATA053 ^c	5'-ATTGGCAGTGGCAGGAGACCC-3' 5'-GACACAGAGATGTAGAGGGAG-3'	192-196	2	Poco informativo, alta homocigosidad
CAAA074 ^e	5'-ATGCTGGTGTTCCTGTATCA-3' 5'-TTGTCTCCTGCTGGCTGATTA-3'	139-147	3	
AC082 ^e	5'-ATTAGTCCTGTTTCTCTGGAG-3' 5'-CAGATGTTCTGTGAGTACTTG-3'	125-131	4	
AC087 ^c	5'-ACCAGGGTGGGTTCTTAAACTA-3' 5'-GCTTCCAGAAGCAATGATGGA-3'	172-184	4	
GATA098 ^c	5'-TGTACCCTGGATGGATAGATT-3' 5'-TCACCTTATTTTGTCTGTCTG-3'	100-148	8	
GT122 ^e	5'-CCTTTTAAAACCCAGAATGTAG-3' 5'-TGTTTGCAGTGACGAATGAAAGG-3'	132-134	2	Desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg
CA128 ^e	5'-ATGGGAAGTATTATTTCTGGCAC-3' 5'-GTCCATGAACCCCTAGAGTAT-3'	57-85	7	Producto de PCR de mayor tamaño Secuencia sin motivo repetitivo CA

^a Buchanan et al. 1996; ^b Berube et al. 2000; ^c Palsboll et al. 2005; ^d Valsecchi y Amos 1996; ^e Bérubé 2005.

Apéndice 2 (continuación)

Microsatélites polimórficos reportados para la ballena azul que fueron probados en el presente estudio

En esta se detallan las secuencias de los cebadores específicos para *loci* microsatélites reportados como polimórficos para la ballena azul. Se indica también el tamaño reportado de los alelos (pares de bases), el número de alelos encontrados en otros estudios. Adicionalmente se incluye información referente a los problemas particulares encontrados durante la optimización y el proceso de control de calidad.

Locus	Cebadores	Tamaño (pb)	Alelos	Control de calidad
GT129 ^a	5'-CGCAATGAAGAGTTAAAAGAATG-3' 5'-GCACTGGTGAATGCAGATTGA-3'	91-93	2	
AC137 ^a	5'-ACCACTTTGTGGAGAATAGAC-3' 5'-TAGGTCCCTGTTGCAGAGAG-3'	93-115	6	
CA141 ^a	5'-CTCTGCATTGGGATGGCTCTG-3' 5'-GCGGTAGAACACGTGCCACTG-3'	169-183	5	Desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg
GT142 ^a	5'-CTGAGTAATATCCACCATAC-3' 5'-ATGGATAAAGAAGATGTGGGG-3'	66-90	7	Ausencia de señal fluorescente durante el genotipado
GT227 ^a	5'-GTAATCATCATGGACTCA-3' 5'-CACTTTACTTTGTCTGTTGGC-3'	117	1	
CA232 ^a	5'-GATCACATAATCTTGATCAGA-3' 5'-CACTCAGATTAAGACTTCAGA-3'	168-172	3	
CA234 ^a	5'-TGGATCCTCTACCTACCTTAG-3' 5'-CAACCTTATTCTTGACCTCAT-3'	198-210	5	
GT238 ^a	5'-CTTAAATGCAGTAGGAAGCCA-3' 5'-TGCATATCTAATCATGTTACTTGCCCTG-3'	127-131	2	Pobre señal fluorescente durante el genotipado Ambigüedad en las lecturas del tamaño de los alelos
ACCC392 ^c	5'-CTGATGTTGGTTGATTAC-3' 5'-CTTCCCTCCATCCAAGTATGG-3'	211-367	8	Amplificación no reproducible
GATA417 ^c	5'-CTGAGATAGCAGTTACAT-3' 5'-TCTGCTCAGGAAATTTCAAG-3'	181-253	13	
GT541 ^e	5'-CTTCACACTATTAGGATGCC-3' 5'-CCTTTATATCCTTGCCAAGAC-3'	92-102	4	

^a Buchanan et al. 1996; ^b Berube et al. 2000; ^c Palsboll et al. 2005; ^d Valsecchi y Amos 1996; ^e Bérubé 2005.

De los 23 microsatélites probados, se descartaron los microsatélites ACCC392 y CA128. Pese a que el *locus* ACCC392 se ha usado exitosamente en la ballena azul (LeDuc et al. 2007), en el presente análisis no exhibió un patrón consistente y reproducible de amplificación. Para el *locus* CA128 se obtuvieron productos de PCR de mayor tamaño a los reportados por Bérubé y colaboradores (2005), además de que el análisis de su secuencia no indicó la presencia del motivo repetitivo CA.

Apéndice 2 (continuación)

Genotipado y control de calidad.

Del conjunto de microsatélites descrito en la tabla anterior se logró amplificar exitosamente la totalidad de las muestras seleccionadas (92 individuos). Sin embargo, se evidenciaron ciertos problemas en los microsatélites GT142 y GT238, por lo que fueron descartados con base en los criterios de control de calidad del registro automatizado de los fragmentos.

Aunque el tamaño de los productos de PCR del microsatélite GT142 coincidió con los reportados previamente por Bérubé y colaboradores (2005), durante el análisis de fragmentos automatizado no se obtuvo una señal significativa de fluorescencia para sus alelos. En el caso del *locus* GT238 se presentaron ambigüedades en el genotipado asociadas a la presencia de tartamudeo y bajas intensidades en la señal fluorescente. De esta forma, los genotipos *multilocus* quedaron integrados por la información de 19 *loci* microsatélites.

Adicionalmente, se analizaron las muestras utilizadas como controles positivos (cinco individuos con duplicado en las reacciones de PCR) para asegurar la consistencia en la asignación de los alelos. Todas las muestras, incluyendo a los controles positivos, fueron asignados de igual forma por los observadores independientes, por lo que el error en el genotipado fue nulo (tasa de error = 0).

Después de revisar que la asignación de los genotipos fuera la correcta, se calcularon las frecuencias alélicas y se utilizaron los programas MICRO-CHECKER, ARLEQUIN, GenALEx y MSTOOLS v3.1 para evaluar el polimorfismo, los niveles de heterocigosidad, la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg, el desequilibrio del ligamiento.

Con el objeto de reducir la probabilidad de introducir sesgo en las posteriores estimaciones de parentesco, aquellos microsatélites que mostraron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) o desequilibrio en el ligamiento (LD), fueron eliminados de los genotipos *multilocus* (renglones sombreados). Los microsatélites GT122 y CA141 exhibieron consistentemente desviaciones significativas HWE, además de que no fueron los de mayor poder informativo. Después de aplicar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples independientes ($\alpha=0.002$), ninguno de los pares de microsatélites mostró evidencias de desequilibrio en el ligamiento.

Finalmente, por cuestiones prácticas, también el microsatélite GATA053 fue removido al ser el menos informativo.

Apéndice 2 (continuación)

Genotipado y control de calidad.

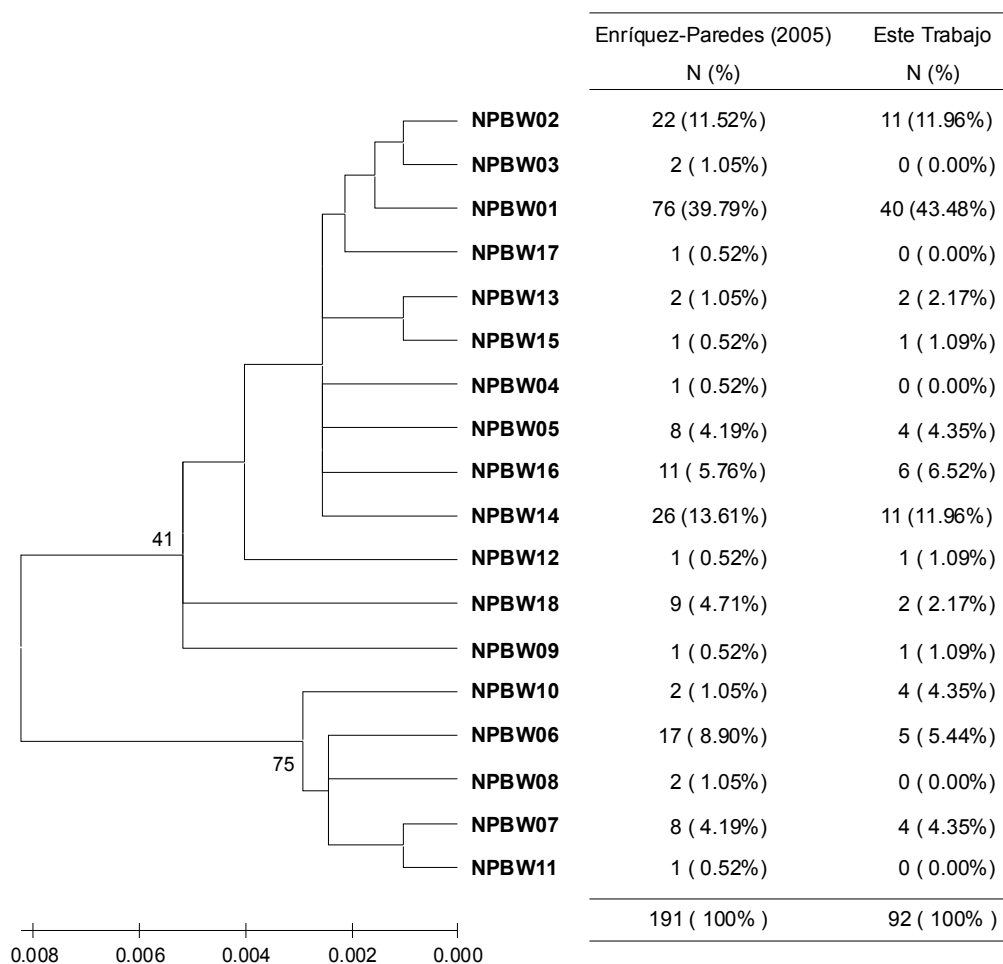
En la tabla que se muestra a continuación se indican los niveles de diversidad genética en términos del número de alelos (Na), la heterocigosidad observada (Ho) y el poder informativo (I) de cada microsatélite. Se señalan en negrillas los valores de heterocigosidad que resultaron significativamente distintos a los esperados bajo el equilibrio Hardy-Weinberg con base en los distintos programas empleados (MicroChecker, Arlequin, MsTools, GenAlex y KinInfor). Los renglones sombreados en gris señalan los microsatélites que fueron eliminados como parte del proceso de control de calidad.

Microsatélite	Polimorfismo	MICRO-CHECKER	ARLEQUIN	MSTOOLS	GenALEx	KININFOR
	Na	Ho	Ho	Ho	Ho	I
<i>DirFCB017</i>	3	0.40	0.39	0.39	0.39	15
<i>GT023</i>	6	0.63	0.65	0.65	0.65	9
<i>GATA028</i>	8	0.84	0.72	0.72	0.72	3
<i>Ev037</i>	7	0.76	0.72	0.72	0.72	6
<i>AC045</i>	2	0.43	0.37	0.37	0.37	14
<i>GATA053</i>	2	0.09	0.01	0.01	0.01	19
<i>CAAA074</i>	2	0.32	0.27	0.27	0.27	16
<i>AC082</i>	4	0.63	0.63	0.63	0.63	10
<i>AC087</i>	11	0.83	0.80	0.80	0.80	4
<i>GATA098</i>	8	0.75	0.71	0.71	0.71	7
<i>GT122</i>	3	0.52	0.39	0.39	0.39	12
<i>GT129</i>	4	0.43	0.38	0.38	0.38	13
<i>AC137</i>	9	0.62	0.63	0.63	0.63	11
<i>CA141</i>	4	0.29	0.17	0.17	0.17	17
<i>GT227</i>	2	0.15	0.08	0.08	0.08	18
<i>CA232</i>	7	0.76	0.79	0.79	0.79	5
<i>CA234</i>	13	0.40	0.89	0.89	0.89	2
<i>GATA417</i>	13	0.88	0.90	0.90	0.90	1
<i>GT541</i>	9	0.71	0.74	0.74	0.74	8

Apéndice 3

Árbol filogenético y frecuencias relativas de los linajes maternos de ballena azul en el Golfo de California.

En la figura inferior se ilustra la reconstrucción filogenética por mínima evolución usando la distancia genética de Tamura-Nei con corrección gamma ($\alpha=0.2084$), los linajes pertenecientes al clado I y al clado II, soportados por valores de remuestreo del 41% y 75%, respectivamente. El árbol filogenético y las frecuencias de los haplotipos mitocondriales de la primera columna corresponden a los reportados por Enríquez-Paredes (2005), mientras que en la segunda columna se indican las frecuencias para la muestra empleada en el presente estudio.



Apéndice 4

Coefficiente de parentesco y distancia genética mitocondrial de las parejas madre-cría conocidas incluidas en el presente estudio.

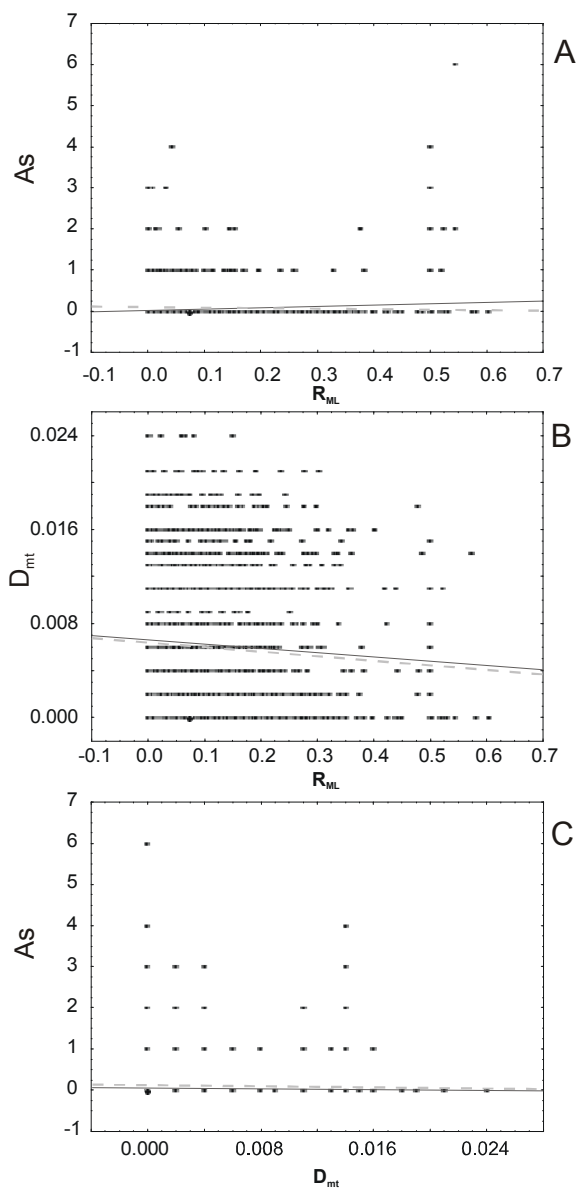
En la siguiente tabla se muestran los números de identificación individual del catálogo fotográfico del CICIMAR-IPN para las parejas madre-cría conocidas y reportadas en el presente estudio, el número de observaciones de cada pareja (asociaciones), los coeficientes de parentesco obtenidos con el programa ML (R_{ML}) y MER (R_{MER}), así como la distancia genética haplotípica. Se indican también el promedio y la desviación estándar (D.E.) de las estimaciones de parentesco.

Madre	Cría	Asociaciones	R_{ML}	R_{MER}	D_{mt}
Bm250 H01	Bm376 M01	2	0.544	0.552	0.000
Bm050 H06	Bm454 M06	6	0.544	0.510	0.000
Bm004 H01	Bm529 H01	2	0.523	0.578	0.000
Bm136 H01	Bm394 M01	1	0.520	0.529	0.000
Bm119 H02	Bm307 M02	2	0.500	0.482	0.000
Bm404 H05	Bm405 M05	1	0.500	0.479	0.000
Bm124 H02	Bm415 H02	3	0.500	0.499	0.000
Bm131 H01	Bm418 M01	3	0.500	0.433	0.000
Bm251 H14	Bm455 M14	4	0.500	0.483	0.000
Bm136 H01	Bm459 M01	2	0.500	0.395	0.000
Promedio			0.513	0.494	
D.E.			0.018	0.054	

Apéndice 5

Correlación entre las frecuencias de asociación, el parentesco y la distancia genética mitocondrial.

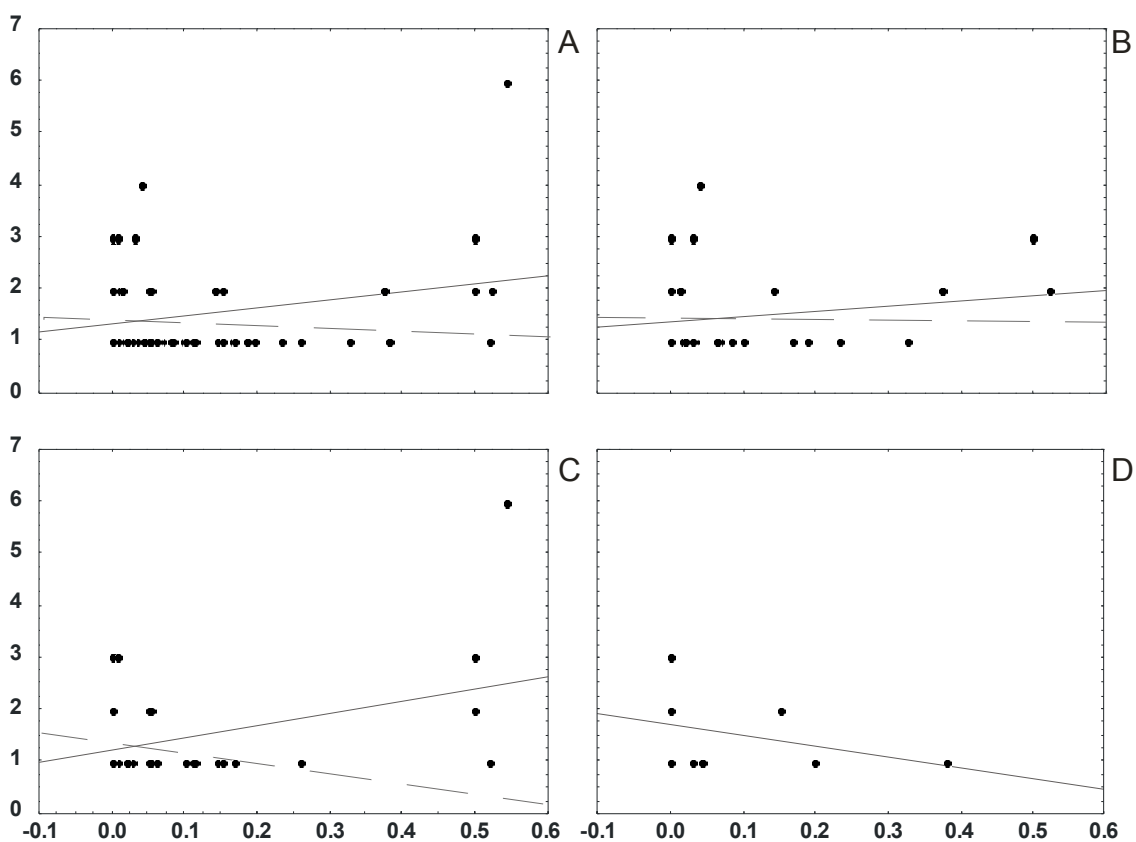
Correlación entre las matrices de parentesco-asociación (A), parentesco-divergencia haplotípica (B) y divergencia haplotípica-asociación. La nomenclatura de los ejes corresponde a los de la Tabla IV. La línea sólida indica el ajuste lineal incluyendo a las parejas hembra-cría, mientras que la línea punteada corresponde al ajuste excluyendo las parejas hembra-cría.



Apéndice 6

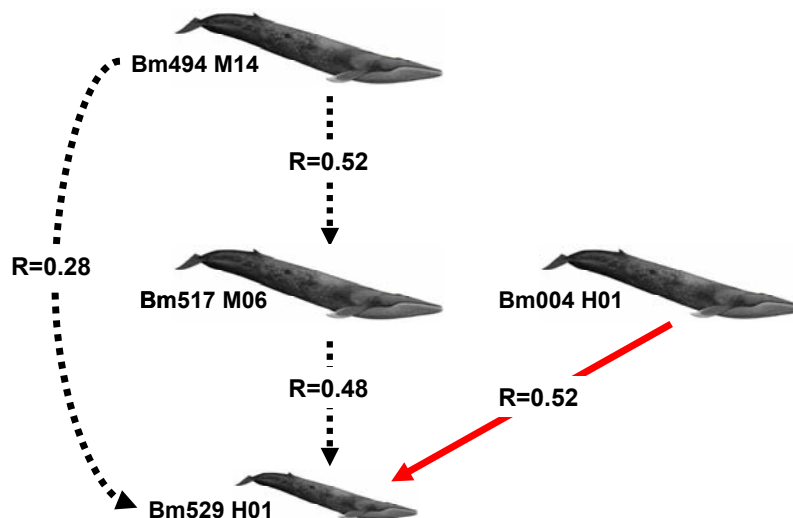
Correlación entre la frecuencia de asociación y el parentesco entre parejas con asociación directa.

En las figuras inferiores se muestran las correlaciones entre las matrices de parentesco y de asociación en las que se incluyeron exclusivamente aquellos individuos observados en asociación directa. A) Todas las parejas de ballenas azules con asociaciones directas, B) parejas hembra-hembra, C) parejas hembra-macho, D) parejas macho-macho. La línea sólida indica el ajuste lineal incluyendo a las parejas hembra-cría, mientras que la línea punteada corresponde al ajuste excluyendo las parejas hembra-cría.



Apéndice 7

Ejemplos puntuales de algunas de las relaciones de parentesco observadas en las ballenas azules que ocupan el Golfo de California.



En la figura superior se representan las relaciones de parentesco entre cuatro de las ballenas azules fotoidentificadas dentro del Golfo de California. El código de identificación individual corresponde al descrito en la Tabla II. La flecha sólida representa la asignación directa en el campo de los individuos como pareja madre-cría, mientras que las flechas punteadas representan las relaciones inferidas con base en las estimaciones de parentesco (valores sobre las líneas): parientes en primer grado (padres-hijos) y parientes de segundo o tercer orden, respectivamente.

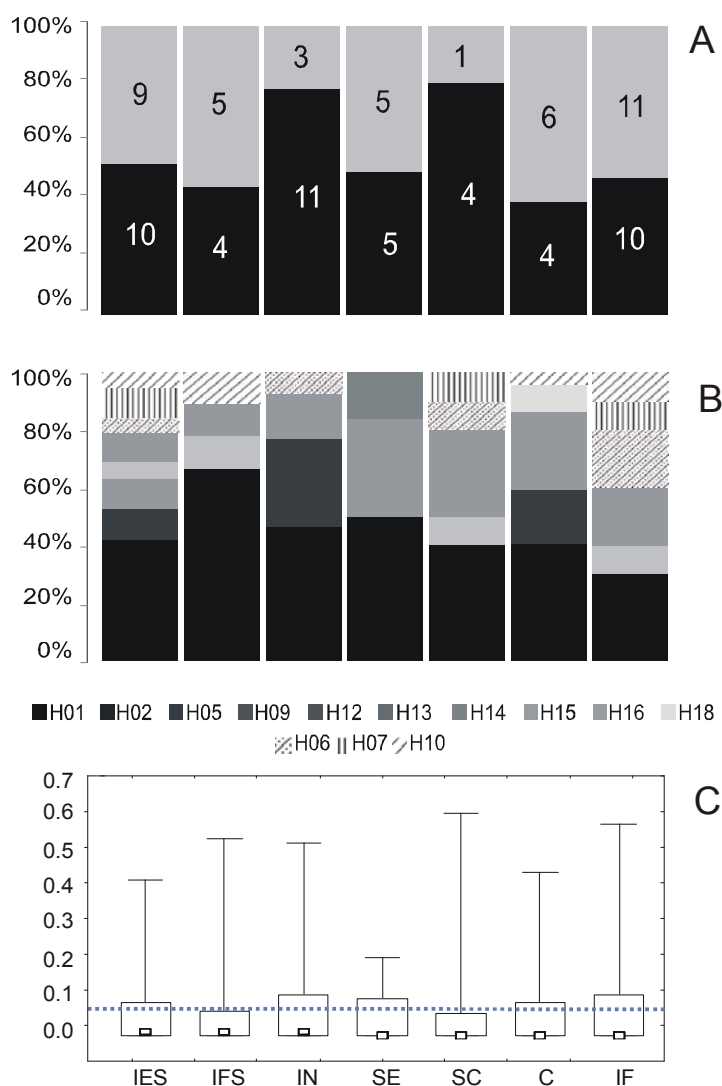
En particular, este ejemplo sugiere la presencia simultánea de tres generaciones y aporta evidencia sobre la ausencia de aislamiento reproductivo entre los dos clados mitocondriales. La ballena Bm529 se observó como cría junto a la hembra Bm004, tanto en las observaciones de campo como con los estimadores de parentesco se confirma la relación de primer orden entre ambas ($R=0.52$). Pese a que el macho Bm517 no se observó en asociación con ninguno de estos dos individuos, el coeficiente de parentesco con la cría Bm529 ($R=0.48$) podría indicar una relación filial entre ellas. Una cuarta ballena macho, Bm494, que tampoco fue observado en asociación directa con las otras, aparentemente es padre de la Bm517 ($R=0.52$) y por tanto abuelo de la Bm529 ($R=0.28$).

Resulta también interesante resaltar que el individuo Bm517 tiene haplotipo 06, perteneciente al clado mitocondrial II, mientras que su cría, Bm529 tiene el mismo haplotipo que su madre la Bm004 (haplotipo 01), lo que evidencia la presencia de reproducción entre los dos clados.

Apéndice 8

Proporción de sexos, haplotipos y parentesco promedio de las categorías de asociación.

En las figuras que se muestran a continuación se detallan: A) la proporción de sexos (las barras negras representan a las hembras, las grises a los machos y el dígito interior el número de individuos), B) la proporción de haplotipos (los colores sólidos representan a los haplotipos correspondientes al clado mitocondrial I y los colores texturizados a los haplotipos del clado II, ver Apéndice 3) y C) la comparación de los estadísticos descriptivos de las estimaciones de parentesco (la línea punteada en color azul claro señala el valor promedio de parentesco como referencia; se indica la mediana, los percentiles 25-75%, los valores mínimos y máximos). IES= Individuos Exclusivamente Solitarios, IFS= Individuos Frecuentemente Solitarios, IN= Individuos Núcleo, SE= Socios Exclusivos, SC= Socios compartidos, C= Crías e IF= Individuos Foráneos.



Apéndice 9

Grupos núcleo obtenidos mediante los algoritmos de Martínez-Serrano (2005).

En la siguiente tabla se enlistan los individuos que conforman cada uno de los grupos núcleos analizados. En negrillas se indican los individuos con muestra de ADN disponible para la amplificación de los microsatélites.

Individuo núcleo	Individuos asociados	Analizados / total
Bm001 H08	Bm012 M14 , Bm183, Bm234, Bm249 M14	2/4
Bm004 H01	Bm006, Bm035 H01 , Bm078 H02 , Bm127 H14 , Bm166 M16 , Bm240 M01 , Bm453, Bm470, Bm529 H01	6/9
Bm006 H01	Bm004 H01 , Bm005, Bm019, Bm020, Bm028, Bm035 H01 , Bm041 H01 , Bm065 H02 , Bm070, Bm078 H02	5/10
Bm012 M14	Bm001, Bm003, Bm007 M01 , Bm011, Bm013, Bm014, Bm047 H05 , Bm127 H14 , Bm136 H01 , Bm183, Bm234, Bm258, Bm303 H07 , Bm423 M01 , Bm431	6/15
Bm035 H01	Bm004 H01 , Bm006, Bm049, Bm078 H02 , Bm119 H02 , Bm129 H02 , Bm131 H01 , Bm132, Bm136 H01 , Bm137, Bm138, Bm140	6/12
Bm041 H01	Bm006, Bm028, Bm040, Bm078 H02 , Bm119 H02 , Bm124 H02 , Bm126, Bm127 H14 , Bm128	4/9
Bm049 H01	Bm035 H01 , Bm060 M01 , Bm129 H02 , Bm130, Bm132, Bm136 H01 , Bm137, Bm138, Bm140, Bm223, Bm247, Bm248	4/12
Bm050 H06	Bm051, Bm052, , Bm060 M01 , Bm065 H02 , Bm119 H02 , Bm131 H01 , Bm136 H01 , Bm146 H01 , Bm192, Bm251 H14 , Bm272, Bm321 M01 , Bm383, Bm412, Bm454 M06 , Bm455 M14 , Bm459 M01 , Bm460, Bm466	11/19
Bm060 M01	Bm049, Bm050 H06 , Bm051, Bm052, Bm061, Bm062, Bm063, Bm065 H02 , Bm130, Bm131 H01 , Bm146 H01 , Bm186, Bm240 M01 , Bm249 M14 , Bm376 M01 , Bm383, Bm421, Bm454 M06 , Bm462, Bm466	8/20
Bm065 H02	Bm006, Bm050 H06 , Bm060 M01 , Bm073, Bm074, Bm075 H14 , Bm076, Bm077, Bm124 H02 , Bm131 H01 , Bm174, Bm240 M01 , Bm251 H14 , Bm321 M01 , Bm421, Bm454 M06 , Bm455 M14 , Bm462, Bm527	10/19
Bm119 H02	Bm035 H01 , Bm038, Bm040, Bm041 H01 , Bm042, Bm050 H06 , Bm131 H01 , Bm232, Bm233, Bm307 M02 , Bm346 M09 , Bm524	6/12

Apéndice 9 (continuación)

Grupos núcleo obtenidos mediante los algoritmos de Martínez-Serrano (2005).

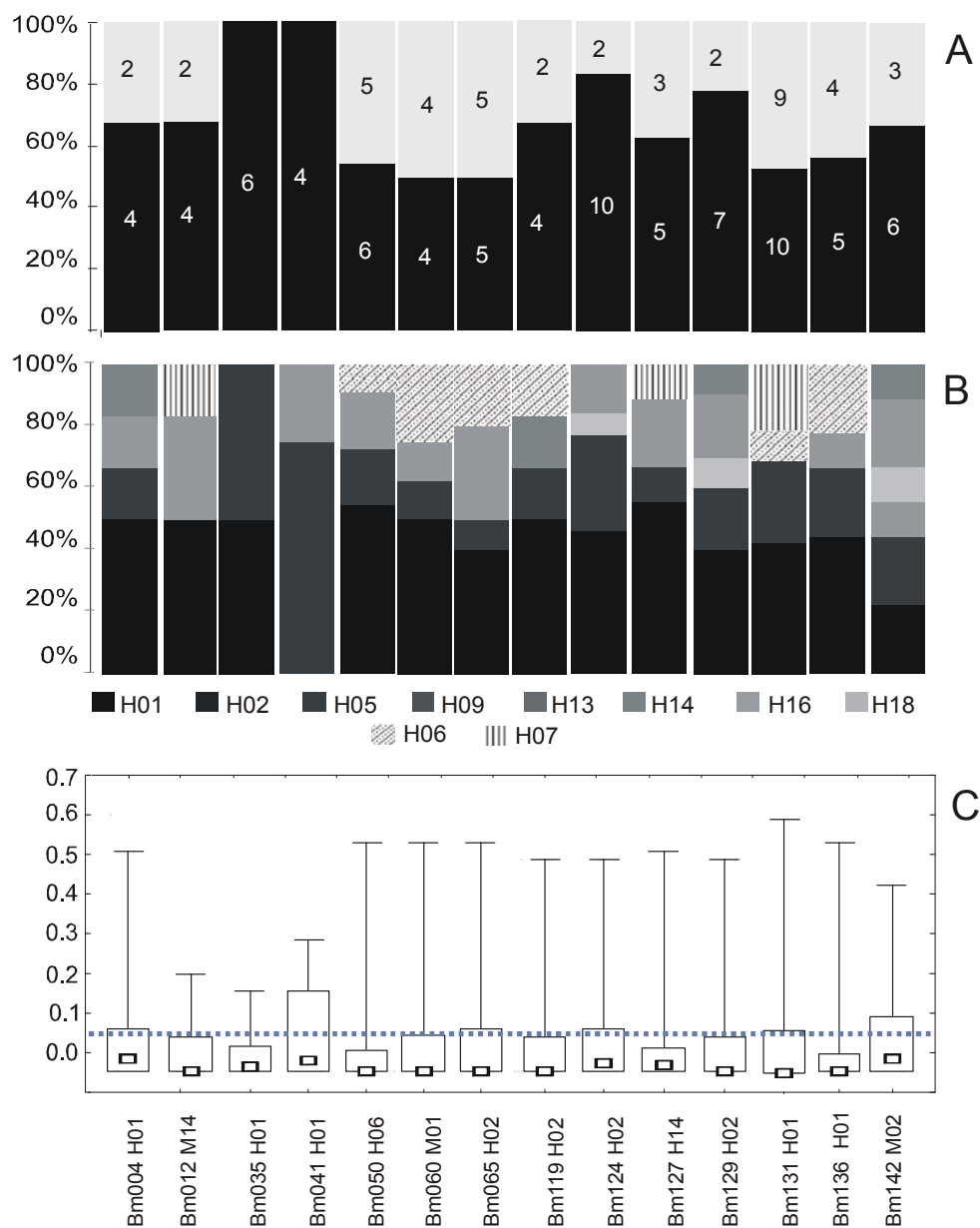
En la siguiente tabla se enlistan los individuos que conforman cada uno de los grupos núcleos analizados. En negrillas se indican los individuos con muestra de ADN disponible para la amplificación de los microsátelites.

Individuo núcleo	Individuos asociados	Analizados / total
Bm124 H02	Bm002, Bm022, Bm041 H01 , Bm065 H02 , Bm126, Bm127 H14 , Bm128, Bm129 H02 , Bm130, Bm131 H02 , Bm132, Bm133, Bm134, Bm136 H01 , Bm141 H13 , Bm142 M02 , Bm143, Bm144X14 , Bm145, Bm146 H01 , Bm185, Bm191, Bm192, Bm275, Bm306 H01 , Bm415 H02 , Bm423 M01 , Bm431	13/28
Bm127 H14	Bm004 H01 , Bm007 M01 , Bm012 M14 , Bm041 H01 , Bm124 H02 , Bm126, Bm128, Bm130, Bm131 H01 , Bm134, Bm240 M01 , Bm303 H07 , Bm331, Bm453, Bm470	8/15
Bm129 H02	Bm022, Bm035 H01 , Bm049, Bm075 H14 , Bm124 H02 , Bm128, Bm131 H01 , Bm132, Bm136 H01 , Bm137, Bm138, Bm140 Bm141 H13 , Bm142 M02 , Bm143, Bm144 X14 , Bm145, Bm146 H01 , Bm166 M16 , Bm185, Bm191, Bm267	10/22
Bm131 H02	Bm035 H01 , Bm050 H06 , Bm060 M01 , Bm065 H02 , Bm099 H01 , Bm119 H02 , Bm124 H02 , Bm126, Bm127 H14 , Bm128, Bm129 H02 , Bm130, Bm132, Bm133, Bm134, Bm142 M02 , Bm146 H01 , Bm176, Bm240 M01 , Bm249 M14 , Bm251 H14 , Bm267, Bm316, Bm321 M01 , Bm362, Bm376 M01 , Bm383, Bm418 M01 , Bm454 M06 , Bm455 M14 , Bm462, Bm466	19/32
Bm136 H01	Bm012 M14 , Bm035 H01 , Bm049, Bm050 H06 , Bm124 H02 , Bm129 H02 , Bm132, Bm137, Bm138, Bm140, Bm146 H01 , Bm185, Bm191, Bm192, Bm394 M01 , Bm454 M06 , Bm459 M01 , Bm460	9/18
Bm142 M02	Bm022, Bm124 H02 , Bm129 H02 , Bm131 H01 , Bm141 H13 , Bm143, Bm144 X14 , Bm145, Bm146 H01 , Bm165 H05 , Bm166 M16 , Bm249 M14	9/12
Bm184 H18	Bm088, Bm181 H01 , Bm182, Bm185, Bm194, Bm224, Bm225, Bm300 H18 , Bm301, Bm321 M01 , Bm383, Bm384, Bm456 X01	4/13
Bm192 H14	Bm050 H06 , Bm124 H02 , Bm136 H01 , Bm146 H01 , Bm191, Bm272, Bm297, Bm321 M01 , Bm454 M06 , Bm459 M01 , Bm460	7/11
Bm240 M01	Bm004 H01 , Bm060 M01 , Bm065 H02 , Bm127 H14 , Bm131 H01 , Bm239, Bm376 M01 , Bm418 M01 , Bm421, Bm453, Bm462, Bm470	8/12

Apéndice 10

Proporción de sexos, haplotipos y parentesco promedio de los grupos núcleo.

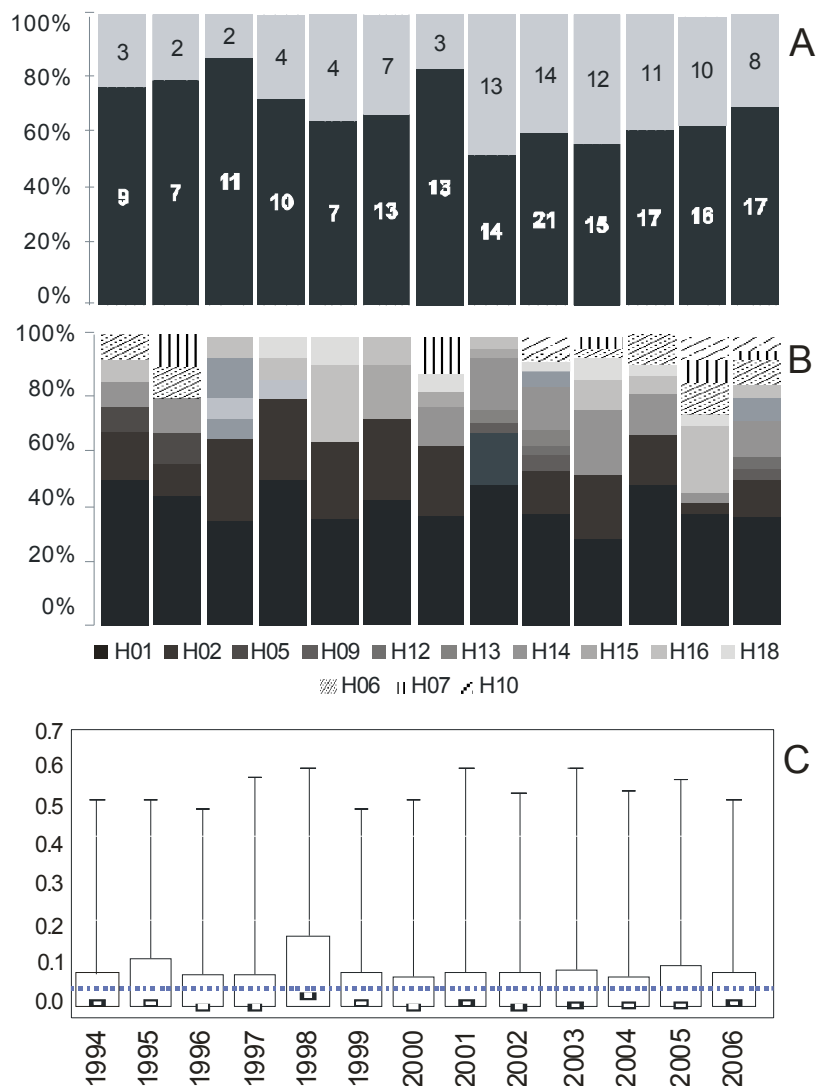
En las figuras que se muestran a continuación se detallan: A) la proporción de sexos, B) la proporción de haplotipos y C) la comparación de los estadísticos descriptivos de las estimaciones de parentesco. Los detalles de cada gráfica corresponden a los que se indican en el Apéndice 8. Los códigos al pie de la gráfica inferior corresponden a los identificadores individuales para el individuo núcleo de cada uno de los grupos.



Apéndice 11

Proporción de sexos, haplotipos y parentesco promedio de los años analizados.

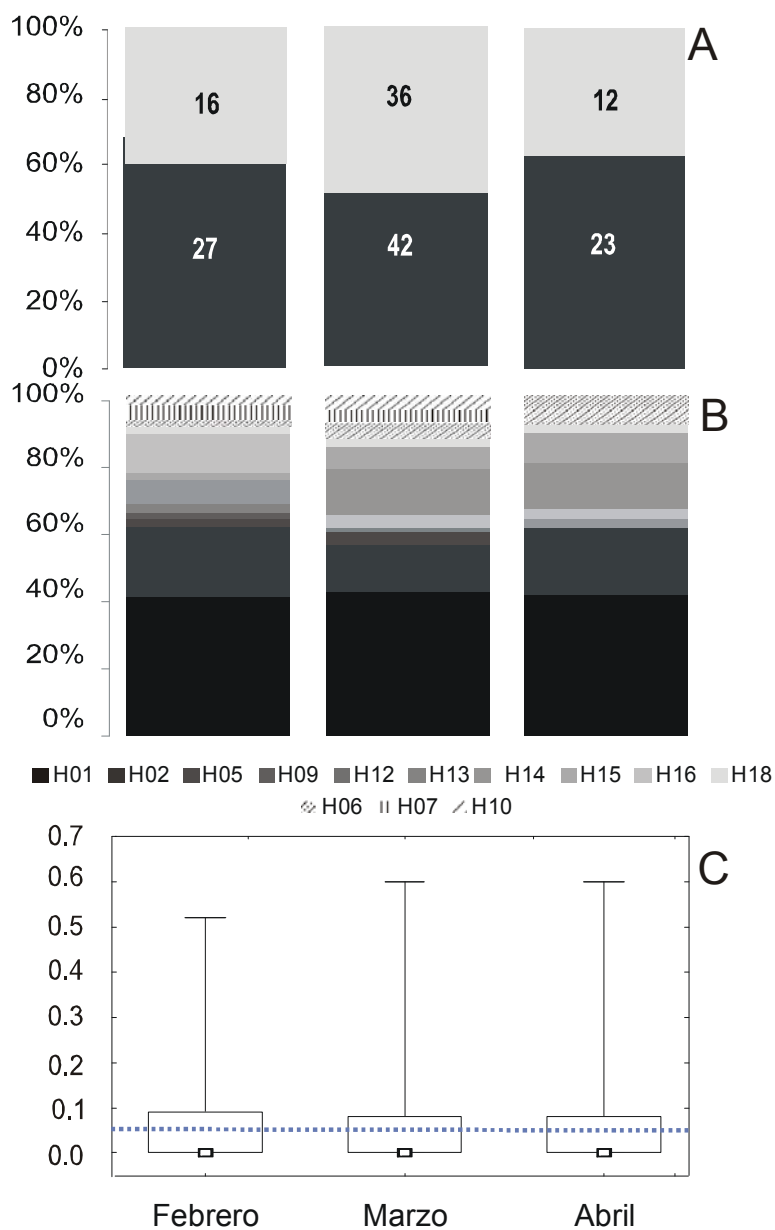
En las figuras que se muestran a continuación se detallan: A) la proporción de sexos, B) la proporción de haplotipos y C) la comparación de los estadísticos descriptivos de las estimaciones de parentesco. Los detalles de cada gráfica corresponden a los que se indican en el Apéndice 8. Los códigos al pie de la gráfica inferior corresponden a las temporadas de muestreo.



Apéndice 12

Proporción de sexos, haplotipos y parentesco promedio de los meses analizados.

En las figuras que se muestran a continuación se detallan: A) la proporción de sexos, B) la proporción de haplotipos y C) la comparación de los estadísticos descriptivos de las estimaciones de parentesco. Los detalles de cada gráfica corresponden a los que se indican en el Apéndice 8. Los códigos al pie de la gráfica inferior corresponden a los meses.



Apéndice 13

Proporción de sexos y parentesco promedio de los clados mitocondriales donde se agrupan los 92 individuos analizados.

En las figuras que se muestran a continuación se detallan: A) la proporción de sexos y B) la comparación de los estadísticos descriptivos de las estimaciones de parentesco. Los detalles de cada gráfica corresponden a los que se indican en el Apéndice 8. Los códigos al pie de la gráfica inferior corresponden a los clados mitocondriales descritos en el Apéndice 3.

