

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**IDENTIDAD GENÉTICA DE LAS AGREGACIONES DE
CACHALOTE (*Physeter macrocephalus*) EN EL GOLFO DE
CALIFORNIA: TEMPORALIDAD Y USO DE HÁBITAT**

TESIS

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

MICHELLE PAULINA VALDES ARELLANES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA MÉXICO DICIEMBRE 2011

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

IDENTIDAD GENÉTICA DE LAS AGREGACIONES DE CACHALOTE

(*Physeter macrocephalus*) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA:

TEMPORALIDAD Y USO DE HÁBITAT

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS

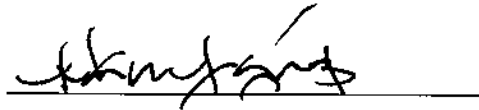
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

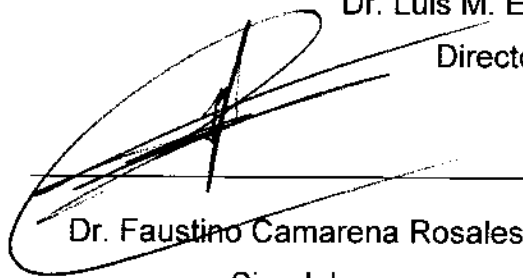
MICHELLE PAULINA VALDES ARELLANES

Aprobada por:

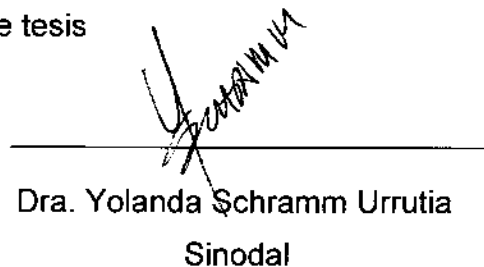


Dr. Luis M. Enríquez Paredes

Director de tesis



Dr. Faustino Camarena Rosales
Sinodal



Dra. Yolanda Schramm Urrutia
Sinodal

Resumen

Los cachalotes ocurren en números considerables a lo largo de todo el año en el Golfo de California (GC), razón por la que se le reconoce como uno de los sitios de alimentación y crianza de mayor importancia para la especie en el Océano Pacífico. Los cachalotes muestran una estructura social compleja, caracterizada por la formación de grupos muy estables. Aunque se reconocen varias subpoblaciones, asociadas a las principales cuencas oceánicas y a los márgenes ecuatoriales, se desconoce la magnitud con la que los movimientos latitudinales y longitudinales influyen en la dinámica de los genes de esta especie. Recientemente se ha sugerido que los clanes vocales (agregaciones con el mismo dialecto) juegan un papel sumamente importante en la estructuración de las poblaciones de cachalote. Dado que existen evidencias de que más de un clan vocal utiliza el GC, el objetivo del presente estudio fue conocer la identidad genética de los individuos que usan el GC a una escala interanual y contrastarla con las de otras agregaciones del Pacífico Norte. Con lo anterior se busca determinar si existe uno o varios grupos genéticos, la conectividad entre ellos y su posible relación con la presencia de distintos clanes acústicos en la zona. Se analizaron muestras de piel descamada y biopsias, recolectadas entre 1998-2008, para un total de 104 individuos. Para cada muestra: a) se identificó el sexo mediante PCR usando cebadores específicos de los cromosomas sexuales; b) se amplificó y secuenció un fragmento de 399 pb de la región control mitocondrial para identificar los linajes maternos; y c) se amplificaron y analizaron 6 loci microsatélites para determinar los genotipos. Se encontraron 11 haplotipos maternos y una proporción de sexos de 4♀:1♂, similar a la que exhiben otras agregaciones de zonas templado-tropicales. A nivel del ADN mitocondria, la diversidad génica y nucleotídica resultaron muy similares a las reportadas para el Océano Pacífico en estudios anteriores. La distribución de la variabilidad genética mitocondrial resultó significativamente distinta en la escala interanual dentro del GC, así como también a una escala espacial en la que se analizaron otras regiones del Pacífico. Pese a que los microsatélites exhibieron niveles altos de diversidad, similares a los reportados en otras agregaciones de la especie, no se encontró evidencia de estructura genética nuclear dentro del Océano Pacífico. El análisis de estructura poblacional entre diferentes regiones del Pacífico, incluyendo ahora al GC, indican una mayor similitud del GC con otras regiones del Pacífico Norte que con la zona de las Galápagos, contrastando con las evidencias de conectividad obtenidas mediante foto recapturas. Esto podría ser reflejo de que agregaciones de cachalotes de diferentes zonas del Pacífico, incluyendo Galápagos, están usando el GC en diferentes años. Aparentemente, el GC es usado por cachalotes de diferentes linajes en diferentes momentos, lo que representaría que un 70% de los haplotipos reportados para el Pacífico visitan el área, reafirmando la importancia de la zona para la conservación de la especie.

Abstract

Sperm whales occur in large numbers throughout the year in the Gulf of California (GC) and it has been recognized as one of the most important feeding and nursing areas for the species in the Pacific Ocean. Sperm whales exhibit a complex social structure, characterized by the formation of highly stable groups. Although it appears that sperm whales are structured in several subpopulations, associated with major ocean basins and equatorial margins, it is unclear to which extent do latitudinal and longitudinal movements influence gene flow in this species. It has been recently suggested that sperm whale vocal clans (aggregations with the same dialect) play a very important role on their populations structuring. Since there is evidence that more than one vocal clan uses the GC, the objective of this study was to determine the genetic identity of individuals using the area and the relationships with those of other North Pacific aggregations. In this way, it can be tested if there is one or more genetic groups using the GC, as well as their genetic connectivity with other areas from the North Pacific. Sloughed and biopsied skin samples from 104 individuals, which were collected from 1998 to 2008, were analyzed. For each sample: a) gender was identified by PCR using primers specific to X-Y chromosomes, b) a 399 bp fragment of the mitochondrial control region was amplified and sequenced to identify maternal lineages, and c) multilocus genotype were obtained from 6 microsatellite loci. The sex ratio skewed to females (4 ♀: 1 ♂), as in other tropical-temperate aggregation areas, and 11 maternal haplotypes were found. At the mitochondrial DNA level, gene and nucleotide diversity were very similar to those previously reported for the Pacific Ocean, but the distribution of genetic variability was significantly different among years within the GC, as well as among geographic areas within the Pacific. In contrast, for nuclear DNA, microsatellites exhibited diversity levels similar to those reported in other aggregations of the species, but there was no evidence of genetic structuring for the Pacific. The analysis of population structure among different regions of the Pacific, now including the GC, suggest greater similarity of the latter with other regions of the North Pacific than to Galapagos, thus contrasting with the evidence obtained by photoidentification. One possible explanation to these results is that sperm whale aggregations from different areas of the Pacific Ocean, use the GC in different years. Apparently, the GC is used by different maternal lineages of sperm whales in different periods, together representing about 70% of sperm haplotypes reported for the Pacific and thus highlighting the importance of the area for conservation of the species.

Agradecimientos

Con mucho cariño, respeto y sobre todo mucha admiración, quiero expresar mi infinito agradecimiento a mi papá académico (Luis M. Enríquez Paredes), por permitirme ser parte de los proyectos de cetáceos, gracias por adentrarme en el difícil pero fascinante mundo de la ecología molecular es una experiencia única y no pude tener mejor mentor que tu; Gracias por tus atinados consejos y llamadas de atención que me hicieron crecer y ser mejor estudiante, pero sobre todo gracias por la confianza que depositaste en mí para que aquel proyecto que una vez planteamos resultara en este trabajo. Millones de gracias por todo el apoyo brindado!!!!

Al Dr. Faustino Camarena por fungir como sinodal, y también como tutor muchas gracias por tomarse el tiempo en las revisiones, por estar al pendiente de los avances del trabajo y por esa gran personalidad que siempre me inyecta ánimo para continuar, aunque a veces veía el final demasiado lejano.

Muchas gracias Dra. Yolanda Schramm (Yoli), tengo mucho que agradecerle para empezar que directa o indirectamente tuviste mucho que ver en que yo estuviera en Ensenada, ya que me contagiaste con tu ánimo, gracias por aceptar ser mi sinodal a pesar de tus múltiples ocupaciones y por los atinados consejos en las revisiones

Gracias a la Dra. Diane Gendron por permitirme ser parte del proyecto de Cachalote, por permitirme trabajar con las muestras colectadas y los datos recabados a través de años. A la M. C. Fabiola Guerrero de la Rosa, Gracias a todos los miembros del Laboratorio de Mamíferos marinos del CICIMAR que entre salidas de campo y análisis de datos contribuyeron, con todo tipo de información.

Quiero agradecer a la Dra. Raquel Muñiz por haberme permitido hacer uso del termociclador de su laboratorio, cuando en el Laboratorio de Ecología Molecular fallaba el nuestro.

Muchas gracias a mi compañera M. en C, Sandra Moreno por el apoyo brindado en el laboratorio y en toda la logística del análisis de resultados, pero sobre todo gracias por los ánimos cuando sentía que ya no podía con el trabajo, compartimos mucho en el mundo de la biología molecular, pero en especial nuestra pasión por los cachalotes.... ¡¡¡¡Vivan los cachalotes!!!!

A mi generación de maestría por los ánimos a seguir adelante, los grupos de trabajo y de apoyo moral, pero sobre todo por su amistad. En especial a Adriana Romero y Cynthia Montoya por brindarme su amistad, escucharme y darme excelentes consejos cuando el trabajo parecía nunca acabar.

Quiero agradecer a mis hermanitos de Laboratorio: Miki, Karlita, Nelva, Sandy, Cristina, Ricardo, Santiago, René y Ana. Gracias por todos los momentos que compartieron conmigo, que aunque el 90% fueron solo trabajo, hicieron que este fuera ameno y bastante agradable.

Quiero agradecer a mi familia, que siempre me dio ánimo para continuar y que a pesar de la distancia, siempre estuvieron apoyándome, tanto moral como económicamente, cuando mi beca se acabo. Mil gracias!!!

Por último quiero agradecer a todos los que indirectamente ayudaron a terminar este trabajo, pues estuvieron presentes, con palabras de aliento y siempre dispuestos a escuchar cuando sentía que no podía más.... pero sobre todo gracias por brindarme su amistad, Emile, Viola, Daniel (Marciano), Alex, Fátima, Hugo, Martha, Stauros, Caroline, Lilia, Leonardo, chicos de Niño Van, Nico.....

Finalmente tengo que agradecer a CONACYT por la beca 217546, ya que financió mi estancia en la ciudad de Ensenada para la realización del presente trabajo.

La vida es breve, la ciencia extensa.....

Hipócrates.

ÍNDICE

RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	6
3.- OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo general.....	15
3.2.-Objetivos particulares.....	15
4.-HIPOTESIS.....	16
5.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1. Área de estudio.....	17
5.2. Métodos.....	20
5.3.-Extracción de ADN.....	21
5.4. Amplificación por PCR.....	22
5.4.1. Identificación molecular del sexo.....	22
5.4.2.-Diversidad haplotípica del ADN mitocondrial.....	22
5.4.3.-Microsatélites.....	24
5.5. Análisis de datos.....	28
5.5.1-Proporción de sexos.....	28
5.5.2. Asignación de haplotipos maternos ADN mitocondrial.....	28
5.5.3 Filogénia intraespecífica: ADNmt.....	29
5.5.4-Diversidad y estructura genética ADNmt.....	30

5.5.5 -Asignación del genotipo multilocus: Microsatélites.....	31
5.5.6. Diversidad y estructura genética: microsatélites.....	32
5.5.7. Comparación con otras agregaciones del Pacífico norte: Microsatélites.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1. Proporción de sexos.....	35
6.2. ADN mitocondrial.....	35
6.2.1- Diversidad genética.....	35
6.2.2. Estructura genética.....	39
6.2.3. Filogénia intraespecífica.....	44
6.3. Microsatélites.....	45
6.3.1. Diversidad genética.....	45
6.3.2 Estructura genética.....	50
7.- DISCUSIÓN.....	53
7.1.- Aspectos metodológicos.....	53
7.2.- Proporción de sexos.....	56
7.3.- Diversidad e identidad genética.....	58
7.4.-Estructura genética a nivel mitocondrial.....	61
7.5.- Estructura genética a nivel nuclear.....	63
7.6.-Concideraciones finales.....	64
8.- CONCLUSIONES.....	68
9.- LITERATURA CITADA.....	70
Apéndice.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Número de muestras de cachalote (<i>Physeter macrocephalus</i>) recolectadas en el Golfo de California y que fueron empleadas en el presente estudio.....	20
Tabla II. Características generales de los microsatélites que fueron evaluados en los cachalotes del Golfo de California para el presente trabajo.....	24
Tabla III. Condiciones que se emplearon para amplificación de los microsatélites. Los perfiles de temperatura se describen a detalle en el Apéndice 2.....	27
Tabla IV. Haplotipos maternos registrados en las agregaciones de cachalote del Golfo de California entre 1998 y 2008.	37
Tabla V. Diversidad genética de las agregaciones de cachalote en el Golfo de California.	37
Tabla VI. Coeficientes de diferenciación genética entre las agregaciones de cachalote del Golfo de California y las diferentes agregaciones del Pacífico reportadas por Lyrholm y Gyllesten (1998).....	39
Tabla VII. Coeficientes de diferenciación genética entre las agregaciones interanuales de cachalote en el Golfo de California y las diferentes	

agregaciones del Pacífico reportadas por Lyrholm y Gyllesten (1998).....	41
Tabla VIII. Coeficientes de diferenciación genética entre las agregaciones de cachalote del Golfo de California y las diferentes agregaciones del Pacífico reportadas por Mesnick y colaboradores (2011).	42
Tabla IX. Coeficientes de diferenciación genética, de las variaciones interanuales, Mesnick <i>et al.</i> , 2011.....	43
Tabla X. Estadísticas descriptivas correspondientes al análisis de control de calidad del genotipado realizado con el programa MICRO-CHEKER.....	47
Tabla XI. Poder informativo y probabilidad de identidad para cada uno de los microsatélites empleados.....	48
Tabla XII.- Diversidad genética nuclear para cada microsatélite.....	48
Tabla XIII.- Diversidad génica nuclear de las agregaciones de cachalote del Golfo de California.....	49
Tabla XIV. Coeficientes de diferenciación genética que resultaron de la comparación con las diferentes agregaciones del Océano Pacífico reportadas por Mesnick y colaboradores (2011).....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Localización del Golfo de California.....	18
Figura 2.- Zonas donde fueron colectadas las muestras de cachalote en diferentes estudios realizados en el océano Pacífico.....	19
Figura 3. Principales dominios de la región control del ADNmt en mamíferos.....	23
Figura 4. Similitud genética entre algunas agregaciones de cachalote en el Pacífico.....	40
Figura 5. Similitud genética interanual entre algunas agregaciones de cachalote en el Pacífico (Lyrholm y Gyllesten, 1998).....	41
Figura 6. Similitud entre las agregaciones del Golfo de California (GC) y las agregaciones de cachalote del Pacífico reportadas por Mesnick <i>et al.</i> (2011).....	43
Figura 7. Similitud interanual entre algunas agregaciones de cachalote en el Pacífico Mesnick <i>et al.</i> , (2011).....	44
Figura 8. Red de la mínima expansión para los haplotipos mitocondriales de cachalote a nivel mundial.....	45

Figura 9. Análisis multidimensional de componentes principales (ACP) basado en las estimaciones de distancia genética de los genotipos individuales.....54

1. INTRODUCCIÓN

El cachalote (*Physeter macrocephalus*), al ser el odontoceto de mayor tamaño, fue una de las especies de mayor importancia económica para la industria ballenera (Estes 2006, Whitehead 2003^a). Se estima que a principios del siglo XVIII, la población mundial de la especie podría haber sumado cerca de 1,100,000 individuos (Whitehead 2002). Durante el siglo XIX se capturaron entre 184,000 y 236,000 organismos, mientras que entre los años 1946 y 1980 al menos 770,000 cachalotes fueron cazados (Davis *et al.* 1997, Altherr *et al.* 2005).

Ya que la intensa captura comercial redujo significativamente sus poblaciones, la CBI (Comisión Ballenera Internacional) prohibió la captura del cachalote y desde 1985 están protegidos en todo el mundo (Taylor *et al.* 2008). Aunque actualmente se desconocen los niveles de abundancia global de la especie, se ha estimado en el orden de los cientos de miles; este remanente se considera lo suficientemente grande para ubicarla en una categoría de conservación “vulnerable” y no “en peligro de extinción” (Whitehead 2003^a, Taylor *et al.* 2008). Debido a que la recuperación de una población severamente explotada es un proceso lento (Whitehead 2003), cuya evaluación a través de estudios demográficos puede hacerse solo a largo plazo, la información sobre sus niveles de variabilidad genética permiten explorar su

historia demográfica, además de la comparación directa con otras poblaciones con diferentes niveles de salud genética (Gordon 1987).

Obtener este tipo de datos genéticos ha resultado particularmente difícil en el cachalote debido a su distribución cosmopolita, su segregación espacial por sexos y edades, así como por el escaso conocimiento que se tiene sobre su dispersión y su reproducción (Gordon 1987, Withehead y Weilgart 2000 ,Whitehead *et al.* 2000, Stevick *et al.* 2002). Adicionalmente, los cachalotes presentan una compleja estructura social, prolongados tiempos de buceo y por lo general se les encuentra en zonas remotas con aguas profundas; razón por la que, aún con el uso de marcas satelitales, ha sido complicado llevar a cabo estudios más detallados sobre sus hábitos y su biología (Whitehead y Kahn, 1992, Richard *et al.* 1996b, Christal *et al.* 1998, Mesnick *et al.* 1999, Whitehead y Weilgart 2000, Lettevall *et al.* 2002, Whitehead y Mesnick 2003).

Pese a las dificultades antes mencionadas, existen diversos estudios a nivel mundial orientados a comprender la ecología de esta especie; entre ellos cabe resaltar los estudios de fotoidentificación (Jaquet *et al.* 2003, Guerrero de la Rosa 2006), identificación de los clanes a través de sus vocalizaciones (Álvarez-Torres 2006) y la determinación de los niveles tróficos mediante el uso de isótopos estables (Guerrero de la Rosa 2008).

De igual forma, se han empleado marcadores genéticos moleculares para el estudio de la diversidad y la estructura poblacional de la especie (Dillon 1996, Lyrholm y Gyllensten 1998, Bond 1999). Sin embargo, con excepción de algunas zonas de agregación de la especie, estudios realizados en diferentes regiones alrededor del mundo han detectado poca o ninguna diferenciación genética entre sus poblaciones, tanto dentro como entre las cuencas oceánicas (Lyrholm *et al.* 1999; Mesnick *et al.* 1999, 2001, 2003, 2010; Engelhaupt 2004). Esta baja diferenciación genética puede deberse a la baja diversidad genética intrínseca a la especie, la dispersión marcadamente sesgada hacia los machos, al reducido tamaño de muestra, o bien a la combinación de todos estos factores (Engelhaupt 2009, Mesnick *et al.* 2011).

Pese a que los marcadores genéticos moleculares han mostrado a ser una herramienta útil que nos ayudan a comprender la dinámica poblacional de diversas especies (Sunnucks 2000), la escasa información sobre los límites entre las poblaciones o stocks de cachalote, ha llevado a considerar que la especie carece de una marcada estructura genética (Lyrholm y Gyllensten 1998, Mesnick *et al.* 2003). Lo anterior contrasta con el hecho de que se han reportado diferentes zonas de agregación alrededor del mundo en las que los cachalotes permanecen por periodos relativamente largos, tales como las del Atlántico Norte, el Golfo de México, el Mar Mediterráneo, las Islas Galápagos, el

Pacífico Norte y el Golfo de California (Gendron 2002, Letevall 2002, Drout *et al.* 2004, Engelhaupt *et al.* 2009).

De entre estas zonas de agregación, el Golfo de California destaca por la presencia de cachalotes a lo largo de todo el año, siendo relativamente más abundantes que en otras zonas y por la común presencia de crías en los grupos (Gendron 2000, Jaquet y Gendron 2002, Jaquet *et al.* 2003, Zavala-Hernández *et al.* 2004, Guerrero de la Rosa 2006, Guerrero de la Rosa 2008, Álvarez-Torres 2006). Además, existen evidencias de distintos grupos de cachalotes utilizando diferencialmente esta zona y un importante flujo de individuos hacia el Golfo de California y desde ahí hacia las Islas Galápagos, que es otra de las zonas de agregación de mayor importancia en el Pacífico (Jaquet *et al.* 2003, Mesnick *et al.* 2008,). Todas estas características, hacen del Golfo de California un sitio idóneo para el estudio de diversos aspectos de la biología del cachalote.

A pesar de la gran cantidad de información sobre la abundancia, movimientos y hábitos alimentarios de la especie en el Golfo de California, la relación genética que guardan específicamente estas agregaciones con las de otras zonas del Pacífico no han sido estudiadas a detalle. Es por ello que el presente estudio se planteó con la finalidad de conocer la identidad genética de los cachalotes que usan el Golfo de California a través del uso de marcadores

genéticos moleculares con diferente naturaleza y nivel de resolución: ADN mitocondrial y microsatélites (ADN nuclear). De esta forma, se busca comparar esta zona de agregación con otras de las que se han estudiando en el océano Pacífico y establecer así el nivel de conectividad o diferenciación genética entre ellas.

2. ANTECEDENTES

El GC es un mar marginal subtropical con altos niveles de productividad primaria y muy dinámico, características que le permiten soportar una gran diversidad de especies marinas (Álvarez-Borrego *et al.* 1991, Álvarez Borrego 2002). Estudios previos ha demostrado que esta es un área crítica para la conservación de varias especies de grandes cetáceos (Bérube *et al.* 2002, Jaquet y Gendron 2002, Enríquez-Paredes 2005).

El cachalote es una de las especies de cetáceos más abundantes dentro del GC; su población fue estimada en más de 1000 individuos (Gendron 2000). Se le puede encontrar durante todo el año en la zona, en donde su distribución, movimientos y comportamiento aparentemente varían en función de los cambios en la abundancia del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) que es su principal alimento y el cual también es muy abundante en el GC (Jaquet y Gendron 2002).

A través del registro de avistamientos, detecciones acústicas y estudios de fotoidentificación dentro del GC, se ha sugerido la existencia histórica de super-agregaciones de cachalote en al menos en cinco áreas específicas: Isla

San Pedro Mártir, la depresión de Guaymas, la depresión de Farallón, la depresión del Carmen e Isla Tortuga (Jaquet *et al.* 2002, Rubio-Ciseneros *et al.* 2006, Guerrero de la Rosa 2008). Dadas las características de su relieve submarino (más de 200 mts de profundidad), el bajo alivio de agua y su elevada productividad biológica, todas estas áreas se consideran de importancia biológica para la especie. Esta importancia se ha evidenciado por una fuerte fidelidad interanual al GC de ciertos organismos, usando una o varias de estas regiones a lo largo del año o en distintos años (Ruvalcaba 2010).

Así mismo, el GC, es una región ideal para el estudio de la distribución de los cachalotes en relación tanto con las principales características del medio ambiente y la distribución de calamar gigante, sugiriendo que los cachalotes cambian su distribución en respuesta a la disminución del calamar gigante, pero no dejan el GC (Jaquet *et al.* 2002).

Existe evidencia que sugiere que varios grupos de cachalotes hacen uso del GC. (Zavala-Hernández *et al.* 2004, Guerrero de la Rosa 2006) y por las recapturas encontradas con cachalotes de Galápagos, se infiere que existe un movimiento constante de grupos de cachalote entre las Islas Galápagos y el Golfo de California (Jaquet *et al.* 2003).

Estudios recientes sobre el nivel trófico que ocupan los cachalotes dentro del GC, han mostrado una variación isotópica interanual que difiere en machos adultos y los grupos de hembras-machos inmaduros.(Ruiz-Cooley *et al.* 2004). Por otro lado, se ha observado que esta señal isotópica también presenta variaciones entre los grupos sociales que se han estudiado en el GC (Guerrero de la Rosa 2008). Ambos estudios reflejan claramente que la estructura social influye de manera importante en la dieta de esta especie y por ende en el uso que los grupos o individuos le dan a la zona.

En lo que a bioacústica se refiere, un estudio realizado a través del análisis de codas¹, reflejo que al menos tres clanes de cachalote frecuentan el GC en primavera y otoño, por lo que es probable que las agregaciones del GC estén diferenciadas en clanes vocales al igual que la población del Pacífico sur (Álvarez-Torres 2006).

Por otra parte a través de la identificación molecular del sexo se ha evidenciado que la proporción de machos con respecto a las hembras es de 1:4

¹ Las codas son repertorios de sonidos que emiten los cachalotes en forma de secuencias cortas y estereotipadas de 3 a 40 clicks de banda ancha que normalmente duran hasta tres segundos. Se ha inferido que estas codas tienen una función de comunicación entre los grupos de cachalotes. Las codas presentan variaciones entre distintas regiones geográficas, por lo que se les puede considerar como un dialecto (Watkins y Schevill 1977, Whitehead 2003)

(Rubio-Ciseneros *et al.* 2006). Diferentes super-agregaciones², algunas de las cuales contienen tanto hembras como machos adultos, observadas principalmente en cuatro zonas del GC (San Pedro Mártir, Guaymas, el Carmen y Farallón) confirman que este es un hábitat importante para los cachalotes de ambos sexos (Jaquet y Gendron 2002). Sin embargo, aunque es uno de los sitios de agregación del cachalote más estudiados, hasta el momento no existe información sobre la identidad genética de los individuos que usan el golfo.

El poder de los marcadores genéticos en el estudio de la estructura poblacional y de otros aspectos relacionados con el flujo de genes (p.e. sistemas de apareamiento, estructura social, etc.) importancia sido ampliamente aceptado. Los marcadores moleculares neutrales, como el ADN mitocondrial (ADNmt), han sido usados para estimar la cantidad de variación genética presente en los individuos y comprender la dinámica poblacional de diversas especies de vertebrados silvestres (Avise *et al.* 2002, LeDuc *et al.* 2002).

El ADNmt proviene del linaje materno, la mayoría de las diferencias entre secuencias en este genoma se deben a sustituciones, más que a otro tipo de mutación, como inserciones o deleciones (indels) que son menos comunes. A

² Dentro de los niveles de organización del cachalote, se considera que una superagregación: es un conjunto de varios grupos sociales, que se congregan en un área que puede abarcar entre 9 y 72 km. (Whitehead 2002).

menudo se emplea la región control del ADNmt, debido a que es la región hipervariable con mayor tasa de mutación. (Avise 1994, Avise *et al.* 2000).

Es por ello que nos pueden dar información en cuanto al potencial adaptativo de los individuos a su ambiente o a un posible cambio en éste. (Avise 1994, Meyers y Bull 2002). En determinadas ocasiones el análisis de la región control tiene un poder limitado por lo que también se han identificado múltiples Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) en la región codificante del genoma mitocondrial, se caracterizan por tener una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (A, G, C o T) de una secuencia del genoma (Mesnick *et al.* 2011).

De igual manera los microsatelites (SSR o STR) son ampliamente usados, estas son secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de manera consecutiva y va de uno hasta seis nucleótidos. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos los cuales se distinguen entre sí por la longitud total del fragmento. Se encuentran en zonas no co-codificantes del ADN, son neutros co-dominantes y poseen una alta tasa de mutación lo que los hace muy polimórficos (Goldstein y Schlotterer 1999).

Dado su elevado nivel de polimorfismo, resultan útiles para definir un único genotipo multilocus, de particular interés en estudios donde se requiera una escala muy fina de resolución y en los cuáles otros tipos de marcadores podrían presentar algunas limitaciones (Aranguren-Méndez 2004).

Dadas las características de los marcadores genéticos moleculares, actualmente es el enfoque más utilizado para delimitar subpoblaciones dentro de una población de cetáceos, ya que a través del análisis de estos marcadores se pueden determinar las diferencias genéticas entre individuos (Gendron y Mesnick 2001).

Particularmente, en lo que a cachalotes se refiere, los resultados basados en la variación de la secuencia en el ADN mitocondrial (ADNmt) reflejan una baja diversidad, en contraste, con los loci nucleares polimórficos (microsatélites) no se han encontrado diferencias significativas (Mesnick *et al.* 2011)

Diferentes autores sugieren que existe poca diferenciación genética y que los límites entre las poblaciones de esta especie no se encuentran bien definidos, por lo que ha considerado manejar las poblaciones a nivel de

cuencas oceánicas. (Lyrholm 1998, Engelhaupt *et al.* 2009). Mesnick y colaboradores (2005) analizaron muestras de cachalote de todo el mundo encontrando tan solo 28 haplotipos mitocondriales (24 sitios variables). De acuerdo con algunos autores, esta baja diversidad puede ser reflejo de un cuello de botella histórico en la población (Lyrholm *et al.* 1996).

También usando ADNmt, Drout y colaboradores (2004) encontraron diferencias significativas entre las agregaciones de cachalote del Mar Mediterráneo y el Atlántico norte, por lo que sugieren que los individuos de estas dos áreas constituyen diferentes entidades maternas y que presentan una fuerte fidelidad al sitio. Esto concuerda con las observaciones previas de Lyrholm y Gyllesten (1998), quienes encontraron una estructura genética significativa entre las agregaciones de cachalote de cuencas oceánicas del norte del Atlántico, el norte del Pacífico y el hemisferio sur.

Pese a la clara estructura interoceánica de las agregaciones de la especie, dentro de la misma cuenca oceánica las diferencias genéticas no son tan evidentes. Lyrholm y Gyllesten (*op. cit.*) no encontraron diferencias dentro de las diferentes cuencas oceánicas que analizaron. En contraste, el análisis más reciente de la estructura poblacional de los cachalotes en el Pacífico Norte, en el que se utilizaron diferentes marcadores genéticos (ADNmt y SNPs) evidenció

que el estrato de la Corriente de California muestra una diferencia significativa con respecto a los individuos de aguas adyacentes al Hemisferio Sur y de aguas distantes al oeste de Hawai (Mesnick *et al.* 2011). También se han encontrado niveles significativos de heterogeneidad genética entre grupos de hembras maduras observados cerca de las Islas Galápagos, lo que podría indicar una fuerte estructura matrilineal en latitudes bajas e intermedias (Richard *et al.* 1996).

En general, el uso de microsatélites no ha permitido evidenciar diferencias muy marcadas entre las agregaciones intraoceánicas (Richards *et al.* 1996^a, Engelhaupt *et al.* 2004, Lyrholm *et al.* 1999, Drout *et al.* 2004, Mesnick *et al.* 2004). No obstante, Pinela y colaboradores (2010) determinaron que aunque todos los individuos que visitan la zona del Archipiélago de Azores pertenecen a una sola población, se presentaron diferencias interanuales que sugieren un uso diferencial de la zona por parte de diferentes grupos sociales de cachalote.

En resumen, varios autores sugieren que existe poca diferenciación genética de las poblaciones de cachalote entre las diferentes cuencas oceánicas y poca evidencia de subdivisión dentro de ellas. En el presente estudio, se analiza la estructura genética de las agregaciones de esta especie que usan el GC, tanto

en la escala temporal como en la espacial, con el objeto de aportar información con respecto a la influencia de la estructura social en el uso del hábitat. Desde el punto de vista de la biología de la conservación, es de vital importancia conocer los factores que rigen el uso que los individuos le dan a las diferentes áreas, considerando que esta zona representa una de las zonas de agregación de mayor importancia para la especie en el Pacífico Norte, en donde realizan actividades de alimentación y crianza.

3. OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

- ❖ Establecer la identidad genética de los cachalotes que usan el Golfo de California

3.2.- Objetivos particulares

- ❖ Estimar los niveles de diversidad genética de las agregaciones de cachalote presentes en el Golfo de California usando marcadores genéticos moleculares mitocondriales y nucleares.
- ❖ Evaluar el nivel de diferenciación genética entre las agregaciones de cachalote presentes en el Golfo de California y aquellas que han sido reportadas previamente para el Pacífico.

4. HIPÓTESIS

Dadas las evidencias de que diferentes agregaciones de cachalotes usan el GC (isótopos estables, acústica y fotoidentificación), es probable que esta estructura social se refleje en diferencias a nivel genético, por lo que a través de análisis espacial y temporal de la diversidad genética se puede explorar si existe un patrón de uso diferencial por parte de dichas agregaciones, establecer su identidad y su nivel de conectividad con otras de las agregaciones del Pacífico Norte.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

El área de estudio fue el Golfo de California, que es uno de los ecosistemas marinos más diversos del planeta, se encuentra situado entre los 24°N altitud y los 32°N de latitud. Presenta una longitud aproximada 1 550 km y anchura de 100 a 200 km (Álvarez-Borrego *et al.* 1991, INEGI 1999). La temperatura promedio del Golfo de California es de 24°C, el fondo es uno de los más abruptos del mundo, presenta valles y cañones submarinos que corren a lo largo de las márgenes, dando forma a abismos que llegan a superar los tres kilómetros de profundidad (Bray 1988, Torres Orozco 1993).

Sus aguas proveen una rica mezcla de nutrientes que a su vez soporta una inmensa concentración de plancton que dan como consecuencia, una cadena alimenticia representada por numerosas poblaciones de peces, delfines, balles y aves marinas, (Álvarez-Borrego *et al.* 1991, Álvarez-Borrego 2002). Por lo que esta zona es de vital importancia para la alimentación, reproducción y migración de muchas especies. (Lavín *et al.* 1995).

Estudios previos sugieren la importancia de tres zonas de agregación de cachalote que destacan por ser áreas de importancia por efectos biológicos y

factores oceanográficos, estas áreas son San Pedro Mártir, Guaymas, el Farallón y Santa Rosalia, que son las zonas en las cuales se realizó la colecta de muestras, se encuentran indicadas en la Figura 1 (ver Jaquet *et al.* 2002, Guerrero de la Rosa 2008).

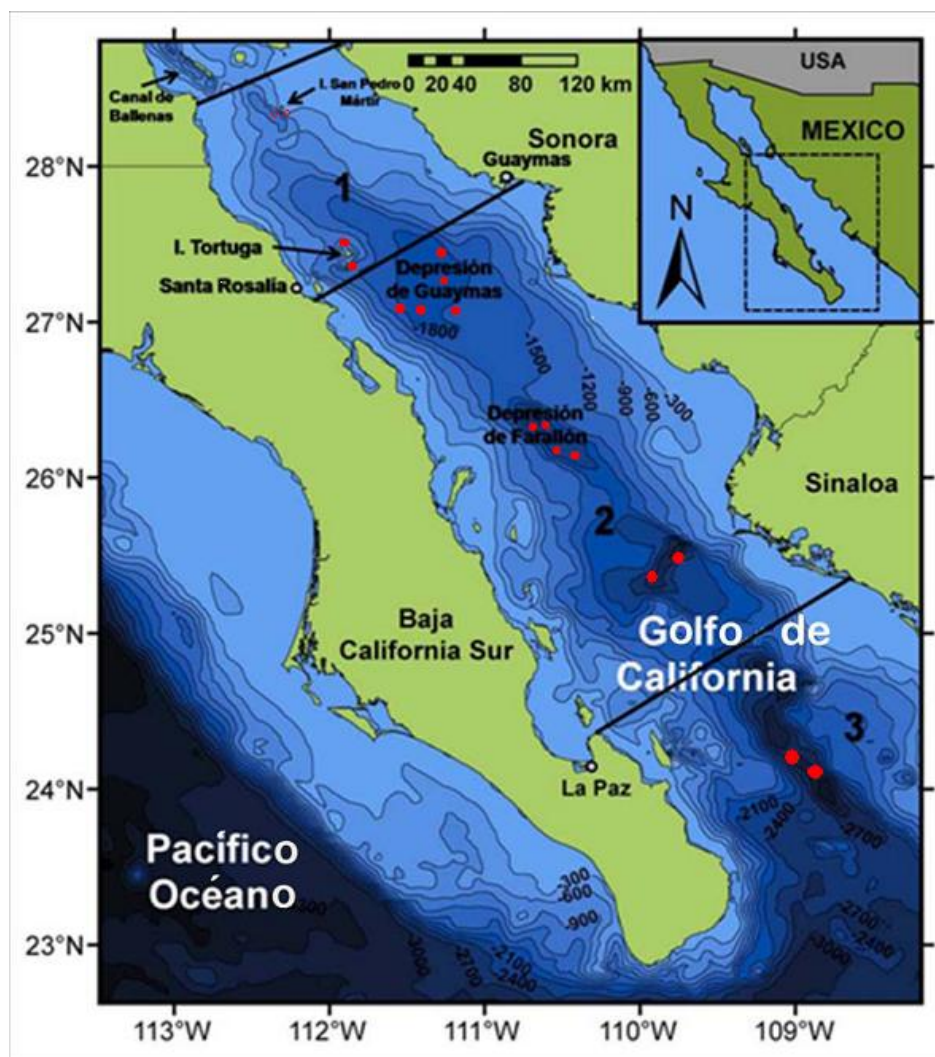


Figura 1.- Localización del Golfo de California donde se presentan las tres zonas más importantes de agregación de los cachalotes, así como los puntos de recolecta de las muestras usadas en el presente trabajo (Tomado de Guerrero de la Rosa 2008).

En la Figura 2 se indican las zonas en las se han observado agregaciones de cachalote y que han sido usadas como criterio para establecer los estratos o poblaciones putativas en el océano Pacífico (ver Lyrholm y Gyllesten 1998, Mesnick *et al.* 2011). En el presente trabajo, se contrastaron dichas agregaciones con aquellas observadas dentro del Golfo de California entre 1998 y 2008.

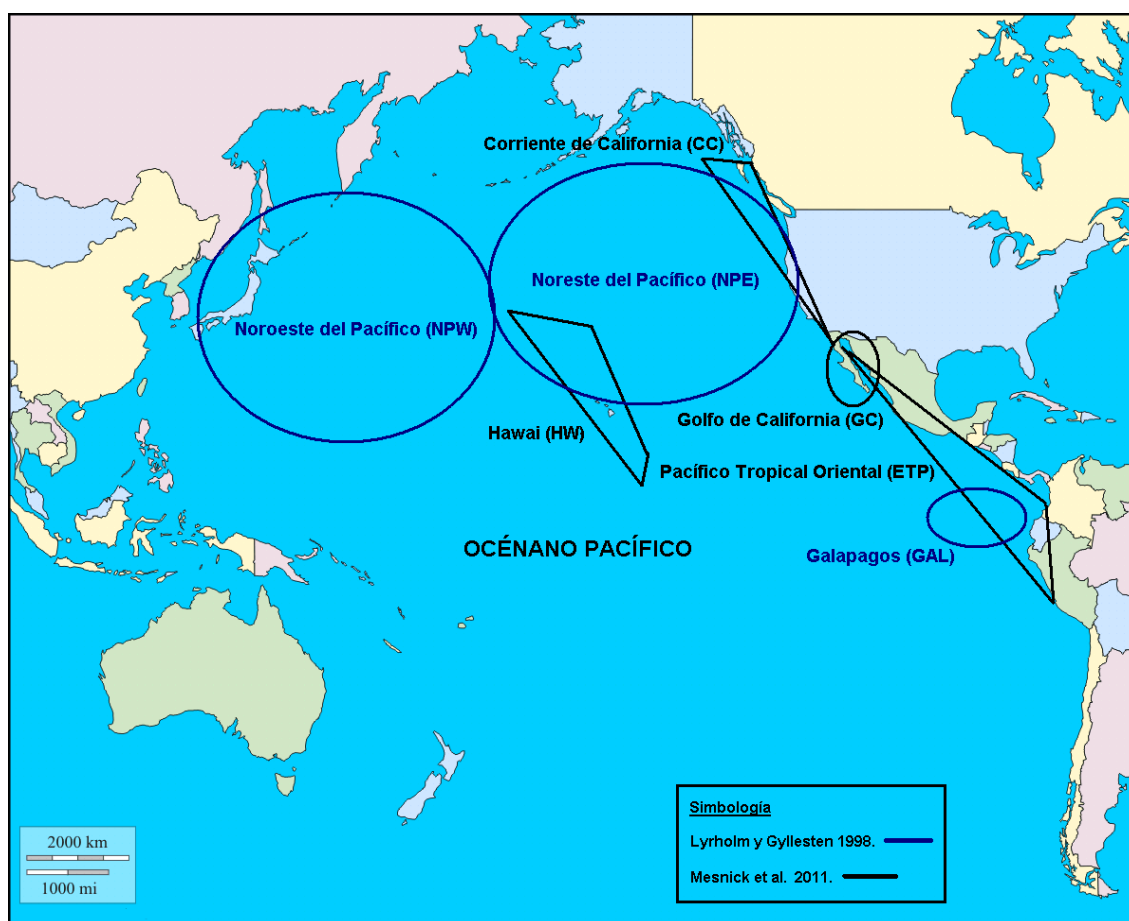


Figura 2. Zonas donde fueron colectadas las muestras de cachalote en diferentes estudios realizados en el océano Pacífico.

5.2. Muestras

Se analizaron 108 muestras de cachalote (biopsias y piel descamada), que fueron recolectadas entre 1998-2008 en el Golfo de California por el Laboratorio de Ecología de Mamíferos Marinos del CICIMAR-IPN. La recolecta de las muestras se realizó bajo los permisos avalados por la SEMARNAT (SGPA/DGVVS/03366/08, SGPA/DGVVS/00506/08, SGPA/DGVVS/08021/06, SPG A/DGVVS/12057, SGPA/DGVVS/00560, SGPA/DGVVS/01641, SGPA/DGVVS/00624, SGPA/DGVVS/7000, DOO02-8318 y DOO02-5167).

En la Tabla I se indica el número de muestras obtenidas por el CICIMAR-IPN durante los últimos 10 años. Todas las muestras empleadas en el presente estudio fueron preservadas en una solución de dimetil sulfoxido al 20% saturada con cloruro de sodio (ver Amos y Hoelzel, 1991).

Tabla I. Número de muestras de cachalote (*Physeter macrocephalus*) recolectadas en el Golfo de California y que fueron empleadas en el presente estudio.

Año	Muestras
1998	2
2000	5
2001	1
2002	30
2003	19

2004	5
2005	13
2006	1
2007	10
2008	22
Total	108

5.3. Extracción del ADN

La extracción del ADN total (ADNt) de cada individuo se llevo a cabo con base en el protocolo propuesto por Aljanabi y Martínez (1997), digiriendo aproximadamente 30 mg de tejido con Proteinasa K a una concentración final de 0.02mg/mL por 12 horas a 65°C..

La cantidad y calidad del ADNt obtenido se evaluó a través de una electroforesis en agarosa usando 10% del volumen total de cada muestra. Los geles se prepararon a una concentración de 1.5% de agarosa conteniendo 0.05 µg/µL de bromuro de etidio. Las muestras se diluyeron para homogenizar su concentración a 25 ng de ADNt por microlitro.

5.4. Amplificación por PCR

5.4.1 Identificación molecular del sexo

Se identificó el sexo mediante la amplificación por PCR del sistema de genes ZFX-ZFY usando los cebadores específicos reportados por Bérube, y Palsbøll (1996). Las reacciones se prepararon en un volumen final de 23.5 µl de solución amortiguadora Tris-HCl 22 mM (pH 8.4) adicionada con cloruro de potasio (KCl) 55 mM, cloruro de magnesio (MgCl₂) 2.5 mM, mezcla de nucleótidos (dNTPs) 0.35 mM, 1.2 U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen™), 3.0 picomoles de cada cebador y de 10 a 30 ng de tDNA. El perfil de temperatura empleado para la amplificación de los cromosomas sexuales y las secuencias de los cebadores se detallan en el Apéndice 1.

5.4.2. Diversidad haplotípica del ADN mitocondrial

Se amplificó y secuenció un fragmento de 740 pb de la región control del ADN mitocondrial usando los cebadores Tro y Pmac863 (ver Apéndice 1). Las condiciones de la reacción y el perfil de temperaturas fueron los mismos que se emplearon para la identificación molecular del sexo.

Para identificar los linajes maternos; se amplificó el dominio hipervariable I que es la región control mayor no codificante, conocida como región control o *D-Loop*, que ocupa 1122 pares de bases, la cual se presenta en la figura 3. (Coskun *et al.* 2003).

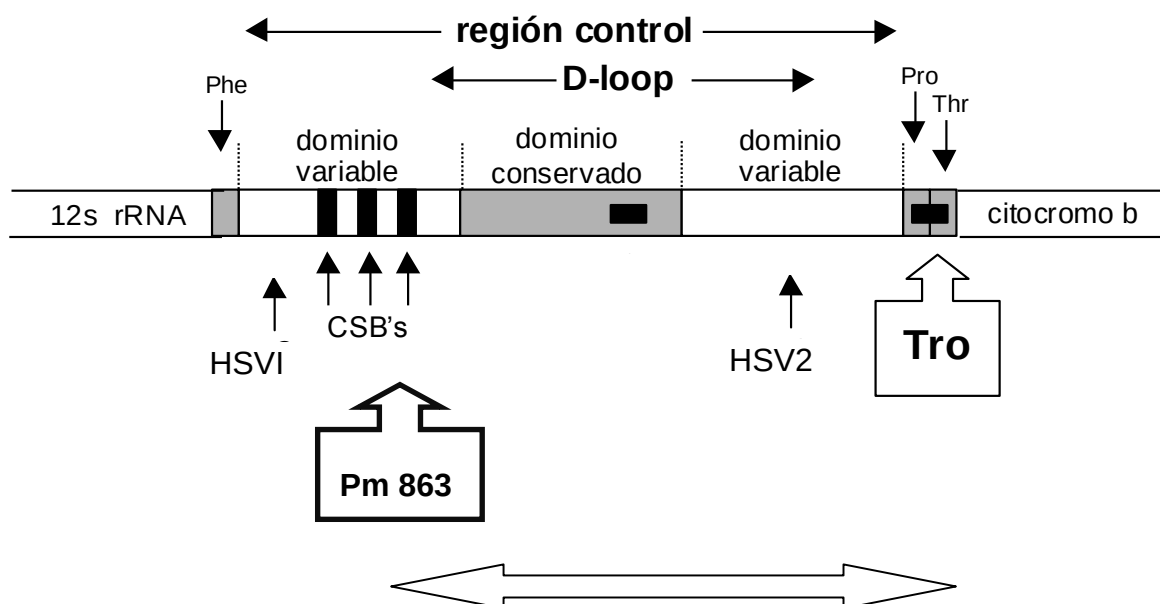


Figura 3. Principales dominios de la región control del ADNmt en mamíferos. Existen dos regiones hipervariables (HSV1 y HSV2) dentro de la región control, que flanquean un región más conservada. En uno de los dominios variables se encuentran algunas zonas de secuencias conservadas (CBS's ó Conserved Sequence Blocks). La región que se amplificó para este estudio está señalada por la flecha blanca desde la zona Thr hasta poco antes de la región CBS (Modificado de Avise 2000).

Los cebadores antes mencionados amplifican un fragmento de aproximadamente 863 pb. Los productos de PCR se purificaron mediante columnas PCR PureLink (Invitrogen™) y se enviaron a un laboratorio comercial (SeqXcel Inc.³) donde fueron para ser secuenciados en forma automatizada en un equipo ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems).

³ SeqXcel Inc. 11526 Sorrento Valley Road , Suite B2 , San Diego, CA 92121 <http://www.seqxcel.com>

5.4.3. Microsatélites

Para el genotipado, se seleccionaron diez de los loci microsatélites previamente reportados como los más polimórficos e informativos para la especie. En la Tabla II se detalla el locus, el tamaño y el número esperado de alelos para cada uno de los microsatélites seleccionados.

Tabla II. Características generales de los microsatélites que fueron evaluados en los cachalotes del Golfo de California para el presente trabajo.

Microsatélite	Tamaño	Alelos reportados	Referencia
DlrFCB17	138-225	22	Buchanan et al. 1996
GATA028	146-202	11	Palsboll <i>et al.</i> 1997
GATA417	181-253	3	Palsboll <i>et al.</i> 1997
SW02	73-81	5	Richard <i>et al.</i> 1996
SW10	137-159	12	Richard <i>et al.</i> 1996
SW13	136-175	11	Richard <i>et al.</i> 1996
SW19	90-160	18	Richard <i>et al.</i> 1996
EV01	115-197	6	Valsecchi y Amos, 1996
EV05	141-169	5	Valsecchi y Amos, 1996
EV37	178-224	6	Engelhaupt <i>et al.</i> 2009

Con el objeto de optimizar las condiciones de amplificación, se seleccionaron tres muestras con ADN de alta calidad y en las que se contaba con información previa que garantizara que cada muestra perteneciera a un individuo distinto (fotoidentificación, identificación molecular del sexo y haplotipo materno).

Después de evaluar diferentes temperaturas y concentraciones de magnesio, cebadores y polimerasa, los productos de PCR fueron contrastados por medio de una electroforesis en geles de agarosa al 2%. Aquellas condiciones en las que se presentaron bandas claramente definidas y con intensidad adecuada se purificaron y se secuenciaron siguiendo el protocolo descrito previamente para confirmar la presencia del locus microsatélite.

Una vez confirmada la presencia de la unidad repetitiva característica de cada locus, se procedió a realizar la amplificación de las muestras de acuerdo a las condiciones optimizadas pero con uno de los cebadores marcado con fluorocromo (Tabla III). El cebador hacia adelante (forward) de cada *locus* fue marcado con un fluorocromo diferente, (VIC[®], 6-FAM[®], PET[®] y NED[®] Applied Biosystems), a excepción del microsatélite SW19 para el que se marcó el cebador hacia atrás (reverse).

Las reacciones de amplificación se prepararon a partir de 15-30 ng de ADN en un volumen final de 24 μ l de solución amortiguadora Tris (pH 8.4) 10mM, KCl 52 mM, dNTP's 0.20 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, 75 picomoles de cada cebador y 1.5 U *Taq* DNA Polimerasa recombinante (Invitrogen™). Sin embargo, para el locus SW13 la concentración de $MgCl_2$ fue de 2.2 mM.

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Master Cycler® Gradient, siguiendo uno de los dos perfiles de temperatura optimizados: MICPMAC y MICROGCM (ver Apéndice 2).

Todo el procedimiento de amplificación se llevo a cabo bajo un estricto control de calidad siguiendo las recomendaciones descritas por Morin y colaboradores (2010) Para cada grupo de muestras amplificadas se incluyeron dos controles negativos (sin ADN) y algunas muestras que usaron como réplicas. Los controles negativos fueron analizados con la finalidad de monitorear que no existieran problemas de contaminación, mientras que las réplicas confirmarían la reproducibilidad de la amplificación y la correcta asignación al nombrar los alelos.

Los productos de PCR marcados con fluorocromos fueron mezclados y enviados a un laboratorio comercial (Seqxcel, Inc), en donde se realizó el análisis de fragmentos en un secuenciador automatizado ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems).

Tabla III. Condiciones que se emplearon para amplificación de los microsatélites. Los perfiles de temperatura se describen a detalle en el Apéndice 2.

Microsatélite	Fluorocromo	Perfil	T°C ₁	T°C ₂
D1rFCB17	VIC	MICROGCM	56.1	53.0
GATA028	VIC	MICPMAC	53.3	
GATA417	NED	MICROGCM	56.1	53.0
SW02	FAM	MICPMAC	51.4	
SW10	VIC	MICPMAC	56.0	
SW13	PET	MICROGCM	54.3	54.3
SW19	FAM	MICPMAC	56.0	
Ev01	PET	MICPMAC	56.0	53.0
Ev05	NED	MICPMAC	59.0	
Ev37	FAM	MICPMAC	56.0	

5.5. Análisis de datos

5.5.1. Proporción de sexos

La proporción de sexos se calculó con base en el número total de muestras que amplificaron el sistema ZFX-ZFY. La identificación del sexo permitió realizar algunas de las comparaciones entre grupos de machos y hembras que se describen más adelante.

5.5.2. Asignación de los haplotipos maternos: ADNmt

Con la ayuda del software ChromasPro 2.33 (*Technelysium Pty Ltd*), se revisaron y editaron los cromatogramas de las secuencias de la porción hipervariable I de la región control mitocondrial de cada muestra. Una vez confirmada la secuencia consenso de ambas cadenas, esta fue editada removiendo las secciones correspondientes a los cebadores de ambos extremos.

Con la ayuda del programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.* 2000) se alinearon tanto las secuencias obtenidas en el presente trabajo, como las secuencias reportadas en estudios previos (p.e. Lyrholm y Gyllesten 1998, Mesnick *et al.* 2011). Se determinaron los sitios polimórficos y se asignó a cada individuo un haplotipo mitocondrial correspondiente a cada una de las secuencias distintas. Finalmente se calculó la frecuencia de cada haplotipo a través del programa Arlequin versión 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

5.5.3. Filogenia intraespecífica: ADNmt

Una vez alineadas todas las secuencias haplotípicas se reconstruyó el árbol filogenético con ayuda del programa MEGA 2.1. La distancia genética entre cada par de haplotipos se calculó como la proporción de diferencias (sitios variables) con relación a la longitud de las secuencias (p-distance). La topología del árbol filogenético, en la que se incluyeron secuencias homólogas de cachalotes enanos (*Kogia sima*) y pigmeos (*Kogia breviceps*) como grupos externos, permitió evaluar si los haplotipos encontrados en el Golfo de California ocupaban ramas distintas a las de los haplotipos reportados previamente. La topología de mayor consenso para el árbol se obtuvo a partir de 1000 remuestreos por Bootstrap y usando el método de agrupamiento del vecino más cercano (Felsenstein 1985).

Adicionalmente se construyó la red de mínima expansión (MSN o Minimum Spanning Network) con base en el número de diferencias pareadas entre los haplotipos mitocondriales y la asociación entre haplotipos generada por el programa Arlequin versión 3.1. El MSN es una medida de mutación de la distancia para el análisis de varianza molecular que representa las diferencias nucleotídicas o los cambios entre haplotipos, este análisis de varianza se realizó con el programa Arlequin versión 3.1.

5.5.4. Diversidad y estructura genética: ADNmt

La diversidad genética se estimó con base en las frecuencias y el número de diferencias nucleotídicas de los haplotipos. La diversidad haplotípica (h) es una medida equivalente a la heterocigosidad esperada para datos diploides y se define como la probabilidad de que dos secuencias tomadas al azar de una muestra o población sean diferentes. Por su parte, la diversidad nucleotídica (π) es equivalente a la diversidad haplotípica pero al nivel de nucleótido y se define como la probabilidad de que al elegir dos nucleótidos homólogos al azar en un par de secuencias éstos sean diferentes. Ambos índices se calcularon con ayuda del programa Arlequin versión. 3.1. (Excoffier *et al.* 2005).

Con la ayuda del software Arlequin versión 3.1, se realizó el análisis de varianza AMOVA empleando los índices de diferenciación genética F_{ST} y Φ_{ST} (Excoffier *et al.* 1992, Schneider *et al.* 2000), Este análisis se realizó, en primera instancia, con los datos obtenidos en el presente estudio, agrupando las muestras por años y sexos. Posteriormente, el análisis se efectuó de nueva cuenta, incluyendo las secuencias reportadas por otros autores para otras zonas del Océano Pacífico (ver Lyrholm y Gyllesten 1998, Mesnick *et al.* 2011), usando como criterio de agrupación al área geográfica.

Para evaluar si la diversidad genética dentro del Golfo de California era similar entre sexos y entre años (1998-2008) se realizó el análisis de diferenciación genética poblacional (AMOVA). Para el caso de la comparación del GC con otras zonas del Océano Pacífico se realizó el análisis de diferenciación genética entre años (usando exclusivamente muestras con $N > 10$)

5.5.5 Asignación del genotipo multilocus: Microsatélites

Los resultados del análisis automatizado de fragmentos, sintetizado en los electroferogramas, fueron evaluados con el programa GeneMarker V1.85 (SoftGenetics LLC). Los electroferogramas registran la intensidad de la señal fluorescente para cada alelo y la estimación de su tamaño en pares de bases (Selkoe y Toonen 2006) con referencia a un marcador estándar (GeneScan™ 600® LIZ, Applied Biosystems). La asignación de los alelos fue realizada por tres observadores de forma independiente para evaluar los errores en la asignación de los alelos. Todas las muestras en las que se presentaron ambigüedades o incongruencias entre las lecturas independientes fueron reamplificadas para garantizar la asignación correcta de los genotipos.

Como última fase del control de calidad se evaluó, con base en las frecuencias alélicas, la presencia de posibles errores en el genotipado y las potenciales fuentes de sesgo asociadas con el muestreo.

El programa MICRO-CHEKER v2.23 (Van Oosterhout *et al.* 2004), se utilizó para evaluar la presencia de errores de genotipado asociados con alelos no amplificados (alelos nulos), amplificación diferencial de los alelos cortos (allelic dropout), tartamudeo de la polimerasa (stutter peaks) o errores tipográficos.

Así mismo, se procedió a calcular el nivel informativo de cada microsatélite y la probabilidad de identidad con el programa GIMLET v1.2.3 (Valière 2002). La probabilidad de identidad (PI) es el estadístico más comúnmente usado, calcula la tasa de error por locus, cuantificando 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.

5.5.6. Diversidad y estructura genética: Microsatélites

Para el cálculo del número de alelos por locus, las frecuencias alélicas, la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), la presencia de muestras duplicadas y el contenido informativo del polimorfismo (PIC; Botstein *et al.* 1980) se empleó el macro de Excel MSTOOLS v3.1.1 (Park 2008).

Con la finalidad de evaluar la consistencia de los resultados, el análisis de los datos también se realizó con el programa GenALEx v6.4 (Peakall y Smouse 2006), evaluando la diversidad genética, la heterocigosidad observada (H_o) y la esperada (H_e), y el equilibrio de Hardy-Weinberg. Con este mismo programa se calcularon las distancias genéticas entre todos los individuos con base en los genotipos *multilocus* y se contrastaron las relaciones genéticas entre los individuos a través de un análisis de componentes principales (PCA).

Mediante el programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.* 2005) se probó si los loci se encontraban en condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg y se efectuó un análisis de varianza molecular (AMOVA), en el que las desviaciones cuadradas medias entre los genotipos, que representan distancia genética media y las varianzas en las frecuencias genotípicas, son consideradas para estimar los índices de diferenciación genética F_{ST} y R_{ST} (Excoffier *et al.* 1992, Schneider *et al.* 2000).

5.5.7. Comparación con otras agregaciones del Pacífico Norte: Microsatélites

Para el caso de microsatélites, se realizó la comparación con los datos obtenidos en el trabajo de Mesnick y colaboradores (2011). Es importante mencionar que para esta comparación se emplearon solo algunos de los microsatélites analizados en el presente trabajo (EV05, SW10, SW13 y SW19). Debido a que los fluorocromos y las secuencias de los cebadores para la amplificación de los loci microsatélites difieren ligeramente de los usados para otras agregaciones del Pacífico (ver Mesnick *et al.* 2011), se optó por homologar los tamaños de los alelos con base en la distribución de frecuencias alélicas y el patrón de repeticiones característico de cada locus (datos no mostrados). Dicha homologación de alelos permitió hacer la comparación entre los microsatélites EV05 y SW10, así como de los microsatélites SW13 y SW19, corrigiendo los tamaños de los alelos en 8 y 5 pares de bases respectivamente.

6.- RESULTADOS

De un total de 194 muestras de piel de cachalote que fueron procesadas, solamente en 108 de ellas se obtuvo suficiente ADN para la amplificación por PCR de la región control mitocondrial. Sin embargo, no en todas ellas se logró la amplificación con los cebadores empleados para la identificación del sexo o para todos los microsatélites (ver apéndice 3). El total de muestras sexadas molecularmente fueron 106, sin embargo 2 fueron descartadas ya que resultaron ser muestras repetidas, mientras que las muestras en las que se logró obtener el genotipo multilocus con al menos 6 de los 10 microsatélites que se emplearon fueron tan solo 50.

6.1. Proporción de sexos

La identificación molecular del sexo fue positiva en 104 de las muestras analizadas, resultando en un total de 88 hembras (84.6%) y 16 machos (15.4%). Esto corresponde a una proporción de sexos cercana a 4:1 (hembras-machos).

6.2. ADN mitocondrial

6.2.1. Diversidad genética

Una vez obtenidos los haplotipos y los genotipos multilocus de los individuos, así como la identificación del sexo, se encontró que aparentemente un par de individuos fue muestreados dos veces (mismo sexo, mismo haplotipo y mismo genotipo multilocus). Estas muestras duplicadas fueron eliminadas de los subsecuentes análisis, por lo que los resultados globales incluyen solo las muestras correspondientes a 104 individuos.

Debido a que, como se detallará más adelante, solo 50 de estas 104 muestras se incluyeron en los análisis basados en la información de los microsatélites, todos los análisis basados en las secuencias mitocondriales se realizaron tanto con la muestra completa ($n=104$) como con la muestra restringida ($n=50$). Ya que no se observaron diferencias significativas en las frecuencias haplotípicas o en las estimaciones de diversidad nucleotídica, se decidió presentar solamente los resultados de la muestra completa.

A partir del análisis de las secuencias mitocondriales, se encontraron 11 haplotipos (Tabla IV), tres de los cuales representaron poco más del 72% de los individuos analizados. El haplotipo más abundante fue Pmac02, mientras que Pmac12 y Pmac16 estuvieron representados tan solo por un individuo. Las secuencias y los sitios variables que definen los haplotipos se detallan en el Apéndice 4.

Tabla IV. Haplotipos maternos registrados en las agregaciones de cachalote del Golfo de California entre 1998 y 2008.

Haplotipos	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
Pmac01	24	23.08%
Pmac02	45	43.27%
Pmac03	6	5.77%
Pmac04	4	3.85%
Pmac05	3	2.88%
Pmac08	4	3.85%
Pmac09	3	2.88%
Pmac10	5	4.81%
Pmac12	1	0.96%
Pmac14	8	7.69%
Pmac16	1	0.96%

Las estimaciones de diversidad haplotípica y nucleotídica se muestran en la Tabla V, Aunque los tamaños de muestra para cada año son muy variables, las estimaciones de diversidad son bastante similares para aquellas muestras con más de 10 individuos.

Tabla V. Diversidad genética de las agregaciones de cachalote en el Golfo de California. Se indica el número de muestras (n), número de haplotipos (nH), la diversidad haplotípica (H) y la diversidad nucleotídica (π), con sus respectivos desviaciones estándar (d.e.).

Agregación	n	nH	H (d.e.)	π (d.e.)
Golfo de California 1998-2008	104	11	0.75 ± 0.03	1.35 ± 0.84
Golfo de California 1998	1	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Golfo de California 2000	5	2	0.60 ± 0.17	0.60 ± 0.56
Golfo de California 2001	1	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Golfo de California 2002	29	7	0.81 ± 0.04	1.54 ± 0.95
Golfo de California 2003	19	6	0.78 ± 0.05	1.62 ± 1.00
Golfo de California 2004	5	3	0.70 ± 0.21	0.80 ± 0.68
Golfo de California 2005	13	7	0.89 ± 0.05	2.03 ± 1.22
Golfo de California 2006	1	1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Golfo de California 2007	9	3	0.72 ± 0.09	1.05 ± 0.77
Golfo de California 2008	21	3	0.26 ± 0.11	0.35 ± 0.35
Galapagos (GAL) ^a	38	4	0.68 ± 0.33	0.95 ± 0.66
Pacífico. Nororiental (NEP) ^a	31	6	0.68 ± 0.62	1.03 ± 0.71
Pacífico Noroccident al (NPW) ^a	34	7	0.76 ± 0.04	1.39 ± 0.87
Pacífico Central: Hawai (HW) ^b	27	4	0.65 ± 0.65	0.79 ± 0.59
Corriente de California (CC) ^b	43	12	0.83 ± 0.04	1.84 ± 1.07
Pacífico Tropical Oriental (ETP) ^b	97	12	0.77 ± 0.02	1.43 ± 0.88

Nota: El sombreado gris señala los valores globales de la muestra analizada en el presente estudio. ^a Datos tomados de Lyrholm y Gyllesten (1998). ^b Datos tomados de Mesnick y colaboradores (2011).

6.2.2. Estructura genética

El análisis de estructura poblacional (AMOVA) entre el GC y algunas de las agregaciones del Pacífico reportadas por Lyrholm y Gyllesten (1998) resultó significativo al considerar exclusivamente las frecuencias de los haplotipos ($F_{ST} = 0.0193$, $p=0.04$), pero no significativo al incluir las distancias moleculares ($\Phi_{ST} = 0.01397$, $p=0.08$). Lo anterior sugiere un nivel significativo de estructura poblacional en la escala espacial.

Las comparaciones pareadas de los índices de diferenciación genética indicaron una mayor distancia genética entre el GC y Galápagos, así como una mayor similitud con otras áreas del Pacífico Norte (Tabla VI, Fig. 4).

Tabla VI. Coeficientes de diferenciación genética entre las agregaciones de cachalote del Golfo de California y las diferentes agregaciones del Pacífico reportadas por Lyrholm y Gyllesten (1998). En color rojo se indican los valores que resultaron significativos. En la diagonal superior se reporta Φ_{ST} y en la diagonal inferior F_{ST} .

Población	Etiqueta	1	2	3	4
GAL Galápagos	1	0.0000	0.0000	0.0695	0.0000
NPW Noroeste del Pacífico	2	0.0000	0.0000	0.0235	0.0000
NPE Noreste del Pacífico	3	0.0151	0.0000	0.0000	0.0335
GC Golfo de California	4	0.0257	0.0053	0.0418	0.0000

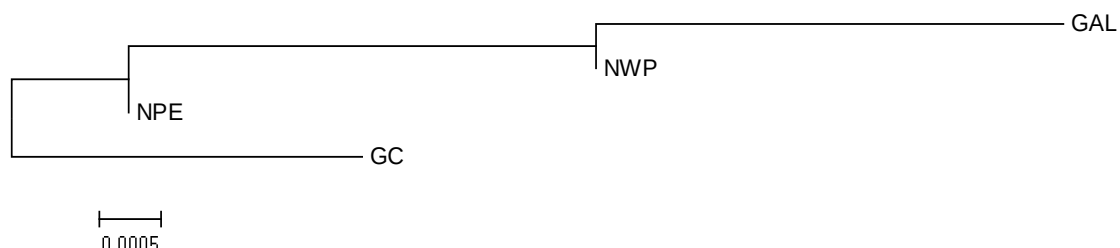


Figura 4. Similitud genética entre algunas agregaciones de cachalote en el Pacífico. La topología se reconstruyó con base en la matriz de comparaciones pareadas del índice F_{ST} basado en los haplotipos del ADNmt.

Por su parte, el AMOVA para evaluar la presencia de estructura temporal también resultó significativo para ambos índices de diferenciación genética ($F_{ST} = 0.0076$, $p = 0.00$; $\Phi_{ST} = 0.0598$, $p = 0.00$). Esto sugiere que las variaciones interanuales de las agregaciones que usan el Golfo de California podrían estar asociadas con el ingreso de individuos con haplotipos mitocondriales pertenecientes a alguna de las agregaciones del Pacífico previamente reportadas por Lyrholm y Gyllesten (1998). Las comparaciones pareadas de los índices de diferenciación genética y las distancias genéticas entre las distintas agregaciones temporales del GC y de otras regiones del Pacífico se presentan en la Tabla VII y la Figura 5.

Tabla VII. Coeficientes de diferenciación genética entre las agregaciones interanuales de cachalote en el Golfo de California y las diferentes agregaciones del Pacífico reportadas por Lyrholm y Gyllesten (1998). En color rojo se indican los valores que resultaron significativos. En la diagonal superior se reporta el valor de Φ_{ST} y en la diagonal inferior el valor de F_{ST} .

Población	Etiqueta	1	2	3	4	5	6	7	8	9
GAL Galapagos	1	0.0000	0.0033	0.0695	0.0670	0.0080	0.0980	0.1303	0.0206	0.1234
NWP Noroeste del Pacífico	2	0.0012	0.0000	0.0235	0.0797	0.0097	0.0775	0.0520	0.0137	0.1046
NPE Noreste del Pacífico	3	0.0151	0.0009	0.0000	0.0361	0.0257	0.1102	0.0500	0.0235	0.2453
2000 Golfo de California	4	0.0416	0.0550	0.0295	0.0000	0.0800	0.0203	0.0403	0.0016	0.0614
2002 Golfo de California	5	0.0087	0.0063	0.0253	0.0335	0.0000	0.0618	0.0479	0.0217	0.1106
2003 Golfo de California	6	0.1047	0.0767	0.0781	0.0769	0.0696	0.0000	0.1376	0.1000	0.1482
2005 Golfo de California	7	0.0591	0.0130	0.0427	0.0543	0.0073	0.0586	0.0000	0.0313	0.3425
2007 Golfo de California	8	0.0400	0.0138	0.0406	0.0514	0.0206	0.0914	0.0366	0.0000	0.3334
2008 Golfo de California	9	0.2475	0.2038	0.3072	0.1277	0.2114	0.3566	0.3585	0.2685	0.0000

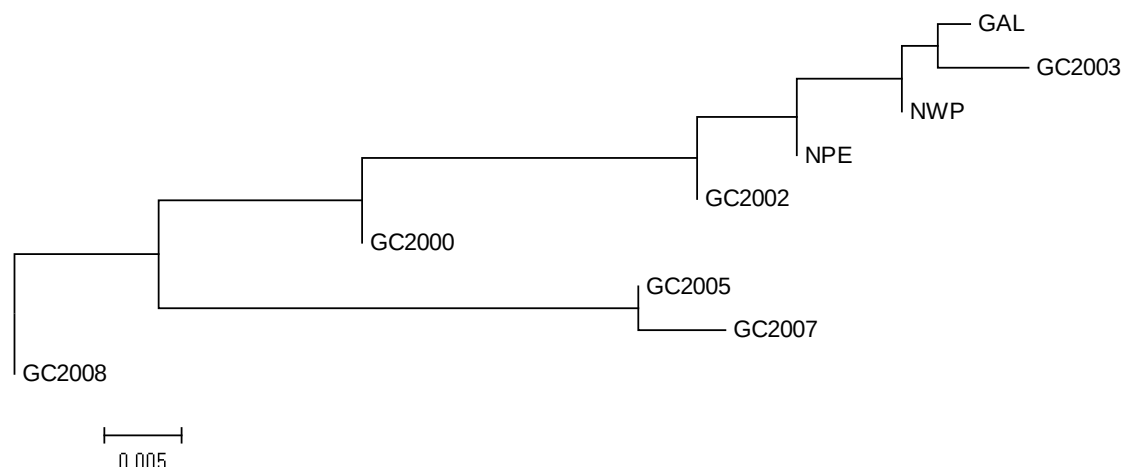


Figura 5. Similitud genética interanual entre algunas agregaciones de cachalote en el Pacífico Lyrholm y Gyllesten, 1998). Donde (GAL) Galápagos, (NWP) Noroeste del Pacífico), (ETP) Pacífico Tropical Oriental, (NPE) Noreste del Pacífico, también se encuentra dividida la muestra de Golfo de California por años (GC2003), Golfo de California 2003. La topología se reconstruyó con base en la matriz de comparaciones pareadas del índice F_{ST} con el ADNmt.

La comparación con los datos reportados recientemente por Mesnick y colaboradores (2011) también aportó evidencias de estructura genética, tanto a una escala espacial ($F_{ST} = 0.04194$, $p=0.00$; $\Phi_{ST} = 0.04690$, $p=0.00$), como en la escala temporal ($F_{ST} = 0.09443$, $p = 0.00$; $\Phi_{ST} = 0.07941$, $p = 0.00$). Con base en las comparaciones pareadas de los índices de diferenciación genética entre zonas, aparentemente existe una mayor similitud entre las zonas de Hawai y la Corriente de California, mientras que los cachalotes del GC resultaron más parecidos a aquellos de las agregaciones del Pacífico Tropical Oriental (Tablas VIII, Fig. 6). Sin embargo, el análisis de diferenciación temporal en las agregaciones evidenció que las agregaciones dentro del GC presentan una importante variación interanual (Tabla IX, Fig. 7).

Tabla VIII. Coeficientes de diferenciación genética entre las agregaciones de cachalote del Golfo de California y las diferentes agregaciones del Pacífico reportadas por Mesnick y colaboradores (2011). En color rojo se indican los valores que resultaron significativos. En la diagonal superior se reporta el valor de Φ_{ST} y en la diagonal inferior el valor de F_{ST} .

Población	Etiqueta	1	2	3	4
Hawai (HW)	1	0.00000	0.04179	0.04645	0.09218
Corriente de California (CC)	2	0.06263	0.00000	0.05957	0.08696
Pacífico Oriental Tropical (POT)	3	0.04813	0.05795	0.00000	0.00783
Golfo de California (GC)	4	0.08323	0.07385	0.00273	0.00000

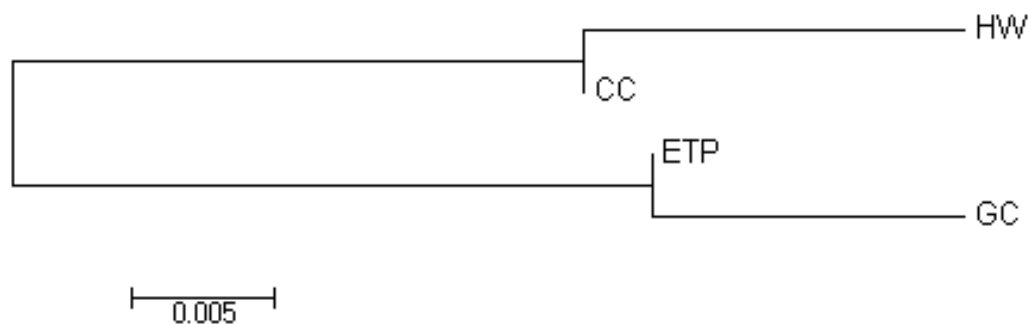


Figura 6. Similitud entre las agregaciones del Golfo de California (GC) y las agregaciones de cachalote del Pacífico reportadas por Mesnick *et al.* (2011), donde (HW) Hawai, (CC) Corriente de California, (ETP) Pacífico Tropical Oriental, (GC) Golfo de California. La topología se reconstruyó con base en la matriz de comparaciones pareadas del índice F_{ST} con el ADNmt.

Tabla IX. Coeficientes de diferenciación genética entre las agregaciones de cachalote reportadas por Mesnick *et al.* (2011) y las agregaciones interanuales dentro del Golfo de California. En color rojo se indican los valores que resultaron significativos. En la diagonal superior se reporta Φ_{ST} y en la diagonal inferior F_{ST} .

Población	Etiqueta	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HW Hawai	1	0.0000	0.0418	0.0465	0.1184	0.0621	0.2082	0.0550	0.0003	0.4157
CC Corriente de California	2	0.0626	0.0000	0.0596	0.0101	0.0632	0.1337	0.0077	0.0347	0.2068
ETP Pacífico Trop. Oriental	3	0.0481	0.0580	0.0000	0.0587	0.0076	0.0805	0.0716	0.0426	0.1002
2000 Golfo de California	4	0.0400	0.0700	0.0436	0.0000	0.0764	0.0203	0.0403	0.0058	0.0473
2002 Golfo de California	5	0.0695	0.0301	0.0005	0.0257	0.0000	0.0632	0.0402	0.0315	0.1136
2003 Golfo de California	6	0.1220	0.0774	0.0804	0.0769	0.0672	0.0000	0.1376	0.0913	0.1413
2005 Golfo de California	7	0.0663	0.0112	0.0325	0.0543	0.0025	0.0586	0.0000	0.0385	0.3307
2007 Golfo de California	8	0.0369	0.1015	0.0153	0.0342	0.0377	0.1086	0.0480	0.0000	0.3026
2008 Golfo de California	9	0.3778	0.3163	0.1565	0.1122	0.2209	0.3460	0.3461	0.2298	0.0000

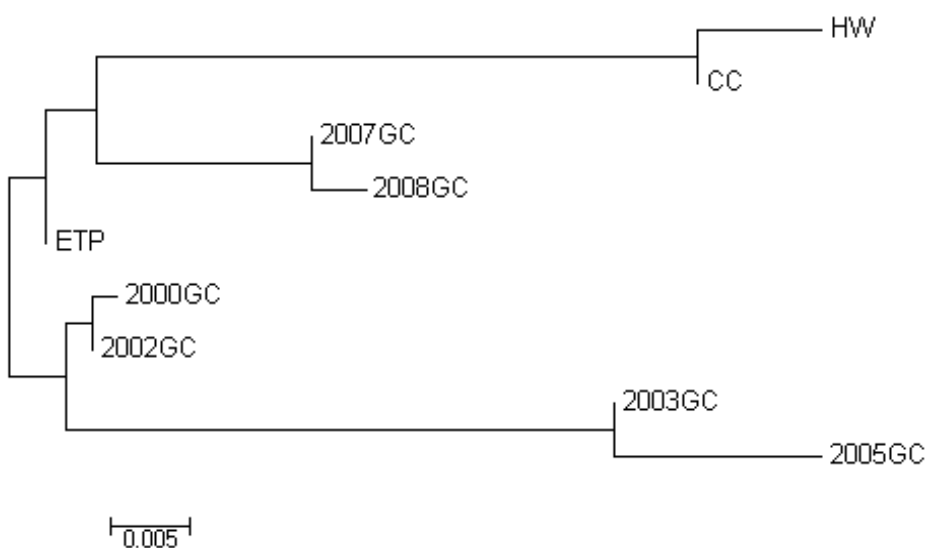


Figura 7. Similitud interanual entre las agregaciones de cachalote del Golfo de California y otras reportadas para el Pacífico (ver Mesnick *et al.* 2011). Donde (HW) Hawai, (CC) Corriente de California, (ETP) Pacífico Tropical Oriental y GC (Golfo de California). Los números que preceden a las letras indican el año. La topología se reconstruyó con base en la matriz de comparaciones pareadas del índice F_{ST} con base en las distancias genéticas a nivel del ADNmt.

6.2.3. Filogenia intraespecífica

La reconstrucción filogenética realizada con base en los haplotipos mitocondriales no mostró un claro patrón filogeográfico (Fig. 8, Apéndice 5). Al parecer, los cachalotes que usan el Golfo de California, forman agregaciones con individuos de diversos linajes maternos, independientemente de sus relaciones filogenéticas.

Cabe mencionar que el haplotipo Pmac02, que fue el más abundante dentro del Golfo de California, parece ser el causante de la mayor parte de las diferencias encontradas tanto en la escala espacial como en la temporal (ver Apéndice 6).

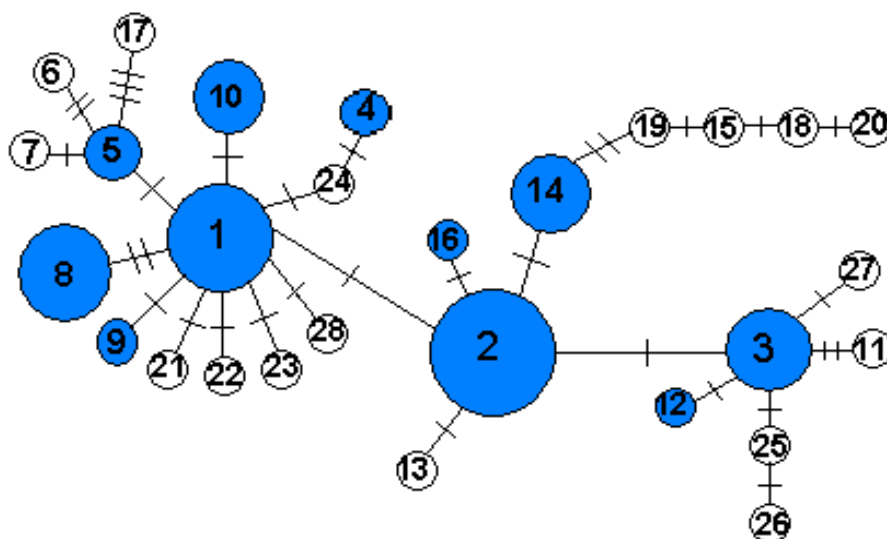


Figura 8. Red de la mínima expansión para los haplotipos mitocondriales de cachalote a nivel mundial. Cada círculo representa un haplotipo, el tamaño de los mismos indica la frecuencia y las líneas que los conectan reflejan la distancia genética entre ellos. Se indican en color azul aquellos haplotipos que fueron registrados para el Golfo de California en este trabajo.

6.3. Microsatélites

6.3.1. Diversidad genética

De los diez microsatélites que se emplearon, solo seis de ellos fueron seleccionados para efectuar los análisis. El microsatélite EV37 presentó problemas de amplificación y se descartó desde un principio, pero además, debido a que los loci EV01, DBLF17 y GATA417 no amplificaron en cerca del 50% de las muestras, se decidió excluirlos en análisis subsecuentes y usarlos solo para confirmar las similitudes entre muestras.

Una vez concluido el proceso de control de calidad, los genotipos *multilocus* quedaron integrados por la información alélica de 6 microsatélites (SW02, SW13, SW10, SW19, EV05 y GATA28). Asimismo, como se mencionó anteriormente, las muestras que mostraron patrones alélicos multilocus idénticos, fueron descartadas del análisis general, no sin antes hacer una revisión de los otros datos moleculares (sexo y haplotipo), así como de los datos de campo (fecha y zona de colecta). Una coincidencia en todos estos parámetros se consideró un fuerte indicio de la presencia de muestras repetidas. Finalmente, el número de muestras que se incluyeron para las estimaciones basadas en ADN nuclear fueron tan solo de 50.

Del análisis de control de calidad realizado con el programa MICRO-CHECKER, se identificó que el locus SW19 mostró evidencias de la presencia de alelos nulos (Tabla X). Sin embargo, debido al alto número de alelos de este

locus y a que el tamaño de la muestra se hubiera reducido de forma importante al excluir otro locus, se decidió no excluirlo del análisis.

Tabla X. Estadísticas descriptivas correspondientes al análisis de control de calidad del genotipado realizado con el programa MICRO-CHEKER.

Locus	Na	Alelos nulos	Drop out	Exceso de Homocigotos
SW19	17	Si	No	Si
SW13	13	No	No	No
SW10	12	No	No	No
EV05	9	No	No	No
GATA28	6	No	No	No
SW02	5	No	No	No
Promedio	10.3			

Las estimaciones del poder informativo y las probabilidades de identidad por locus para el conjunto de microsatélites empleados se presentan en las Tablas XI-XII. Dadas las frecuencias alélicas, se estimó una probabilidad de identidad de 5.13×10^{-8} , lo que representa que la probabilidad de que dos individuos sin parentesco exhiban genotipos idénticos es de 1 en 25 millones, mientras que la probabilidad de que dos hermanos completos presenten el mismo genotipo fue de 3.56×10^{-3} (1 de cada 280).

Tabla XI. Poder informativo y probabilidad de identidad para cada uno de los microsatélites empleados. Se indica el número de alelos (Na), la heterocigosidad observada (Ho) la probabilidad de identidad por locus (PI_{locus}) y la probabilidad de identidad acumulada por la adición sucesiva de cada locus ($PI_{multilocus}$).

Locus	Na	Ho	PI locus	PI multilocus
SW19	17	0.76	9.32 E-03	9.32 E-03
SW10	12	0.92	2.99 E-02	2.79 E-04
SW13	13	0.82	3.49 E-02	9.72 E-06
EV05	9	0.66	1.32 E-01	1.28 E-06
GATA28	6	0.68	1.63 E.01	2.08 E-07
SW02	5	0.62	2.01 E-01	4.18 E-08
Promedio	10.3	0.74		

Tabla XII. Diversidad genética nuclear para cada microsatélite. Se indica el número de alelos (na), el contenido informativo (PIC), la heterocigosidad esperada (He) y la heterocigosidad observada (Ho). Los loci que no cumplieron con las condiciones de equilibrio de Hardy-Weimberg se resaltan en negritas.

Locus	Na	PIC	He	Ho
SW19	17	0.90	0.92	0.76
SW13	13	0.82	0.85	0.82
SW10	12	0.84	0.86	0.92
EV05	9	0.63	0.68	0.66
GATA28	6	0.61	0.68	0.68
SW02	5	0.54	0.59	0.62
Promedio	10.3			0.74

El número promedio de alelos por locus fue de 10.3 y el promedio de la heterocigosidad fue de 0.74 para el conjunto completo de individuos analizados. La diversidad genética fue similar al considerar machos y hembras por separado, así como a nivel interanual (Tabla XIII).

Tabla XIII.- Diversidad génica nuclear de las agregaciones de cachalote del Golfo de California. Se indican el tamaño de muestra (n), el número promedio de alelos (na) y la heterocigosidad observada promedio (Ho).

	n	Na	Ho
Global	50	10.3	0.76 +/- 0.42
Sexos			
Hembras	41	9.6	0.76 +/- 0.42
Machos	9	6.7	0.80 +/- 0.46
Años			
2002	9	6.3	0.76 +/- 0.44
2003	11	5.5	0.74 +/- 0.43
2008	20	8.3	0.78 +/- 0.43
Años	40	6.7	0.76 +/- 0.43

6.3.2. Estructura genética

Para el caso de los marcadores microsatélites, las evaluaciones de diferenciación genética (AMOVA) se efectuaron usando como criterios de clasificación el sexo de los individuos, así como los años de muestreo. Debido al reducido tamaño de muestra, solo se usaron los años que presentaron los mayores números de individuos.

El análisis de estructura poblacional interanual dentro del Golfo de California resultó no significativo al usar, tanto las frecuencias alélicas ($F_{ST} = 0.001$, $p = 0.48$), como las distancias moleculares ($R_{ST} = 0.013$, $p = 0.45$). En ambos casos los resultados indican que no existen diferencias genéticas entre las agregaciones que usan el Golfo de California en distintos años.

A través del análisis gráfico multidimensional con base en las distancias genéticas de los genotipos multilocus individuales, se confirma la ausencia de estructura poblacional interanual, tanto por parte de los machos como de las hembras (Fig. 9).

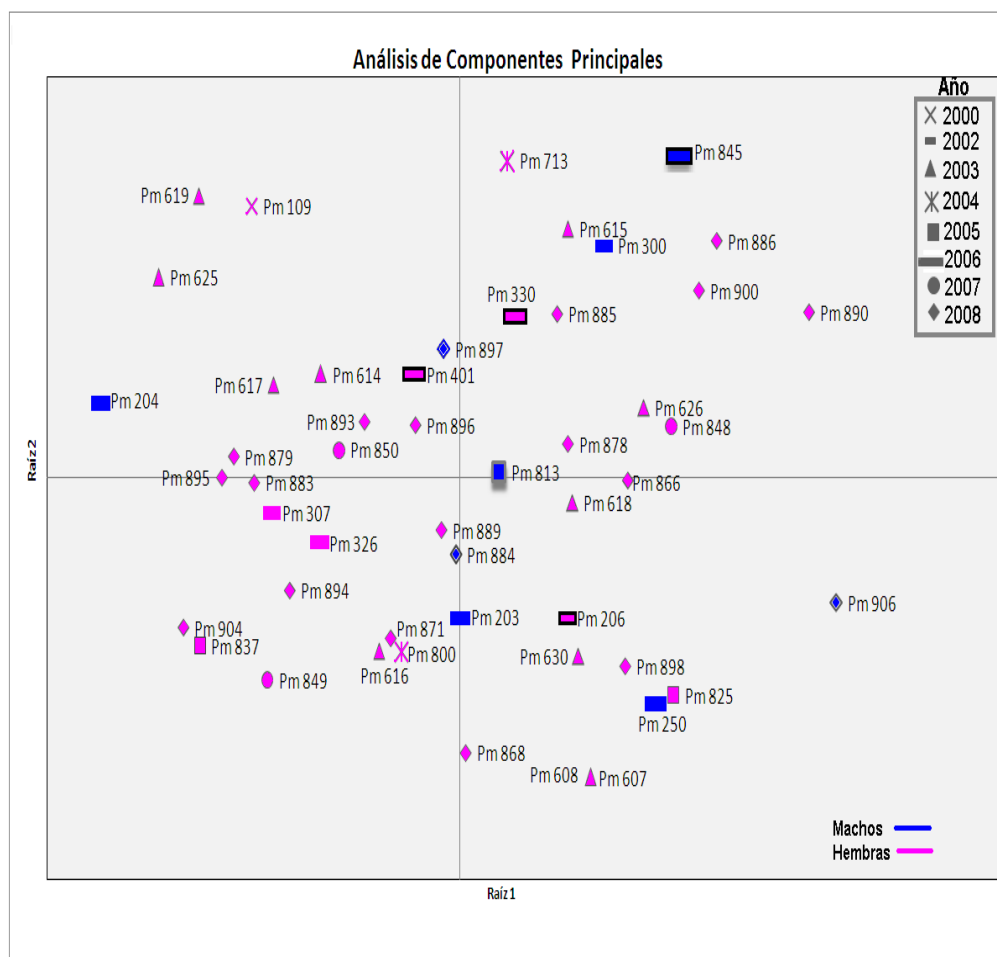


Figura 9. Análisis multidimensional de componentes principales (ACP) basado en las estimaciones de distancia genética de los genotipos individuales. Cada símbolo representa un año y el color el sexo. Los machos se indican en color azul y las hembras en color rosa.

Finalmente, la información obtenida con los microsatélites en el GC se comparó con la reportada recientemente por Mesnick y colaboradores (2011), análisis que resultó en diferencias no significativas entre las frecuencias alélicas ($F_{ST} = 0.0012$, $p=0.26$), pero significativo al considerar las distancias genéticas ($R_{ST} = 0.0235$ $p=0.01$).

Las comparaciones pareadas de los índices de diferenciación genética entre las distintas áreas del Pacífico y el GC se muestran en la Tabla XIV. De aquí se obtiene cierta evidencia que sugiere que las agregaciones con menor similitud a las del GC son aquellas de la porción central del Pacífico (Hawai).

Tabla XIV. Coeficientes de diferenciación genética que resultaron de la comparación con las diferentes agregaciones del Océano Pacífico reportadas por Mesnick y colaboradores (2011). En color rojo se indican las comparaciones con diferencias significativas. En la diagonal superior se reporta R_{ST} y en la diagonal inferior F_{ST} .

Población	Etiqueta	1	2	3	4
Hawai (HW)	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0529
Corriente de California (CC)	2	0.0010	0.0000	0.0036	0.0259
Pacífico Oriental Tropical (POT)	3	0.0009	0.0014	0.0000	0.0555
Golfo de California (GC)	4	0.0000	0.0000	0.0025	0.0000

7. DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo como objetivo el análisis de la identidad genética de los grupos de cachalotes observados en el GC, para lo cual se utilizaron marcadores genéticos neutrales, mitocondriales (dominio hipervariable I de la Región Control) y nucleares (microsatélites)

La información generada en este estudio se discute abordando en primera instancia los aspectos metodológicos para evaluar la confiabilidad y la resolución del conjunto de datos empleados. Posteriormente se discuten aspectos sobre la proporción de sexos, la diversidad genética y la influencia de la estructura social en la diferenciación genética dentro y entre de las poblaciones, todo esto a través de la comparación con los estudios realizados previamente con los dos marcadores moleculares. Por último, se discutirán brevemente las perspectivas de estudio para las agregaciones de la especie en el Golfo de California.

7.1. Aspectos metodológicos

Aún cuando los marcadores moleculares han demostrado ser altamente informativos para análisis de identificación y estructura genética (Godoy 2009), es necesario considerar ciertos aspectos sobre su nivel de certidumbre. El uso

de un número inadecuado de marcadores y un tamaño de muestra reducido o poco representativo, pueden generar resultados poco confiables y reducir el poder estadístico de las pruebas de estructura poblacional. Por lo anterior, antes de hacer alguna inferencia, es importante contrastar los resultados con los obtenidos previamente para la especie, en particular en el área donde se realiza el estudio.

Como se mencionó anteriormente, del total de 190 muestras solo en cerca de la mitad fue posible obtener la cantidad y la calidad de ADN suficientes para la asignación de los haplotipos maternos y la identificación molecular del sexo. La situación fue aún peor para el caso de los microsatélites, para los que solo se obtuvieron genotipos completos para 6 loci en el 25% de las muestras. Probablemente el tiempo y el tipo de preservación de las muestras) favorecieron la degradación del ADN (Engelhaupt *et al.* 2004). Algunas de las muestras fueron recolectadas hace más de 10 años, había una cantidad insuficiente de tejido y, en ocasiones, se encontraron muestras con volúmenes insuficientes de solución de preservación.

Pese a que el tamaño de muestra se redujo de forma importante, el número de muestras empleadas es equivalente, si no es que supera, al que se ha empleado en otros estudios (Lyrholm *et al.*; 1998, Engelhaupt *et al.* 2004).

Tomando esto en consideración y recordando las dificultades logísticas que limitan en gran medida el acceso a un mayor número de muestras de esta especie, así como la baja diversidad genética que exhibe la especie (Mesnick *et al.* 2011), los niveles de diversidad nucleotídica y el número de haplotipos mitocondriales, al igual que las frecuencias alélicas y los niveles de heterocigosidad, resultaron similares a los previamente descritos en la especie (Dillon 1996, Lyrholm *et al.* 1996, Richard *et al.* 1996, Lyrholm y Gyllesten 1998, Lyrholm *et al.*,1999, Mesnick 2001, Mesnick *et al.* 2011). Esto incluso al comparar las estimaciones de diversidad a nivel mitocondrial con el conjunto completo de muestras y el conjunto restringido de muestras (ver Apéndice 8), que al resultar similares nos sugiere que aún el menor tamaño de muestra empleado en el presente estudio, parece ser representativa de las variantes genéticas presentes en los cachalotes del Golfo de California.

Por su parte, los microsatélites empleados evidenciaron un alto poder informativo. Cuatro muestras asignadas a individuos distintos, exhibieron genotipos idénticos y dado que la probabilidad de encontrar dos individuos con el mismo genotipo resultó ser muy baja (ver Tabla XI), la revisión de los registros fotográficos y de la base de datos permitió confirmar que algunas de esas muestras en realidad pertenecían al mismo individuo. Esto permitió reducir una potencial fuente de sesgo de los análisis.

Finalmente, como se discute más adelante, los valores de diversidad genética mitocondria y nuclear concordaron con los que han sido descritos por otros autores para agregaciones del Pacífico. Esto de alguna manera refleja que, tanto el tamaño de muestra, así como el control de calidad tan cuidadoso que se realizó para la secuenciación y el genotipado (ver Pompanon *et al.* 2005, Morin *et al.* 2009), fue el adecuado y que la información obtenida en el presente trabajo es confiable.

7.2. Proporción de sexos

La presencia tanto de grupos de hembras con jóvenes y crías, así como de machos adultos de cachalote dentro del Golfo de California es bastante común (Gendron 2000, Jaquet y Gendron 2002). Aunque la proporción de hembras resultó cuatro veces mayor a la de los machos, estas diferencias coinciden con los reportado tanto dentro del GC como en otras zonas de latitudes templado tropicales, que corresponden a las que ocupan las hembras y los jóvenes de la especie (Rubio-Cisneros *et al.* 2006, Mesnick *et al.* 2009). Los cachalotes machos viajan distancias más amplias para buscar alimento que durante la temporada reproductiva (Hoelzel 2007), además de que durante las migraciones estivales los dos sexos se separan, hembras y crías no van más allá de los 40°- 50° grados de latitud (Rice, 1989^a).

Comparando la proporción de sexos obtenida en el presente trabajo, con la reportada por Mesnick y colaboradores (2011), esta fue similar a la ellos encuentran en el Pacífico Tropical Oriental (ETP), en donde 20% de los individuos fueron machos. En contraste, en la Corriente de California (CC) y las aguas adyacentes a Hawai (HW), estos autores reportaron un 40% de machos.

Por otro lado, dado que se reconoce que dentro de la compleja estructura social de los cachalotes, la unidad social más estable es la que forman los grupos de hembras y crías, incluyendo a algunos machos jóvenes (Christal y Whitehead 2001, Whitehead 2003). Esta mayor proporción de hembras podría explicar la estabilidad temporal que se ha observado los grupos de cachalotes dentro del Golfo (Rubalcava 2010)

Todo esto resulta relevante ya que, como se pudo observar en este estudio, existe cierta estructura en las agregaciones del Golfo de California. Por lo tanto, sin duda estas diferencias seguramente se encuentran mucho más relacionadas con las hembras que con los machos.

7.3. Diversidad e identidad genética

Aunque a nivel mundial se han encontrado 28 haplotipos mitocondriales en las poblaciones o agregaciones de cachalote (Lyrholm y Gyllesten 1998, Rubio-Cisneros *et al.* 2006, Mesnick *et al.* 2008), los estudios más recientes reportan tan solo 16 de estos haplotipos para la zona del Pacífico Oriental Tropical, Pacífico Central y la zona de la Corriente de California (Valdes *et al.* 2010, Mensick *et al.* 2011), así como 7 haplotipos para las zona del Golfo de Alaska y las Aleutianas (Moreno 2010). Con resultado del presente trabajo, en el Golfo de California se registraron al 70% de los linajes maternos que se conocen para el Pacífico Norte, por lo que es una de las zonas con el mayor número de haplotipos en el Océano Pacífico

Tanto a nivel mundial, como en la mayor parte de las agregaciones del Pacífico, los haplotipos más comunes son el "a" (Pmac01), "b" (Pmac02) y "c" (Pmac03), (Mesnick *et al.* 2005). Particularmente en las agregaciones del Pacífico, el haplotipo "a" representa a cerca de 40% de los individuos (Lyrholm y Gyllesten 1998, Moreno 2010, Mesnick *et al.* 2011). Resultó interesante que, aunque en el Pacífico Norte el haplotipo "b" es más común que en el Atlántico Norte y el Hemisferio Sur, aparentemente el GC se caracteriza por una frecuencia más alta del haplotipo "b" (ver Tabla Apéndice 3). Este es otro aspecto importante

que se discutirá un poco más adelante cuando se toquen aspectos sobre estructura genética.

Si bien en el Golfo de California existe un importante número de haplotipos, la diversidad nucleotídica fue muy baja (ver Tabla V), pero no distinta a la observada en estudios previos (Mesnick *et al.* 2009, Mesnick *et al.* 2011, Lyrholm y Gyllesten 1998). Esta baja diversidad se ha atribuido a un cuello de botella histórico en la población producto de las capturas comerciales (Lyrholm *et al.* 1996), como consecuencia de diferentes condiciones ambientales que pudieran haber promovido una amplia varianza en el éxito reproductivo de los linajes (Tiedemann y Milinkovitch 1999) o bien, debido a un “auto-stop” cultural en la especie por línea materna (Whitehead 1998). Este auto-stop cultural hace referencia a los sistemas sociales matrilineales (p.e. orcas y cachalotes) en los que la selección de rasgos culturales transmitidos por línea materna y que con el tiempo va dominado y moldeando la estructura genética de la población, reduciendo con ello la diversidad (Smith y Haigh 1974).

En contraste, la diversidad nuclear estimada a través de los microsatélites fue relativamente alta y muy similar a la estimada para otras agregaciones de cachalote a nivel mundial (Internacional Whaling Commission 1980). Tanto el número de alelos observado para cada uno de los microsatélites empleados en

este trabajo, así como las frecuencias de los mismos, coincidieron con los reportados para otras agregaciones del Pacífico. Aparentemente entonces, al menos a nivel del ADN nuclear, la identidad genética de los cachalotes que hacen uso del GC no es distinta a la de otras agregaciones.

A pesar de que Pinela y colaboradores (2009) sugieren que la alta diversidad genética y la ausencia de consanguinidad en los grupos de cachalotes pudiera indicar que la población se recupera de la caza comercial, se debe tomar en cuenta que la naturaleza del marcador genético influye de manera importante en la interpretación de las estimaciones de diversidad.

Las tasas mutacionales, así como la heredabilidad y la neutralidad de los microsatélites son distintas a las del ADNmt. Sin embargo, los resultados concuerdan con el hecho de que los fuertes lazos sociales entre los grupos de hembras y jóvenes, se reflejen en valores de diversidad nucleotídica mitocondrial relativamente bajos comparados con los de otras especies de cetáceos. Por su parte también, la mayor capacidad de dispersión de los machos de la especie les da el potencial de mantener el flujo de genes nucleares, lo que a su vez podría explicar la mayor diversidad a nivel nuclear.

7.4. Estructura genética a nivel mitocondrial

Estudios genéticos basados en herencia materna (ADNmt) han mostrado una diferenciación importante entre el hemisferio sur, el norte del Pacífico y el Atlántico Norte (Lyrholm y Gyllesten 1998, Lyrholm *et al.* 1999, Mesnick *et al.* 1999). Aunque muchos de estos trabajos han detectado niveles de variabilidad significativos entre las poblaciones de cachalote de diferentes cuencas oceánicas, también han encontrado poca evidencia de subdivisión dentro de las cuencas. Ciertas excepciones parecen ser el mar Mediterráneo (Drout *et al.* 2004), el Mar del Norte (Engelhaupt *et al.* 2009) y el Golfo de México (Dillon 1996); áreas que aparentemente representan entidades maternas discretas diferenciadas.

Comparando el trabajo que realizaron Lyrholm y Gyllesten (1988) en el Océano Pacífico con el presente estudio, se encontraron algunas diferencias entre las agregaciones que utilizan en GC y las de otras regiones. De acuerdo con dicha comparación, el Golfo de California mostró mayor similitud con el Pacífico Noroccidental que con la región del Pacífico Nororiental y las Islas Galápagos, contrastando con las evidencias de conectividad obtenidas mediante foto-recapturas (Jaquet y Gendron 2002).

En contraste, de la comparación con el estudio reciente de Mesnick y colaboradores (2011), quienes muestrearon una amplia área geográfica que comprende el Pacífico Oriental Tropical , Hawaii y la Corriente de California, las agregaciones del GC resultaron más similares a las del Pacífico Oriental Tropical. Esta relación es la que se esperaría encontrar dadas las evidencias de los estudios de foto-identificación arriba mencionados.

En conjunto, las comparaciones con estudios previos resultan contradictorias. Una posible explicación para estas diferencias pudiera estar asociada con el tipo de muestreo y el tamaño de muestra. En su estudio Lyrholm y Gyllesten (1998) muestrearon diversas regiones del Pacífico, pero sus tamaños de muestra son relativamente pequeños comparados a los empleados por Mesnick y colaboradores (*op. cit.*), así como en el presente trabajo, en los que se muestrearon regiones menos amplias.

Sin embargo, otra posible explicación la aportan los análisis de estructura poblacional interanual que se efectuaron dentro del GC (ver Tablas VII y IX, Figs. 6 y 8). Aparentemente, a una escala interanual, grupos de distintas áreas geográficas podrían estar ocupando el GC en diferentes momentos; tal y como lo sugiere el hecho de que las agregaciones del GC correspondientes al 2003 presentaran mayor similitud con las agregaciones de Galápagos, mientras que

las de 2002 una mayor relación con las agregaciones del Pacífico Noroccidental y las de 2007 y 2008 con las de Hawai o el estrato de la Corriente de California.

7.5. Estructura genética a nivel nuclear

El uso de los marcadores nucleares microsatélites no aportó evidencia de diferenciación entre las agregaciones del GC a una escala interanual, sin embargo si se detectaron ciertas diferencias al comparar con otras agregaciones del Pacífico. Aunque este resultado debe manejarse con cautela al estar basado en tamaño de muestra, mucho menor al que se ha empleado en otros estudios (ver Apéndice 3), concuerda con los resultados de estudios previos en las agregaciones del Pacífico (Mesnick *et al.* 2009, 2011), en el que la agregación con la menor conectividad genética parece ser la de la porción central del Pacífico (Hawai).

Estos patrones se han explicado con base en el hecho de que los movimientos intra-oceánico aparentemente son más frecuentes en los machos y de que solo estos tienen el potencial de realizar movimientos inter-oceánicos (Lyrholm *et al.* 1999), lo que mantiene cierto nivel de homogeneidad genética intra-oceánica

7.6. Consideraciones finales

Hay diversos factores que complican el estudio de la estructura genética de los cachalotes, entre ellos el tamaño de muestra, la diversidad haplotípica baja y la proporción sexual sesgada hacia las hembras, lo que resulta en un patrón parcial de la dispersión de los genes que dificulta la determinación de la estructura social y poblacional.

En 1996, Richard y colaboradores sugirieron que manadas matrilineales están estructuradas en latitudes bajas. En la actualidad, no hay evidencia genética de unidades o grupos formados estrictamente por un solo linaje materno, la información que se ha obtenido indica que los grupos de hembras e inmaduros contienen generalmente más de un linaje; tanto en los "grupos sociales" como en las "unidades sociales" hay animales estrechamente relacionados, pero también individuos que no presentan relaciones cercanas de parentesco (Whitehead 2003). Por otra parte, los machos migran grandes distancias entre las zonas de reproducción y las áreas de alimentación (Stevick *et al.* 2002), pero hasta la fecha no se ha identificado una zona de migración.

Tomando en cuenta estos aspectos, a la luz de las evidencias que aportan tanto el presente estudio como otros estudios genéticos, al parecer las agregaciones

de regiones templado-tropicales en las que se congregan principalmente hembras e individuos jóvenes, son las que tienen mayor influencia en el establecimiento de la estructura genética. No obstante, como recientemente se ha sugerido que el clan vocal es un factor de peso en la formación de la estructura genética y geográfica de las especies de cetáceos altamente sociales (Rendell *et al.* 2005, Mesnick *et al.* 2008). Mesnick y colaboradores (2008) examinaron la variación del ADNmt entre clanes vocales de cachalotes en tres grandes áreas del Pacífico (Chile / Perú, las Galápagos / Ecuador, y el Sudoeste del Pacífico), encontrando que los dialectos acústicos están estrechamente relacionados con la identidad y la estructura genética de estas agregaciones.

En el Golfo de California se han identificados al menos tres tipos de codas en diferentes agregaciones de hembras, crías y jóvenes (Álvarez 2006). Es posible entonces que las diferencias genéticas observadas en las agregaciones de esta zona, pudieran estar asociadas a algunos de estos clanes vocales. Esta hipótesis toma más fuerza si se considera que también existen distintas señales isotópicas de C y N, lo que refleja una variación en los hábitos alimenticios que ingresan al Golfo de California (Guerrero de la Rosa 2008).

Es por ello que el siguiente paso lógico en el estudio de la estructura social de esta especie en el Golfo de California, debe estar orientado a buscar la correlación entre los repertorios de codas y la identidad genética de las agregaciones interanuales. De esta forma, se podrá establecer con mayor detalle la conectividad entre los grupos sociales y la influencia de estos en la estructura genética de sus poblaciones.

Por otro lado, la ausencia de estructura evidenciada por los marcadores nucleares, así como el hecho de que varios de los microsatélites analizados se encontraran fuera de equilibrio, sugiere que podría existir un fuerte componente migratorio, selección o una intensa deriva genética en estas agregaciones (ver Pepin *et al.* 1995).

En el GC usualmente se observan más hembras, por lo que este sesgo en el muestreo no permite inferir la influencia que tienen en la estructura genética los movimientos migratorios de los machos adultos que visitan el GC. Aunque de acuerdo con Moreno (2010) los machos adultos de la región del Pacífico Norte provienen, en igual proporción, de las diferentes agregaciones de aguas templado-tropicales, se desconoce si particularmente los machos adultos que visitan el GC provienen todos de las agregaciones del Pacífico Norte. Entonces, uno de los aspectos importantes por resolver es la influencia de estos machos en la estructura social y genética de las agregaciones de cachalote en el GC.

Considerando la alta frecuencia de grupos en los que se observan crías, esta zona quizá represente un lugar ideal para estudiar las relaciones de parentesco entre los machos adultos y las crías de año o de temporadas anteriores.

Estas perspectivas de estudios futuros, permitirán conocer si las agregaciones de cachalote que usan en diferentes años el GC, representan no solo un hábitat crítico para la conservación del cachalote por representar no sólo una zona de crianza y de refugio, sino también el hábitat invernal de los reproductores.

8.- CONCLUSIONES

El ADNmt evidenció cierto nivel de estructura poblacional que, dada su herencia matrilineal, probablemente sea reflejo de los movimientos más limitados de los grupos de hembras y jóvenes.

En contraste, el marcador de ADN nuclear (microsatélites) no aportó evidencia tan clara de estructura entre las agregaciones del Golfo de California y otras zonas del Pacífico Norte. La naturaleza biparental de este marcador y la alta capacidad de dispersión de los machos adultos, puede ser la causa de tal escenario.

Con los resultados obtenidos con ADNmt se sugiere que aparentemente, grupos de cachalote provenientes de diferentes zonas de agregación del Océano Pacífico, usan el Golfo de California en distintos años.

En el Golfo de California es usado por el 70% de los linajes maternos que se han reportado en las agregaciones del Pacífico, representando una de las zonas con el mayor número de haplotipos de dicho océano. Asimismo, estos

linajes representan al 39% de los haplotipos a nivel mundial, lo que resalta la importancia de la zona para la conservación de la diversidad genética de la especie.

9.- LITERATURA CITADA

- Aranguren-Méndez, J.A., R. Román-Bravo, W. Isea-Villasmil, Y. Villasmil y J. Jordana (2004). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *ALPA* 13(1): 30-42.
- Atler, S.E., E Rynes y S.R. Palumbi. (2007). DNA evidence for historic population size and past ecosystem impacts of gray whales. *PNAS* 104(38): 15162-15167.
- Aljanabi, S.M. e I. Martínez. (1997). Universal and rapid sald-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl. Ac. Res.* 25(22):4692–4693.
- Altherr, S., Block K. y S. Fisher. (2005). The RMS - A Question of Confidence: Manipulations and Falsifications in Whaling". Consulta 2010-5-19 (http://www.wdcs.org/submissions_bin/rmsreview.pdf)
- Álvarez-Torres, A. M. (2006). Distinción de clanes de cachalote (*Physeter macrocephalus*) en el Golfo de California, mediante comparación de repertorios de codas. *CICIMAR-IPN*. Tesis de Maestría. 92 pp.
- Avise, J.C. (1994). Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman y Hall. USA, 511.
- Avise, J.C. (2000). Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press. London, 458.
- Avise, J.C., A.G. Jones, D. Walker, J.A. DeWoody, B. Dakin, A. Fiumera, D. Fletcher, M. Mackiewicz, D. Pearse, B. Porter y S. D. Wilkins. (2002). Genetic mating systems and reproductive natural histories of

fishes: lessons for ecology and evolution. *Annu. Rev. of Gen.* 36:19-45.

Baker, C.S. y P.J. Clapham. (2004). Modelling the past and future of whales and whaling. *Trends. Ecol. Evol.* 19:365–371.

Barrera G.J.E., Parra M. del P., A.J. Vaca, H. Licón y L. Findley. (2004). Prioridades de Conservación para el Golfo de California. World Wildlife Fund México, Programa Golfo de California, México. 70 pp.

Bazin, E., S. Glemin y N. Galtier. (2006). Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animal. *Sci.* 312:570-571.

Bérube, M. y P. Palsbøll. (1996). Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Mol. Ecol.* 5:283–287.

Bonner, W. N. (1982). Seals and Man: A Study of Interactions. University of Washington Press, Seattle. 170 pp.

Bond, J. (1999). Genetic Analysis of the Sperm Whale Using Microsatellites. Ph.D. Thesis University of Cambridge. Cambridge, U.K.

Bray, N. A. (1988). Water mass formation in the Gulf of California, *J. Geophys. Res.*, 93, 9223-9240.

Coskun, P.E., E.E. Ruiz-Pesini, y D.C. Wallace. (2003). Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2174–2176.

Christal, J., H. Whitehead y E. Lettevall. (1998). Sperm whale social units: variation and change. *Can. J. Zool.* 76: 1431-1440.

- Davis, L. R. Gallman y K. Gleiter. (1997). In Pursuit of Leviathan: Technology, Institutions, Productivity, and Profits in American Whaling, 1816-1906 (National Bureau of Economic Research Series on Long-Term Factors in Economic Dev). University of Chicago Press. 135.
- Davis, R. W., G.S. Fargion, N. May, T.D. Leming TD, M. Baumgartner, W.E. Evans, L.J. Hansen y A. K. Mullin. (1998). Physical habitat of cetaceans along the continental slope in the northcentral and western Gulf of Mexico. *Mar Mamm Sci* 14:490-507.
- Dillon, M. C. (1996). Genetic structure of sperm whale populations assessed by mitochondrial DNA sequence variation. PhD Thesis. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia.
- Drout, V. (2003). Ecology of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) in the Mediterranean Sea. PhD Thesis, University of Wales, Bangor.
- Drout, V., M. Bérubé, A. Gannier, J.C. Gould, R.J. Reid, y P.J. Palsbøll. (2004) A note on genetic isolation of Mediterranean sperm whale, *Physeter macrocephalus*, suggested by mitochondrial DNA. *J. Cetac. Res. Manage.* 6:29-32.
- Dufault, S y H. Whitehead. (1998). Regional and group-level differences in fluke markings and notches of sperm whales. *J. Mammal.*, 79, 514–520.
- Donovan, G.P. (1991). A review of IWC stock boundaries. 39-68. En: Hoelzel A. R. (ed.) *Rep. int. Whal. Commn, Vol.* Report of the International Whaling Commission (Special Issue 13). International Whaling Commission, Cambridge.
- Excoffier L., G. Laval y S. Schneider. (2005). Arlequin v3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1:47-50.

- Engelhaupt, D.T. (2004) Phylogeography, kinship and molecular ecology of sperm whales (*Physeter macrocephalus*). PhD Thesis, University of Durham.
- Engelhaupt, D.T., A.R. Hoelzel, C. Nicholson, A. Frantzis, S. Mesnick, S. Gero, H. Whitehead, L. Rendell, P. Miller, R. De Stefanis, A. Cañadas, S. Airoidi, y A.A. Mignucci-Giannoni. (2009). Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine species, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Mol. Ecol.* 18:4193-4205.
- Enríquez-Paredes, L.M. (2005). Identidad Genética de la Población de Ballena Azul (*Balaenoptera musculus*) en el Pacífico Nororiental: Agregaciones Mexicanas. Tesis de Doctorado. UABC. 198.
- Estes, J. (2006). Whales, Whaling, and Ocean Ecosystems. University of California Press .ISBN 0520248848,179.
- Fernández-Casado, M. (2000). El cachalote (*Physeter macrocephalus*). España. *Galemys* 12 (2). 3-22.
- Gendron, D. (2000). Familiy Physeteridae. En: Mamíferos del Noroeste de México II. Segundo volumen. En: Álvarez Castañeda S. T. y J.L. Patton. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.C. La Paz, Baja California Sur, México. 639-641.
- Gendron, D. y S.L. Mesnick. (2001). Sloughed Skin: a Method for the Systematic Collection of Tissue Samples from Baja California Blue Whales. *J. Cetac. Res. Manage.* 3:77-79.
- Godoy, J. A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18 (1): 23-33.

- Goldstein, B.D. y C. Schlotterer. (1999). *Microsatellites evolution and applications*. Oxford University Press, New York, 352. En. Aranguren-Méndez J.A., R. Román-Bravo, W. Isea, y J. Villasmil. (2004). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión). *ALPA*, 13(1): 30-42.
- Gordon, J.C.D. (1987). Sperm whale groups and social behavior observed off Sri Lanka. *Rep. Int. Whal. Comm.* 37: 205–217.
- Guerrero de la Rosa, F. (2006). Análisis de la frecuencia y tipos de marcas en la aleta caudal de cachalotes del Golfo de México. Tesis de Licenciatura. UABCS. 54.
- Guerrero de la Rosa, F. (2008). Variación de la dieta de los cachalotes del Golfo de California con base en Isótopos estables de Carbono y Nitrógeno. Tesis de maestría, IPN, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 84.
- Hoelzel, A.R., Potter, W. Charles y P.B. Best. (1998). Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' populations of the bottlenose dolphin. *Proc. Roy. Soc. Lond. A.* 265(1402):1177–1183.
- Hoelzel, A.R, J. Hey, M.E. Dahlheim, C. Nicholson, V. Burkanov y N. Black. (2007). Evolution of population structure in a highly social top predator, the killer whale. *Mol. Ecol. Evol.*, 24, 1407–1415.
- INEGI. (1999). Estadísticas del medio ambiente, Tomo I y II. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México.
- International Whaling Commission. (1980). Report of the special meeting on Sperm Whale Assessments, La Jolla. *Rep. Int. Whal. Commn.* (Special Issue) 2:107-36.

- Jaquet, N. D. Gendron, y A. Coakes. (2003). Sperm whales in the Gulf of California : Residency, movements, behavior, and the possible influence of variation in food supply. *Mar. Mamm. Sci.* 19(3): 545-562.
- Jaquet, N. y D. Gendron. (2002). Distribution and relative abundance of sperm whales in relation to key environmental features, squid landings and the distribution of other cetacean species in the Gulf of California, Mexico. *Mar. Biol.* 141(3): 591-601.
- Lavín, M. F., G. Gaxiola-Castro y J. M. Robles (1995). Winter water masses and nutrients in the northern Gulf of California. *J. Geophys. Res.* 100, 8587-8605.
- Leatherwood, S., R.R. Reeves, W.F. Perrin y W.E. Evans. (1988). Whales, dolphins and porpoises of the eastern north pacific and adjacent arctic waters. Dover Publications, Inc., New York. 245.
- LeDuc, R.G., D.W. Weller, J. Hyde, A.M. Burdin, P.E. Rosel, R.L. Brownell, B. Wursig y A.E. Dizon. (2002). Genetic differences between western and eastern gray whales (*Eschrichtius robustus*). *J. Cetac. Res. Manage.* 4:1-5.
- Lettevall, E., C. Richter, N. Jaque, E. Slooten, S. Dawson, y H. Whitehead. (2002). Social structure and residency in aggregations of male sperm whales. *Can. J. Zool.* 80:1189-1196.
- Lyrholm, T., O. Leima y U. Gyllensten. (1996). Low diversity and biased substitution patterns in the mitochondrial DNA control region of the sperm whales: implications for estimates of time since common ancestry. *Mol. Biol. Evol.* 13: 1318-1326.

- Lyrholm, T. y U. Gyllensten (1998). Global matrilineal population structure in sperm whales as indicated by mitochondrial DNA sequences. *Proc. Roy. Soc. Lond. A.* 265, 1679–1684.
- Lyrholm, T, O. Leimar, B. Johanneson y U. Gyllensten (1999). Sex-biased dispersal in sperm whales: contrasting mitochondrial and nuclear genetic structure of global populations. *Proc. Roy. Soc. Lond. A.* 266, 347–354.
- Smith M.J. y J. Haigh (1974). The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet. Res.* 23:23-35.
- Mesnick, S.L. (2001). Genetic Relatedness in Sperm Whales: Evidence and Cultural Implications. *Behav. Brain. Sci.* 24(2):346-347.
- Mesnick, S.L., P. J. Clapham y A. E. Dizon. (1999). The Collection of Associated Behavioral Data with Biopsy Samples during Cetacean Assessment Cruises. *J. Cetac. Res. Manage.* 1(2): 205-211.
- Mesnick S. L., D. Engelhaupt, T. Lyrholm, B. L. Taylor, y S. Escorza-Trevino. (2005). Population structure and the social animal: global genetic differentiation in sperm whales. Working Paper CARP/PS&M/I at the Cachalot Assessment Research Planning (CARP) Workshop, 1-3 March 2005, Woods Hole, MA.
- Mesnick, S.L., K. Evans, B.L. Taylor, J. Hyde, S. Escorza-Trevino, and A.E. Dizon. (2003). Sperm Whale Social Structure: Why it Takes a Village to Raise a Child. 170–174, In, *Animal Social Complexity: Intelligence, Culture and Individualized Societies* (F.B.M. de Waal and P.L. Tyack, eds.). Harvard Univ. Press.

- Mesnick, S. L., B. L. Taylor, R. G. Le Duc, S. Escorza-Treviño, G. M. O'Corry-Crowe y A. E. Dizon (1999). Culture and Genetic Evolution in Whales. *Sci.* 284, 2055. DOI: 10.1126.
- Mesnick, S. L., Morin, A. Phillip; S. Escorza-Treviño, K.M. Robertson, V. L. Pease, B. Hancock, B. L. Taylor y B. Louise (2009). Sperm whale stock structure in the Eastern North Pacific: Male-mediated gene flow or low statistical power? 18th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Québec, Canadá..
- Mesnick, S.L., B.L. Taylor, F.I. Archer, K.K. Martien, W. Escorza Trevino, B.L., Hancock-Hanser, S.C. Moreno Medina, V.L., Pease, K.M. Robertson, J.M. Straley, R.W. Baird, J. Calambokidis, G.S Schorr, P. Wade, V Burkanov, C.R. Lunsford, L. Rendell y P.A. Morin (2011). Sperm whale population structure in the eastern and central North Pacific inferred by the use of single nucleotide polymorphisms (SNPs), microsatellites and mitochondrial DNA. *Mol. Ecol. Res.* 11 (Supplement 1): 278–298.
- Meyers, L.A. y J.J. Bull. (2002). Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. *Trends Ecol. Evol* 17:551–557.
- Moreno-Medina, S.C. (2010). Niveles de parentesco entre Cachalotes machos adultos del Pacífico Norte (*Physeter macrocephalus*) y su relación con la transmisión del comportamiento de depredación sobre palangres. Tesis de maestría UABC. 109.
- Morin, P.A., C. Manaster, S. L. Mesnick y R. Holland (2009). Normalization and binning of historical and multi-source microsatellite data; overcoming the problems of allele size shift with ALLELOGRAM. *Mol. Ecol. Res.* (9):1451-1455.

- Park, S.D.E.(2008). Trypanotolerance in west african cattle and the population genetic effects of selection. Tesis de doctorado. University of Dublin.
- Palsbøll, P.J., P.J. Clapham, D.K. Matila, F. Larsen, R. Sears, H.R. 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. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*116: 1-10.
- Peakall, R. y P.E. Smouse. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. N.* 6: 288-295.
- Pepin, L., A. Amigues, J. L. Lepingle, A. Berthier, Bensaid y. D. Vaiman. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *Bostaurus* (cattle), *Capra-hircus* (goat) and related species -examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity*, 74: 53-61.
- Perry, S.L., D.P. DeMaster y G. Silber. (1999). The great whales: history and status of six species listed as endangered under the U.S. Endangered Species Act of 1973. *Mar. Fish. Rev.* 61(1): 1-74.
- Pinela. A. M., S. S. Quéroutil, M. Magalhaes, A. Silva, R. Prieto, J. A Matos y R. S. Santos. (2009). Population genetics and social organization of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) in the Azores inferred by microsatellite analyses. *Can. J. Zool.* 87 , 802-813.
- Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain y P. Taberlet. (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Rev. Gen.* 6: 847-859..
- Reeves, R.R., P.J. Clapham, R.L. Brownell y G.K. Silber. (1998). Recovery plan for the blue whale (*Balaenoptera musculus*). National Marine Fisheries Service. 42.

- Rendell, L., S. L. Mesnick, J. Burtenshaw, M. Dalebout, y H. Whitehead. (2005). Assessing Genetic Differentiation among Vocal Clans of Sperm Whales, Working Paper CARP/PS&M/2 at the Cachalot Assessment Research Planning (CARP) Workshop, 1-3, Woods Hole, MA.
- Rice, D.W. (1989a). Sperm whale-*Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758. In: Handbook of Marine Mammals, Vol. 4 (eds Ridgway SH, Harrison R), Academic Press, London. 177–233
- Richard, K.R., M.C. Dillon, H. Whitehead y J.M. Wright. (1996a). Patterns of kinship in groups of free-living sperm whales (*Physeter macrocephalus*) revealed by multiple molecular genetics analyses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 8792-8795.
- Richard, K.R., H. Whitehead, y J.M. Wright, (1996b). Polymorphic microsatellites from sperm whales and their use in the genetic identification of individuals from naturally sloughed pieces of skin. *Mol. Ecol.* 5: 313-315.
- Roman, J. y S.R. Palumbi. (2003). Whales before whaling in the North Atlantic. *Science*. 301:508 – 510.
- Rooney, A.P., R.L. Honeycutt, J.N. Derr. (2001). Historical population size change of bowhead whales inferred from DNA sequence polymorphism data. *Evolution*. 55(8):1678 – 1685.
- Rubio-Cisneros, N, S. Mesnick, R. Vasquez-Juarez, J. Urban Ramirez, C. Godard, R. Payne. (2006). Genetic sex determination supports the Gulf of California as an important habitat for sperm whales (*Physeter macrocephalus*). *Lat Ame. J. Aquat, Mamm.* 5(2):125–128

- Ruvalcaba, M.C., F. Guerrero de la Rosa y D. Gendron (2010) Resúmenes de la XXXII Reunión Internacional para el estudio de los Mamíferos Marinos. SOMEMMA. Xalapa, Ver.
- Schneider, S., D. Roessly y L. Excofier. (2000). ARLEQUIN v 2.0. A Software for Population Genetic Analysis. Genetic and Biometry Laboratory. University of Genove, Switzerland.
- Schramm, Y. (2002). Estructura genética y fitogeografía del Lobo marino de California (*Zalophus californianus*), en aguas adyacentes a la Península de Baja California, México. Tesis Doctoral. UABC.
- SEMARNAP (2000). Norma Oficial Mexicana NOM-131-ECOL-1998. (publicada en el D.O.F. el 10 de enero de 2000).
- Selkoe, K. y R.J. Toonen. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Let.* 9: 615-629.
- Stafford, K.M., S.L. Niekirk y C.G. Fox. (2001). Geographical and seasonal variation of blue whalecalls in the North Pacific. *J. Cetac. Res. Manage.* 3: 65-76.
- Stevick, P., B. McConell y P. Hammond. (2002). Patterns of movements. En: Hoelzel A.R. (2002). *Marine Mammal Biology: An Evolutionary Approach*. Blackwell Science, Oxford; 185-216.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15: 199-203.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

- Taylor, B.L., R. Baird, J. Barlow, S.M. Dawson, J. Ford, J.G. Mead, G. Notarbartolo di Sciara, P. Wade, R.L. Pitman (2008) *Physeter macrocephalus*. En: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. <www.iucnredlist.org>.
- Tiedemann, R. y M. Milinkovitch. (1999). Culture and genetic evolution in whales. *Science* 284, 2055a.
- Tomilin, A.G. (1957). Mammals of the U.S.S.R. and adjacent countries. Vol. IX. Cetacea. Israel program for Scientific Translations, Jerusalem.
- Torres Orozco, E. (1993). Análisis Volumétrico de las masas de agua del Golfo de California. Tesis de maestría. CICESE, Ensenada, B.C, México, 80.
- Valdes, M.P., S.C. Moreno-Medina, L.M. Enríquez-Paredes y D. Gendron. (2010). Identidad y diversidad genética de las agregaciones de cachalote (*Physeter macrocephalus*) en el Golfo de California. XXXII Reunión Internacional para el estudio de los Mamíferos Marinos. SOMEMMA. Xalapa, Ver.
- Valière N. (2002). GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Mol. Ecol. N.* 2: 377-379.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson y P. Shipley. (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. N.* 4: 535-538.
- Valsecchi, E y W. Amos. (1996). Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Mol. Ecol.* 5(1): 151-156.
- Whitehead, H. (1993). The behavior of mature male sperm whales on the Galapagos breeding grounds. *Can. J. Zool.* 71, 689–699.

- Whitehead, H. (2002). Estimates of the current global population size and historical trajectory for sperm whales. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 242:295-304.
- Whitehead, H (2003a). Sperm Whale Societies; Social Evolution in the Ocean. University of Chicago Press, Chicago, IL. 431
- Whitehead, H, M. Dillon, S. Dufault, L. Weilgart, J. Wright (1998) Non-geographically based population structure of South Pacific sperm whales: dialects, fluke-markings, and genetics. *J. Anil. Ecol.*, 67, 253–262.
- Whitehead, H., y B. Kahn. (1992). Temporal and geographical variation in the social structure of female sperm whales. *Can. J. Zool.* 70: 2145-2149.
- Whitehead, H. y S. L. Mesnick. (2003). Population structure and movements: genetic, acoustics and marks. Working paper SC/55/O14 at the 55th Annual Meeting of the International Whaling Commission. Berlin.
- Whitehead, H y L. Weilgart. (2000) The sperm whale: social females and roving males. En: Mann J, R. Connor, P. Tyack, .Whitehead (2000), Cetacean Societies University of Chicago Press, Chicago, IL. 154–172.
- Zavala-Hernández, V., D. Gendron y N. Jaquet. (2004). Diferenciación de grupos de cachalotes del Golfo de California por los tipos de marcas en las aletas caudales. Resúmenes XXIX Reunión Internacional para el estudio de los Mamíferos Marinos. La Paz, B.C.S., México.

Apéndice 1

Condiciones de amplificación por PCR del dominio hipervariable I de la región control mitocondrial y de los genes ZFX-ZFY para la identificación molecular del sexo.

Región amplificada	Tamaño del amplicon	Cebadores	Referencia
dHvI-RC-mt	863 pb	Tro (5'- CCTCCCTAAGACTCAAGGAAG3')	LeDuc et al. (1997)
		PmL 863 (5'- CCTGAGAATTGCAACTAGAGG-3')	(SWFSC)
ZFX/ZFY	328 pb ZFX	ZFXY 0582 (5'- ATAGGTCTGCAGACTCTTCTA-3')	Bérubé y Palsboll (1996)
	254 pb ZFY	ZFXY 0785 (5'- CACTTATGGGGGTAGTCCTTT-3')	
		ZFY 0752 (5'- ATTACATGTCGTTTCAAATCA-3')	

El perfil de temperaturas empleadas para la amplificación de ambos marcadores fue el siguiente: Desnaturalización inicial por 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificación con 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineación a 51°C, 1 min de extensión de la cadena a 70°C. Por último, un ciclo de 5 min a 70°C de extensión para permitir la extensión completa de los productos de PCR.

Apéndice 2

Ciclos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para cada microsatélite.

Para el caso del perfil de temperaturas “MICROGCM”, el programa consistió de 2 min de desnaturalización inicial a 94°C seguido de veinte ciclos de 10 seg a 96°C, 10 seg T°C1 y 15 seg a 72°C para desnaturalización, alineación y extensión respectivamente; esto por 25; una segunda sección de 8 ciclos de 10 seg a 95°C, 10seg a T°C2 y 15 seg a 72°C, para finalizar con una extensión de 15 min a 70°C.

Por su parte, el perfil “MICPMAC” consistió en una desnaturalización inicial a 97°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 20 s a 90°C, 1 min a T°C1 y 1 min a 72°C; adicionando por último un ciclo de extensión de 15 min a 70°C.

Apéndice 3

Resumen de los datos moleculares obtenidos para las muestras de piel de cachalote, propiedad del CICIMAR-IPN, que fueron analizadas en el presente estudio.

Conteo	Año	Muestra	Fuente	SWFSC	UABC	Sexo
1	1998	Pm 300*	D	B	2	M
2	1998	Pm 305	D	B	2	F
3	2000	Pm C97	D	B	2	F
4	2000	Pm 102	D	A	1	F
5	2000	Pm 103	D	B	2	F
6	2000	Pm 109*	D	B	2	F
7	2000	Pm 121	D	A	1	M
8	2001	Pm 201	D	A	1	F
9	2002	Pm 203*	D	H	1	M
10	2002	Pm 204*	D	A	1	M
11	2002	Pm 228*	B	H	8	F
12	2002	Pm 250*	DI	A	1	M
13	2002	Pm 256b	B	A	1	M
14	2002	Pm 307*	D	B	2	F
15	2002	Pm 308	D	B	2	F
16	2002	Pm 322	D	A	1	F
17	2002	Pm 323	D	D	4	U
18	2002	Pm 325	D	B	2	F
19	2002	Pm 326*	D	B	2	F
20	2002	Pm 327	D	C	3	F
21	2002	Pm 328	D	C	3	F
22	2002	Pm 330*	D	C	3	F
23	2002	Pm 332	D	C	3	F
24	2002	Pm 333	D	I	9	F
25	2002	Pm 401*	D	D	4	F
26	2002	Pm 418	D	P	16	F
27	2002	Pm 419	D	B	2	F
28	2002	Pm 428b	D	A	1	F
29	2002	Pm 502a	D	B	2	F
30	2002	Pm 506	D	B	2	F
31	2002	Pm 536	D	B	2	F
32	2002	Pm 537	B	A	1	F
33	2002	Pm 540	D	A	1	F
34	2002	Pm 543	B	B	2	F
35	2002	Pm 549	D	I	9	F
36	2002	Pm 551	D	C	3	F

Conteo	Año	Muestra	Fuente	SWFSC	UABC	Sexo
37	2002	Pm 566	D	A	1	F
38	2002	Pm 602	D	B	2	F
39	2003	Pm 604	D	B	2	F
40	2003	Pm 607*	D	A	1	F
41	2003	Pm 608*	D	A	1	F
42	2003	Pm 613	D	B	2	F
43	2003	Pm 614*	D	N	14	F
44	2003	Pm 615*	D	N	14	F
45	2003	Pm 616*	D	B	2	F
46	2003	Pm 617*	D	L	12	F
47	2003	Pm 618*	D	I	9	F
48	2003	Pm 619*	D	A	1	F
49	2003	Pm 621	D	A	1	F
50	2003	Pm 625 B*	B	D	4	F
51	2003	Pm 626*	D	A	1	F
52	2003	Pm 627 (2)	D	B	2	F
53	2003	Pm 629c	D	N	14	F
54	2003	Pm 630*	D	N	14	F
55	2003	Pm 631	D	N	14	F
56	2003	Pm 632	D	N	14	F
57	2003	Pm 633	D	N	14	F
58	2004	Pm 702	D	N	14	M
59	2004	Pm 713 B*	B	B	2	F
60	2004	Pm 714	B	B	2	F
61	2004	Pm 800*	D	A	1	F
62	2004	Pm 801 (4)	D	B	2	F
63	2005	Pm 811	D	A	1	U
64	2005	Pm 812	B	A	1	F
65	2005	Pm 813*	D	H	8	M
66	2005	Pm 814	D	B	2	M
67	2005	Pm 821	D	H	8	F
68	2005	Pm 822	D	E	5	F
69	2005	Pm 824	D	B	2	F
70	2005	Pm 825*	D	D	4	F
71	2005	Pm 827	D	H	8	F
72	2005	Pm 831	D	J	10	F
73	2005	Pm 833	D	C	3	M
74	2005	Pm 837*	D	A	1	F
75	2005	Pm 844 b	D	E	5	M
76	2006	Pm 845*	D	J	10	M

77	2007	Pm 848*	D	J	10	F
78	2007	Pm 849*	D	B	2	F
Conteo	Año	Etiqueta	Muestra	SWFSC	UABC	Sexo
79	2007	Pm 850*	D	J	10	F
80	2007	Pm 861	D	A	1	F
81	2007	Pm 864	D	B	2	F
82	2007	Pm 866*	D	J	10	F
83	2007	Pm 868*	B	B	2	F
84	2007	Pm 871*	D	A	1	F
85	2007	Pm 878*	B	B	2	F
86	2007	Pm 879*	B	A	1	U
87	2008	Pm 881	D	A	1	F
88	2008	Pm 883*	B	B	2	F
89	2008	Pm 884*	B	B	2	M
90	2008	Pm 885*	D	B	2	F
91	2008	Pm 886*	B	B	2	F
92	2008	Pm 889*	D	B	2	F
93	2008	Pm 890*	D	B	2	F
94	2008	Pm 891	B	B	2	F
95	2008	Pm 893*	B	B	2	F
96	2008	Pm 894*	B	B	2	F
97	2008	Pm 895*	B	B	2	F
98	2008	Pm 896*	D	B	2	F
99	2008	Pm 897*	B	B	2	M
100	2008	Pm 898*	B	B	2	F
101	2008	Pm 899	D	B	2	F
102	2008	Pm 900*	B	E	5	F
103	2008	Pm 901	B	B	2	F
104	2008	Pm 902	B	B	2	F
105	2008	Pm 903	B	B	2	M
106	2008	Pm 904*	B	B	2	F
107	2008	Pm 905	B	B	2	F
108	2008	Pm 906*	B	B	2	M

Se indican el código de los haplotipos usado por el Southwest Fisheries Science Center (SWFSC) y que corresponde con los reportados en el GenBank, el código de los haplotipos empleados por la UABC y el sexo de

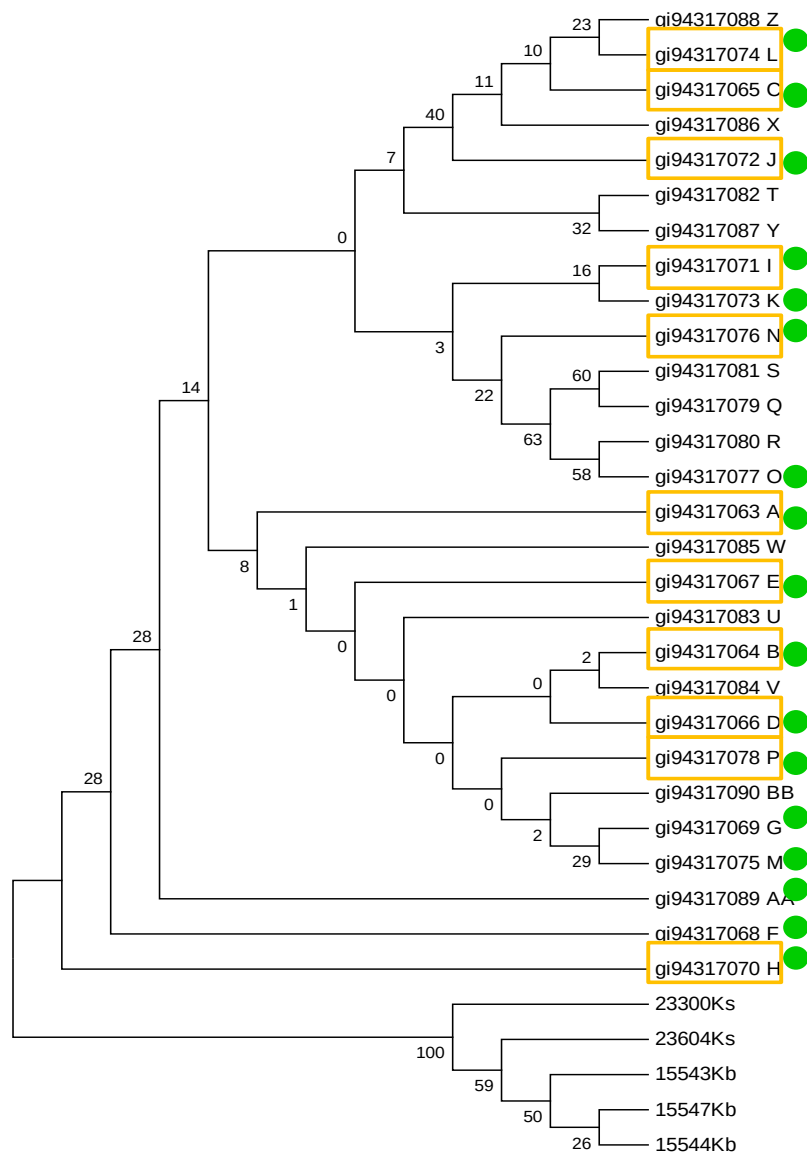
cada individuo. Asimismo se señalan las muestras que fueron excluidas por considerarse duplicadas (sombreado gris) y las que se incluyeron en el análisis de microsatélites (asterisco). El tipo de muestra obtenida por método no invasivo se indica como descamación (D) y el semi-invasivo como biopsia (B)

		Sitios variables																								
		58	62	105	121	150	184	200	207	208	211	235	243	260	272	273	282	287	288	289	305	308	319	324	350	
SWFSC	Haplotipo	T	C	C	C	C	T	T	A	A	C	A	G	A	A	C	A	A	A	T	C	A	G	C	C	
	Pmac 01	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Pmac 02	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Pmac 03	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Pmac 04	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Pmac 05	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Pmac 08	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	
	Pmac 09	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
	Pmac 10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
	Pmac 12	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
	Pmac 14	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
	Pmac 16	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	p	.	.	.	.	.

La posición 1 corresponde a la posición 15475 de la secuencia completa del genoma mitocondrial de *Physeter macrocephalus* (GenBank sequence AJ277029) reportada por Arnason y colaboradores (2000).

Apéndice 5

Árbol filogenético de los haplotipos de cachalote



Dentro de los cuadros amarillos se señalan los haplotipos encontrados en este trabajo dentro del Golfo de California, los que presentan un círculo color verde son lo que están presentes en el Océano Pacífico

Apéndice 6

Frecuencias relativas de los haplotipos mitocondriales en diversas

agregaciones de cachalote

Haplotipos	Haplotipos	Haplotipos	Cuevas Oceánicas					(Mesnick et al. 2011)
			Este trabajo		(Lyrrholm & Gyllensten 1998)			
			GC (104)	AN(47)	HS (41)	PN (143)	PN(198)	
Pmac 01	a	Tipo 01	23.08%	38.30%	29.27%	45.45%	34.34%	
Pmac 02	b	Tipo 03	43.27%	19.15%	0.00%	26.57%	27.78%	
Pmac 03	c	Tipo 02	5.77%	36.17%	29.27%	13.29%	8.08%	
Pmac 04	d	Tipo 13	3.85%	0.00%	0.00%	1.40%	1.52%	
Pmac 05	e	Tipo 05	2.88%	0.00%	2.44%	5.59%	7.07%	
Pmac 06	f		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.53%	
Pmac 07	g		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.51%	
Pmac 08	h	Tipo 10	3.85%	0.00%	0.00%	1.40%	2.53%	
Pmac 09	i		2.88%	0.00%	0.00%	0.00%	0.51%	
Pmac 10	j	Tipo 07	4.81%	0.00%	21.95%	0.00%	8.59%	
Pmac 11	k	Tipo 12	0.00%	0.00%	0.00%	1.40%	0.00%	
Pmac 12	l		0.96%	0.00%	0.00%	0.00%	0.51%	
Pmac 13	m	Tipo 11	0.00%	0.00%	0.00%	0.70%	0.51%	
Pmac 14	n	Tipo 08	7.69%	4.26%	4.88%	3.50%	1.01%	
Pmac 15	o	Tipo 09	0.00%	0.00%	4.88%	0.00%	0.51%	
Pmac 16	p	Tipo 16	0.96%	0.00%	2.44%	0.00%	1.01%	
Pmac 17	aa		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.01%	
Pmac 18	q	Tipo 06	0.00%	0.00%	0.00%	0.70%	0.00%	
Pmac 19	r	Tipo 14	0.00%	0.00%	2.44%	0.00%	0.00%	
Pmac 20	s	Tipo 15	0.00%	0.00%	2.44%	0.00%	0.00%	
Pmac 21	t		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
Pmac 22	u		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
Pmac 23	v		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
Pmac 24	w		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
Pmac 25	x		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
Pmac 26	y		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
Pmac 27	z		0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
Pmac 28	bb	Tipo 04	0.00%	2.13%	0.00%	0.00%	0.00%	

Apéndice 7

Comparación de los niveles de diversidad genética nuclear (microsatélites) entre las agregaciones del Golfo de California y las reportadas recientemente para otras regiones del Pacífico por Mesnick y colaboradores (2011).

En las siguientes tablas se indican los valores de heterocigosidad esperada y observada para el conjunto de cuatro microsatélites usados para hacer la comparación de las frecuencias alélicas de las agregaciones del Golfo de California (GC), Hawai (HW), la Corriente de California (CC) y el Pacífico Oriental Tropical (POT).

He				
Locus	HW	CC	ETP	GC
Na	11.5	11.7	14.0	12.7
EV5_A	0.78	0.73	0.74	0.68
SW10_A	0.90	0.85	0.86	0.86
SW13_A	0.87	0.86	0.80	0.85
SW19_A	0.92	0.91	0.92	0.92

Ho				
Locus	HW	CC	ETP	GC
EV5_A	0.82	0.72	0.77	0.66
SW10_A	0.85	0.77	0.83	0.92
SW13_A	0.85	0.86	0.72	0.82
SW19_A	0.93	0.90	0.90	0.76

Apéndice 8

Resultados del número total de haplotipos, diversidad haplotípica y nucleotídica, obtenidos en el presente trabajo y los reportados previamente por otros autores.

Población	50 muestras				104 muestras			
	n	NH	H (s.d)	π (s.d)	n	NH	H (s.d)	π (s.d)
<i>Golfo de California (GC)</i>	50	10	0.74 ± 0.05	1.42 ± 0.88	104	11	0.75 ± 0.03	1.35 ± 0.84
GC 1998	0	0	0	0	1	1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
GC 2000	1	1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5	2	0.60 ± 0.17	0.60 ± 0.56
GC 2001	0	0	0	0	1	1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
GC 2002	9	5	0.86 ± 0.08	2.01 ± 1.24	29	7	0.81 ± 0.04	1.54 ± 0.95
GC 2003	11	6	0.83 ± 0.08	1.90 ± 1.17	19	6	0.78 ± 0.05	1.62 ± 1.00
GC 2004	2	2	1.00 ± 0.50	1.00 ± 1.00	5	3	0.70 ± 0.21	0.80 ± 0.68
GC 2005	3	3	1.00 ± 0.27	2.68 ± 1.93	13	7	0.89 ± 0.05	2.03 ± 1.22
GC2006	1	1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1	1	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
GC2007	3	2	0.66 ± 0.31	0.66 ± 0.66	9	3	0.72 ± 0.09	1.05 ± 0.77
GC2008	20	4	0.36 ± 0.13	0.53 ± 0.46	21	3	0.26 ± 0.11	0.35 ± 0.35
*Galápagos (GAL)	38	4	0.68 ± 0.33	0.95 ± 0.66	38	4	0.68 ± 0.33	0.95 ± 0.66
*Pac. Nororiental (NEP)	31	6	0.68 ± 0.62	1.03 ± 0.71	31	6	0.68 ± 0.62	1.03 ± 0.71
*Pac. Noroccidental (NPW)	34	7	0.76 ± 0.04	1.39 ± 0.87	34	7	0.76 ± 0.04	1.39 ± 0.87
+Hawái (HW)	27	4	0.65 ± 0.65	0.79 ± 0.59	27	4	0.65 ± 0.65	0.79 ± 0.59
+Corriente de California(CC)	43	12	0.83 ± 0.036	1.84 ± 1.07	43	12	0.83 ± 0.036	1.84 ± 1.07
+Pacífico Oriental Tropical (ETP)	97	12	0.77 ± 0.02	1.43 ± 0.88	97	12	0.77 ± 0.02	1.43 ± 0.88

(*) Zonas estudiadas por Lyrholm y Gyllesten (1998).

(+) Zonas estudiadas por Mesnick *et al.* (2011).