



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
DEPARTAMENTO DE PESQUERÍAS Y BIOLOGÍA MARINA**



**CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIBURÓN
BALLENA (*Rhincodon typus*) DEL GOLFO DE CALIFORNIA**

TESIS

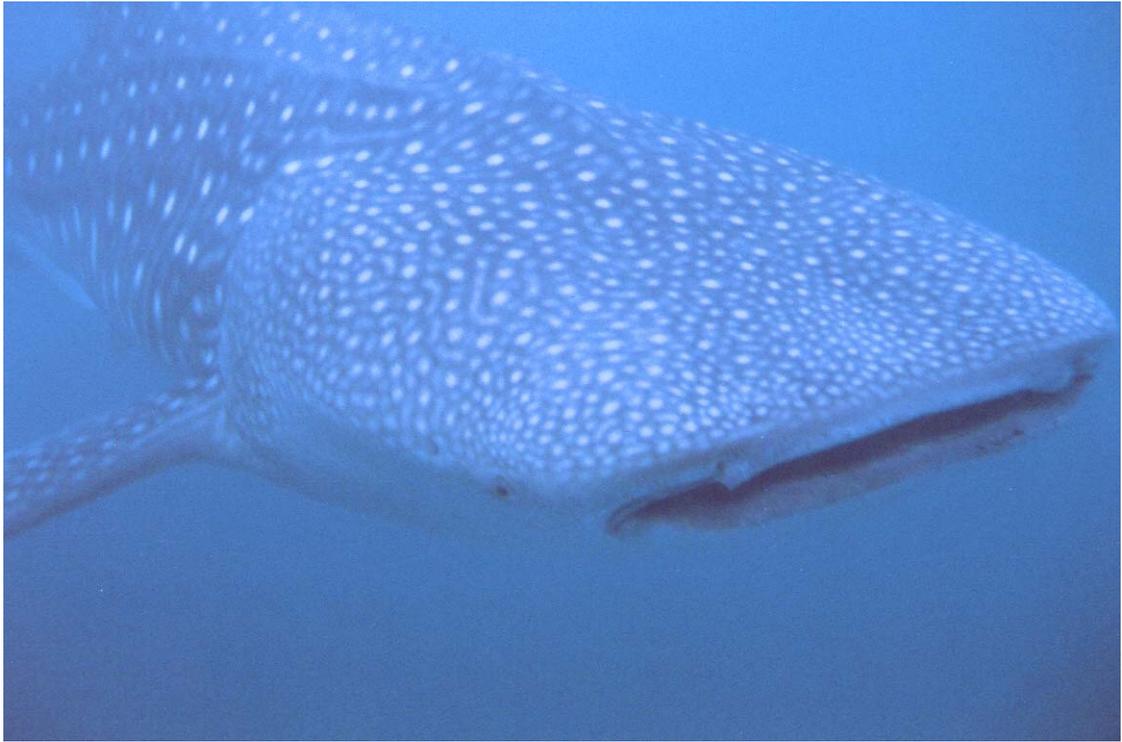
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ESPECIALIDAD EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Presenta:

Biol. Mar. Dení Ramírez Macías

La Paz, B.C.S., México, Septiembre de 2005





INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 09 del mes Agosto del año 2005, el (la) que suscribe DENÍ RAMÍREZ MACÍAS alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A030418 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. RICARDO VÁZQUEZ JUÁREZ y cede los derechos del trabajo titulado: "CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIBURÓN BALLENA (*Rhincodon typus*) DEL GOLFO DE CALIFORNIA" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: defenilipe@yahoo.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


DENÍ RAMÍREZ MACÍAS
nombre y firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 10:00 horas del día 09 del mes de Agosto del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DEL TIBURÓN BALLENA
(*Rhincodon typus*) DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

Presentada por el alumno:

RAMÍREZ

Apellido paterno

MACÍAS

materno

DENÍ

nombre(s)

Con registro:

A	0	3	0	4	1	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

Ricardo Vazquez Juarez
DR. RICARDO VAZQUEZ JUÁREZ

PRESIDENTE

Silvie Dumas
DRA. SILVIE DUMAS

SECRETARIO

Sergio Francisco Martínez Díaz
MC. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ
Co-Director

SEGUNDO VOCAL

Felipe Galván Magaña
DR. FELIPE GALVÁN MAGAÑA

TERCER VOCAL

James Ketchum Mejía
MC. JAMES KETCHUM MEJÍA

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Rafael Cervantes Duarte
DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



L. P. N.
CICIMAR
DIRECCION

A la vida...

Que me permite admirar y sorprenderme de la naturaleza

A la naturaleza...

Por su majestuosidad

Al Golfo de California...

Por su inigualable riqueza

Al Pezsapo...

Por su gran misterio

Al Amor...

Por permitirme conocerlo

A mi amor...

Por ser parte de mi vida

A mi familia...

Por su gran apoyo

A todos aquellos que con su apoyo creyeron en mi!

Agradecimientos

Esta tesis más que un trabajo es un sueño que se hizo realidad gracias al apoyo y trabajo de mucha gente. En especial el apoyo incondicional del Dr. Felipe Galván Magaña y el Dr. Ricardo Vázquez Juárez quienes desde un principio me apoyaron en la realización de este sueño.

Al comité revisor de tesis: M.C. Sergio Francisco Martínez Díaz, M.C. James Thomas Ketchum Mejía y Dr. Silvi Dumas. Quienes me ayudaron enormemente con sus comentarios y sugerencias en el escrito del presente trabajo. En especial a James quien me ayudo mucho con la información de tiburón ballena y quien compartió su experiencia conmigo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de esta tesis y al Programa Institucional de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico recibido durante la maestría. A los investigadores con los que participé para la obtención de este apoyo económico M.C. Arturo Tripa Quezada y M.C. Ricardo Javier Saldierna Martínez.

El apoyo y estabilidad moral fueron fundamentales para poder concluir este trabajo, por ello quiero agradecer en especial a *mi amor* quien ha compartido conmigo este sueño desde el principio, me ha motivado y apoyado en buscar y lograr mis sueños, gracias a su amor los baches a los que me enfrente fue mas facil solucionarlos. A su vez el apoyo de mis padres que con su amor y apoyo me han guiado por esta vida y son parte de mí. A mi hermano que a pesar de la distancia se que esta siempre conmigo. A Martha quien tambien se ha involucrado y ha estado pendiente de mi. A toda mi familia que es muy grande, pero sin embargo siempre han estado preguntando y apoyando con su buena vibra!

Al Dr. Roberto Enríquez por haber apoyado en las salidas en Bahía de Los Ángeles y a toda la gente de Ensenada con quien he compartido información como Lucina Iñiguez, Nirari Cárdenas, Natalie Rodríguez.

A los prestadores de servicios turísticos como Baja Expeditions, Cortez Club y Cantamar quienes apoyaron con la información de sitios de avistamientos de tiburón ballena.

Una parte fundamental para la realización de este sueño fue el trabajo en campo donde pude contar con la ayuda de gente que además de ayudarme se involucró en el proyecto como Mau (Mauricio Hoyos) y Jeins! (James Ketchum) con quienes compartí experiencias únicas durante la búsqueda del Pezsapo!, de verdad mil gracias por todo su apoyo tan importante, no solo de trabajo sino también moral cuando salíamos y salíamos y no veíamos nada, y también cuando hubo mucho trabajo en Bahía de Los Ángeles gracias a la ayuda de Mau y de Abraham Vázquez se pudo sacar el trabajo de 18 tiburones en semana y media. Abraham Vázquez con quien aprendí a observar e identificar a los pezsapos, con quien compartí y discutí el misterio del tiburón ballena. Todos los pezsapólogos que con su ayuda pudimos sacar el trabajo adelante: Anita, Paco, Yoel, *mi*

amorcito, Neza (gracias por esa primer muestra), Flor, Mario Jaime, Romeo, Liza, Lili y Adrian, Flavio, Ciro, Gabo, Nayeli, Luz, Egar, Agnes, Constanza, Nico, Carlos y Pau, Peter, el ruquito (Hever), Carmen, María Jose, Marcelña, Ema, Ro, y a los que nos les toco ver al majestuoso tiburón ballena...se los debo!. A los capitanes de embarcación: Ciro Arista, Sr. Calvillo, Nicolás Quiñónez. Por muestras quiero agradecer a Mario Salinas, a Jonathan Nelson, Antonio Resendiz quienes proporcionaron muestra del ejemplar varado en Bahía de Los Ángeles.

Por su parte en el laboratorio conté con el apoyo de gente como Hever Latisnere quien me enseñó a trabajar en el laboratorio junto con Neptalí Gutiérrez y Chula. A Dariel Tovar quien siempre me enseñó el camino más sencillo en el laboratorio, Adrián Murguía quien con su paciencia sabe compartir su experiencia y me enseñó el difícil análisis en el mundo de la genética poblacional. Clarisa y Dr. Francisco García de León quienes me dieron consejos acertados.

Finalmente agradezco a la vida por permitirme admirarla y soñar.

Índice General

	No. de Página
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas.....	iv
Glosario	v
Resumen	ix
Abstract.....	x
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	5
3. Justificación.....	10
4. Hipótesis.....	12
5. Objetivos	12
6. Área de estudio.....	13
7. Materiales y Métodos.....	17
7.1 Trabajo de campo.....	17
7.2 Diseño de la punta de acero inoxidable para toma de biopsias.....	18
7.3 Trabajo de laboratorio	19
7.3.1 Extracción del ADN	19
7.3.2 Análisis de primers	20
7.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en control positivo.....	20
7.3.4 PCR para amplificar la región control del ADNmt.....	21
7.3.5 Aislamiento del producto de PCR.....	22
7.3.6 Análisis de secuencias y diseño de primers específicos.....	22
7.3.7 PCR con primers específicos.	23
7.3.8 Análisis del polimorfismo del ADNmt	24
7.3.9 Diversidad haplotípica.	25
7.3.10 Diversidad nucleotídica.	25
7.3.11 Estructura poblacional.	26
7.3.12 PCR para amplificar los genes del complejo de Histocompatibles I o II.....	26
8. Resultados.	28
8.1 Observaciones en campo y foto identificación.....	28
8.1.1 Descripción de los tiburones encontrados en la Bahía de la Paz.....	28
8.1.2 Descripción de los tiburones encontrados en Bahía de los Ángeles.....	29
8.1.3 Descripción de los tiburones encontrados en Banco Gorda.	31
8.1.4 Foto-identificación	31
8.2 Trabajo de laboratorio.....	34
8.2.1 Extracción de ADN.	34
8.2.1 PCR en control positivo	35
8.2.2 PCR para amplificar la región control del ADNmt.....	35

8.2.3	Análisis de secuencias y diseño de primers específicos.....	36
8.2.4	Análisis del polimorfismo del ADNmt	38
8.2.5	Diversidad haplotípica y nucleotídica.	51
8.2.6	Estructura genética poblacional	51
8.2.7	PCR para amplificar los genes histocompatibles I o II.....	52
9.	Discusión.....	54
9.1	Obtención de biopsias	54
9.2	Observaciones en campo.....	55
9.3	Foto-identificación.....	60
9.3	Análisis genético.....	63
9.5	Planteamiento de hipótesis.....	68
10.	Conclusiones.....	69
11.	Comentarios sobre la conservación de la especie.....	71
12.	Recomendaciones.....	77
12.1	Técnicas.....	77
12.2	Investigación.....	79
13.	Bibliografía	81
	APÉNDICE A	xi
	APÉNDICE B.....	xiii

Índice de Figuras

	No. de página
Figura 1. Área de estudio	16
Figura 2. Puntas para toma de biopsias.....	19
Figura 3. Ejemplo del catálogo de los tiburones foto-identificados en BLA.....	32
Figura 4. Ejemplo del catálogo de los tiburones foto-identificados en BG.....	33
Figura 5. Hembra de 5 m recapturada	33
Figura 6. ADN total obtenido de 3 tiburones.....	34
Figura 7. Producto de PCR con primer para amplificación del citocromo b.	35
Figura 8. Producto de PCR de gradientes de temperatura con ambos primers.....	36
Figura 10. Frecuencia de haplotipos en las tres localidades.....	45
Figura 11. Árbol filogenético.....	47
Figura 12. Red de informática con las secuencias completas.....	48
Figura 13. Red de informática con las secuencias sin indel 1	50
Figura 14. Producto de PCR de amplificación de MHC II.....	53
Figura 15. Bahía de La Paz.	xiv

Índice de Tablas

	No. de Página
Tabla I. Características obtenidas de los tiburones ballena de BLP	29
Tabla II. Características obtenidas de los tiburones de BLA.....	30
Tabla III. Características obtenidas de los tiburones de BG	31
Tabla IV. Sitios polimórficos	39
Tabla IV. Sitios polimórficos (continuación).	40
Tabla V. Indel 1.	41
Tabla VI. Deleción encontrada en las secuencias 12 y 32.	42
Tabla VII. Indel 2.	43
Tabla VIII. Distribución geográfica de los haplotipos	44
Tabla IX. Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) por localidad.	51
Tabla X. AMOVA.....	52

Glosario

ADN polimerasa. Es una enzima que sintetiza una cadena hija (o varias) de ADN (bajo la dirección de una plantilla molde de ADN). Puede participar en la reparación o en la replicación.

Aloenzimas. También denominado alozimas; formas de una enzima, controladas por alelos de un mismo locus, que difieren en su movilidad electroforética.

Amplificación génica. Proceso o procesos mediante los cuales la célula aumenta el número de copias de un determinado gen dentro del genoma.

Análisis de Viabilidad poblacional. Es un método que consiste en diseñar modelos basados en información poblacional y ambiental para generar proyecciones sobre la probabilidad de extinción de una especie en condiciones naturales.

Ancestral. Estado primitivo o plesiomórfico de caracteres presente, o que se supone presente, en un antepasado.

Área de crianza. En tiburones, son lugares donde las hembras paren a sus crías y éstas permanecen ahí por un corto tiempo.

Área de crianza primaria. En tiburones, son aquellos sitios donde las hembras paren a las crías y éstas permanecen ahí por un corto tiempo.

Área de crianza protegida. En tiburones, son áreas de crianza protegidas de los depredadores y no son frecuentadas por los adultos.

Área de crianza secundaria. En tiburones, son lugares donde se juntan los juveniles después de haber abandonado las áreas de crianza primaria y permanecen antes de alcanzar la madurez.

Clonación genética. Producción de un número grande de copias de un segmento de DNA después de que dicho segmento de ADN sea insertado dentro de un vector e introducido en una célula. La clonación tiene lugar cuando el vector se replica.

Cuello de botella. Reducción transitoria en el tamaño poblacional, que generalmente da una deriva génica.

Delección. Es un tipo de mutación que ocurre en mutaciones de tipo puntual, se refiere a la pérdida de una o varias bases.

Depresión por endogamia. Disminución del vigor o el rendimiento causada por la endogamia.

Deriva génica. Cambios en las frecuencias de los alelos.

Divergencia. Adquisición de caracteres o rasgos disímiles mediante organismos relacionados.

Efecto fundador. Forma de deriva génica que se observa en una población fundada por una muestra pequeña y no representativa de una población más grande.

Endogamia. Cruzamiento entre individuos genéticamente relacionados (parientes).

Epipelágica. Organismos que viven en la zona epipelágica, la cual va desde la superficie hasta una profundidad de 200 metros.

Especie Vulnerable. Una especie se encuentra en estado vulnerable cuando no está críticamente en peligro o en peligro pero enfrenta un alto riesgo de extinción en estado silvestre en el futuro a mediano plazo.

Estructura genética. Distribución no aleatoria de los alelos en tiempo y espacio.

Estructura poblacional. Composición de una población de acuerdo con la edad y el sexo de los individuos.

Filopatría. Deriva del griego amante de casa y es la tendencia del individuo a retornar o permanecer en un área, sitio natal o u otro tipo de localidad adoptada.

Filopatría específica del sexo. Cuando los organismos de un sexo son más filopátras que el otro.

Filopatría natal. Regreso al área de nacimiento.

Grupo externo. En un análisis filogenético es importante conocer cual estado es primitivo y cual es derivado (el que evoluciono del estado primitivo). La técnica llamada comparación de grupo fuera, los individuos de interés son comparados con otro relacionado, si alguno de los individuos del grupo presentan una característica similar al grupo fuera, entonces este estado es asumido como primitivo.

Haplotipo. Constitución genética de un individuo con respecto a uno de los miembros de un par de genes alélicos. Grupo de marcadores genéticos en un cromosoma.

Indel. En genética, conjunción del término inserción-delección, ver deficiencia.

Inserción. Es un tipo de mutación que ocurre en mutaciones de tipo puntual, se refiere a la agregación de una o varias bases.

Metapoblación. Una población que se concibe como un conjunto de subpoblaciones unidas entre sí por la migración. Sin embargo, la tasa de migración es limitada, de modo que la dinámica de la metapoblación debería ser considerada como la suma de las dinámicas de las subpoblaciones individuales.

Microsatélites. En genética, son unidades de repetición en tandem cada una de una a diez pares de bases de largo.

Pantropical. Que se extiende o que aparece en toda la extensión del trópico y del subtropical, o que al menos está diseminado en las regiones tropicales.

Población panmíctica. Población no estructurada que se aparea al azar.

panmixia,

Polimorfismo de longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) Variaciones en los patrones de bandas producidos por electroforesis de los productos de una digestión con enzimas de restricción.

Polimorfismo genético. Coexistencia en la misma población de más de un alelo en un locus dado, de tal forma que la frecuencia del alelo menos abundante no se puede explicar por mutación.

Pirimidinas. En los ácidos nucleicos las pirimidinas son la citosina, timina y uracilo.

Purinas. En los ácidos nucleicos las purinas son la adenina y guanina.

Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR). Método para amplificar rápidamente segmentos de ADN en ciclos de desnaturalización, adición de primers y replicación.

Replicación. Proceso de copia.

Transición: En biología molecular, es la sustitución de una base purica por otra purica y una pirimidina por otra pirimidina.

Transversión. En biología molecular, es la sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa.

Selección positiva Darwiniana. La selección natural puede incrementar la frecuencia de un alelo. La selección que purga los alelos dañinos se llama selección negativa. La selección que

incrementa la frecuencia de los alelos beneficiosos se llama positiva, o a veces selección darwiniana positiva.

Variación genética. 1. Tendencia de los caracteres hereditarios a generar diversidad dentro de una población. 2. Media de los cuadrados de las variaciones calculada a partir de la media de una distribución de frecuencia génica.

Vulnerabilidad genética. Predisposición hereditaria permanente a desarrollar una enfermedad.

Resumen

El tiburón ballena se agrega estacionalmente en diferentes localidades a lo largo del Golfo de California, algunas de ellas son: Bahía de La Paz (BLP), Bahía de Los Ángeles (BLA) y Banco Gorda (BG). Sin embargo, es escaso el conocimiento que se tiene sobre los patrones de migración y estructura poblacional. Los marcadores moleculares son una poderosa herramienta en la determinación de la estructura poblacional. En este trabajo se diseñaron primers específicos de aproximadamente 600 pb, donde se encuentra el fragmento más polimórfico de la región control del ADNmt. El análisis de secuencias mostró 17 haplotipos diferentes distribuidos en 39 individuos (34 organismos juveniles y 5 hembras adultas). La diversidad haplotípica total encontrada fue muy alta ($h=0.92$) probablemente debido a que el tamaño de muestra fue pequeño y a la alta frecuencia de haplotipos raros. En contraste, la diversidad nucleotídica fue baja ($\pi=0.005$) y el análisis indica una radiación después de un cuello de botella poblacional sucedida hace cientos o miles de años que dio lugar a diversos haplotipos como resultados de un solo evento de sustitución, inserción o delección. El árbol filogenético y la red de análisis agruparon a los 17 haplotipos en cuatro clados grandes sin una evidente segregación geográfica. El análisis de variancia molecular (AMOVA) no mostró diferencias significativas entre las tres localidades ($P>0.15$, F_{ST} 0.01875). El haplotipo más frecuente (RC6) se encontró en las tres localidades y en 3 de 5 hembras adultas. Con la técnica de foto identificación se obtuvieron 4 recapturas en BLA entre 2003 y 2004 y a su vez confirmó movimientos entre BLA y BLP, las cuales están separadas aproximadamente por 850 km. Los resultados sugieren una población altamente migratoria dentro del Golfo de California y confirman reportes previos sobre residencia estacional y segregación de organismos adultos en el Sur, juveniles en el Norte y parte central del Golfo. Con la integración de las observaciones en campo y el análisis genético se sugiere la presencia de hembras filopátricas en el Golfo de California, mientras que los machos migran probablemente en busca de la reproducción.

Abstract

Whale sharks aggregate seasonally at three different locations along the Gulf of California, México, at Bahía de la Paz (BPL), Bahía de Los Ángeles (BLA) and Banco Gorda (BG). However, little is known about patterns of migration and population structure. Molecular markers are powerful tools in the determination of population structure. In the present study we developed novel specific primers of a ~600 bp polymorphic fragment of the mtDNA control region of whale shark. Sequence analysis revealed 17 haplotypes among 39 individuals (34 juveniles, 5 adult females) sampled at the three locations in the Gulf of California. Although overall haplotype diversity was high ($h = 0.92$) and probably overestimated due to small sample size and high frequency of rare haplotypes, overall nucleotide diversity was low ($\pi = 0.005$). Analysis indicated that most haplotypes could have arisen relatively recently by single events of substitution, insertion or deletion. The phylogenetic and network analysis grouped the 17 haplotypes among three supported lineages or clusters, without any evidence of geographic segregation. AMOVA showed no significant differences among the three localities ($P > 0.15$, $F_{ST} = 0.0187$). The most frequent haplotype (RC6) was also the most widespread and it was observed at the three locations. It was also observed in 3 of the 5 adult females sampled. Photo identification revealed that 4 individuals were resighted at one locality between 2003 and 2004. It also confirms the migration of 2 individuals between the two more distant localities separated by ~850 km (BLA and BLP). Our results suggest that a single highly mobile population of whale sharks occurs in the Gulf of California. It also confirms previous reports about the seasonal residency and segregation of adults in the south and juveniles in the north and central area of the Gulf. Integration of our field observations with genetic analysis suggests philopatry of female whale sharks in the Gulf of California, while adult males migrate probably to breed.

1. Introducción

El tiburón ballena *Rhincodon typus* (Smith, 1828) se caracteriza externamente por tener el cuerpo moderadamente deprimido con tres prominentes crestas longitudinales en la parte alta de sus costados; la cabeza es ancha, aplanada y algo puntiaguda; los ojos se encuentran situados lateralmente, detrás de ellos se encuentran los espiráculos de menor tamaño; la boca se encuentra en posición terminal y es extremadamente grande; presenta 5 aberturas branquiales largas y las internas se encuentran cubiertas por láminas filtrantes; la aleta caudal es de forma semi lunar; la coloración consiste en un patrón de puntos claros y rayas sobre un fondo oscuro; son organismos que pueden sobrepasar los 12 metros (Compagno, 1984; Colman, 1997a,b).

El tiburón ballena pertenece al Phylum Chordata, Subphylum Vertebrata, Clase Chondrichthyes, Subclase Elasmobranchii, Orden Orectolobiformes, Familia Rhincodontidae y *R. typus* como única especie (Compagno, 1984). Dentro del Orden Orectolobiformes, a su vez, se encuentran las familias Ginglymostomatidae, Stegostomatidae y Orectolobidae; las relaciones entre estas familias están basadas en similitudes morfológicas y anatómicas incluyendo la anatomía del esqueleto, dientes y morfología de los denticulos dérmicos, posición de la aleta y morfología de la barbilla (Colman, 1997a,b).

R. typus es una especie epipelágica pantropical, de aguas costeras y oceánicas, se distribuye desde el ecuador hasta los 30°N y 35°S en los Océanos Atlántico, Pacífico e Indico (Wolfson, 1986; Compagno, 1984). En todas las zonas donde se distribuye *R. typus*, se ha observado una cierta estacionalidad, la cual se ha relacionado con sus patrones de movimiento. Es una especie migratoria de amplios movimientos, los cuales se han relacionado con el desove de corales y peces, con afloramiento de organismos planctónicos y con cambios en la

temperatura de las masas de agua (Compagno, 1984; Clark y Nelson, 1997; Colman, 1997a,b; Gunn *et al.*, 1999; Taylor y Pearce, 1999; Heyman *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001).

Es poco lo que se conoce acerca de la historia natural del tiburón ballena, de su reproducción o biología poblacional. Se especula que estos organismos alcanzan la madurez sexual hasta después de los 30 años cuando tienen 9 m, y que tal vez son longevos llegando a alcanzar hasta 100 años de edad (Taylor, 1996; Colman, 1997a,b; Wintner, 2000). Son organismos de fecundación interna y desarrollo vivíparo aplacentado, siendo las hembras muy fértiles que llegan a tener hasta 300 embriones (Joung *et al.*, 1996).

Son organismos filtradores, se alimentan de presas pequeñas, desde organismos planctónicos (preferentemente crustáceos), en su mayoría copépodos, eufáusidos, peces pequeños, huevos de peces y hasta cefalópodos (Silas y Rajagopalan, 1963; Sivadas, 1991; Gunn *et al.*, 1999; Heyman *et al.*, 2001; Wilson y Newbound, 2001; Ketchum, 2003; Hacoheh, 2004). Incluso, se sugiere que en algunas ocasiones estos tiburones llegan a alimentarse de algas (Silas y Rajagopalan, 1963).

A través de la historia el tiburón ballena se ha utilizado de manera indirecta y directa. Indirecta porque es utilizada como un indicador de la presencia de atún (Colman, 1997a,b). Por otro lado, se le explota de manera comercial en el Indo-Pacífico, siendo la carne muy apreciada (Colman, 1997a,b, Graham, 2004). No obstante, a pesar del aparente incremento de las capturas de la especie, no es posible estimar el esfuerzo pesquero que actualmente se ejerce sobre la especie dado a lo fragmentario de la información, lo que hace imposible calcular las tasas de captura de tiburones ballena en el Indo-Pacífico (Colman, 1997a,b).

Con el auge eco turístico, la oferta y la demanda de actividades de buceo para observar tiburones ballena se ha incrementado, especialmente en el arrecife coralino de Ningaloo en Australia, Islas Galápagos, Ecuador, Islas del Mar de Andaman, Tailandia, Belice, Honduras (Colman, 1997; Norman, 2004) y en México en el Caribe (Holbox) (Remolina *et al.*, 2004) y el Golfo de California (Lozano, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003).

El aprovechamiento sustentable de esta especie, dependerá del conocimiento global de su historia natural, que aunque ahora es limitado, sugiere que dado su longevidad, edad de primera madurez sexual (30 años) y comportamiento, podría ser muy vulnerable a la sobreexplotación e impactos antropogénicos (Colman, 1997a,b; Anónimo, 2002a). Por ello, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) declaró recientemente al tiburón ballena como especie vulnerable (Norman, 2000). En México, esta especie fue declarada en la norma oficial (NOM-059-SEMARNAT-2001) como amenazada a partir de marzo de 2002 (Anónimo, 2002b). Ambas categorías se les dá a aquellas especies o poblaciones que podrían llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo, debido a factores que inciden negativamente en su viabilidad, al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir el tamaño de sus poblaciones.

Al igual que en otras regiones, en el Golfo de California el tiburón ballena presenta agregaciones estacionales. Los sitios más conocidos son la Bahía de San Luis Gonzaga, Bahía de Los Ángeles, Bahía de La Paz, El Bajo de Espíritu Santo, Bajo Gorda (Eckert y Stewart, 2001). A pesar de que desde hace varias décadas se reconoce la presencia del tiburón ballena en el Golfo de California (Wolfson, 1987; Clark y Nelson, 1997; Eckert y Stewart, 2001), no existe información que permita evaluar la vulnerabilidad de esta población, y si podría ser aprovechada de manera sustentable. Para cualquier especie que requiera manejo, la información de la estructura genética poblacional es fundamental (Haig, 1998; Grijalva-Chon *et al.*, 2003), ya que esto permite implementar planes de manejo y medidas de conservación de la especie. En el caso de *R. typus* en el Golfo de California, se desconocen aspectos esenciales sobre su historia natural, demografía, ecología y las relaciones genéticas entre poblaciones (Eckert y Stewart, 2001), por ejemplo si sus poblaciones están estructuradas, su grado de depresión por endogamia, número efectivo y capacidad inmune.

Estudios recientes han mostrado la utilidad de las técnicas moleculares en la biología de la conservación (Primark, 2002) ya que uno de los principales objetivos de la biología de la

conservación es el conocimiento y mantenimiento de la diversidad genética, dado que la variación genética es esencial en mayor escala para la sobrevivencia, cambios adaptativos y evolución (Smith y Wayne, 1996). Para ello se aplica la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para obtener suficientes copias del ácido desoxirribonucleico (ADN) que permitan el análisis de los denominados marcadores moleculares. Las técnicas del "Huellas digitales de ADN", análisis de aloenzimas, análisis de longitud polimórfica de fragmentos de restricción (RFLPs por sus siglas en inglés), Amplificación aleatoria de fragmentos polimorficos de ADN (RAPDs, por sus siglas en inglés), secuenciación automática, análisis microsatélital, permiten identificar individuos de especies amenazadas, la falta de diversidad genética y el declive subsecuente de diferentes especies, analizar la viabilidad poblacional con base a su variabilidad genética, o determinar parentescos, grado de hibridación e introgresión, patrones de distribución, flujo genético y establecer así unidades evolutivas significativas de conservación de acuerdo con la estructura genética y geográfica de las poblaciones (Waples, 1995; Smith y Wayne, 1996; Haing, 1998).

Los marcadores genéticos más apropiados deben tener una tasa de mutación alta para detectar el suficiente polimorfismo que revele similitudes y diferencias dentro de las poblaciones (Parker, 1998). Es fundamental reconocer que la tasa de mutación del marcador genético utilizado en estos estudios puede presentar diferencias inherentes a características propias de las especies, como su metabolismo y/o debidas a la distinta dinámica demográfica y reproductiva de poblaciones, como panmixia, efecto fundador, ancestría y divergencia, reciente o antigua, que determinan en un momento dado el que este marcador genético sea útil para detectar la presencia de una estructura poblacional real en el ámbito de una escala geográfica dada, y con ello sustentar medidas de conservación relevantes (Avisé, 1994).

2. Antecedentes

El tiburón ballena fue descrito en 1828 por Andrew Smith, cuando un macho de 13.7 m fue arponeado en la Bahía Table en Sudáfrica en 1828 (Colman, 1997a,b). El escaso conocimiento que se tiene de la especie ha sido obtenido mediante investigaciones locales que aportan información sobre la distribución y morfometría de la especie (Gunn *et al.*, 1999). A su vez se ha obtenido información sobre su biología a partir de la pesca y los varamientos en diferentes regiones del mundo; sin embargo, la mayoría son datos aislados que muestran solo valores morfométricos (Alvarez-León y Castro Aguirre, 1983; Pai *et al.*, 1983; Shriram, 1994; Krishna y Badrudeen; 1996; Kumar, 1998; Siraimetan, 1998). En los últimos 10 años, los estudios de tiburón ballena se han incrementado, enfocándose principalmente en determinar sus movimientos y migraciones con estudios de telemetría utilizando marcas ultrasónicas y satelitales (Gunn *et al.*, 1999; Eckert y Stewart, 2001; Eckert *et al.*, 2002; Norman, 2004).

Son pocos los estudios que se han realizado en el Golfo de California. Wolfson (1986) realizó una recopilación de avistamientos donde incluyó al Golfo de California y en 1987 llevó a cabo una revisión de avistamientos en el Golfo, mencionando la falta de estudios sistemáticos de la especie en esta zona (Wolfson, 1987).

Posteriormente, se han realizado estudios aislados principalmente en Bahía de Los Ángeles y la Bahía de La Paz. Clark y Nelson (1997) registraron tiburones ballena en la Bahía de La Paz alimentándose en un afloramiento de copépodos de la especie *Acartia clausi*. Ketchum y Lozano (2000) presentaron algunas observaciones sobre la distribución del *R. typus* en la porción Sur del Golfo. Lozano (2000) elaboró una propuesta de códigos de conducta de observación y nado con la especie para la Bahía de La Paz, los cuales nunca se han puesto en marcha. Recientemente, en la Bahía de La Paz se realizó un estudio sobre distribución y abundancia del tiburón ballena a lo largo de varios años relacionándolo con factores

ambientales como temperatura y salinidad así como con la distribución y abundancia del zooplancton (Ketchum, 2003). Hacoheh (2004) realizó un estudio sobre abundancia y riqueza específica de presas preferenciales de la especie en la Bahía de la Paz.

En Bahía de Los Ángeles, los estudios realizados han abordado aspectos sobre su distribución, ecología alimentaria y descripción del hábitat (Nelson y Eckert, 2000; García, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003). Rodríguez *et al.* (2003) realizaron una propuesta de un programa de manejo para el aprovechamiento sustentable del tiburón ballena en el área a través del ecoturismo, la cual ha estado funcionando con los prestadores de servicios locales. Iñiguez y Enríquez (2004) documentaron mediante fichas de foto-identificación los tiburones ballenas encontrados durante las temporadas de 2001 a 2003.

Son pocos los estudios que han abordado aspectos poblacionales y genéticos del tiburón ballena. En el Golfo de California, durante un estudio de telemetría con la especie se marcaron 17 tiburones ballena con marcas satelitales, en uno de los individuos marcados, la marca permaneció a lo largo de 37 meses, por lo que se pudo registrar que viajó 13 000 km hacia el Oeste del Océano Pacífico cerca de las Islas de Micronesia en Oceanía (Eckert y Stewart, 2001). Con dicho estudio se confirmó el amplio rango de movimiento que llega a tener *R. typus* en el Pacífico, sin embargo, es incierto si las poblaciones realizan migraciones sincrónicas (Eckert y Stewart, 2001). A su vez, se analizaron secuencias de citocromo b de biopsias de tiburones ballenas encontrados en el Golfo de California, comparándolos entre sí y con dos muestras obtenidas en Filipinas y una en Sudáfrica, a pesar del análisis completo del gen, no se encontró ninguna variabilidad entre los tiburones (Eckert y Stewart, 1996).

Eckert y Stewart (2001) reportaron una aparente segregación latitudinal de tiburones ballena, acorde a su talla y sexo. Los individuos jóvenes (< 4 m), se distribuyen en el Alto Golfo, probablemente aprovechando la alta productividad del área, mientras que los organismos más grandes (> 8 metros) se distribuyen en el bajo Golfo (Eckert y Stewart, 1996; 2001), donde se encuentran la mayor parte de hembras maduras y preñadas (Eckert y Stewart, 1996;

Eckert y Stewart, 2001; Ketchum, 2003), las cuales probablemente migran grandes distancias cruzando hacia el Pacífico occidental (Eckert y Stewart, 1996; Eckert y Stewart, 2001). Con estas observaciones, Eckert y Stewart (2001) proponen las siguientes hipótesis : 1) no hay diferencias genéticas inter-regionales o inter-oceánicas entre poblaciones del tiburón ballena, 2) la estructura de tallas y sexo observada a lo largo del Golfo de California es reflejo de la población a gran escala por lo que no se agregan por edad o sexo estacionalmente o durante el ciclo de vida de la especie, y 3) los tiburones ballena son residentes locales y sedentarios anuales pero que se encuentran cerca de la superficie estacionalmente y viven en la profundidad en otras. Estas hipótesis deben comprobarse o refutarse lo cual puede abordarse mediante el empleo de marcadores moleculares.

La cuantificación de la variación ínter- e intra-específica de las secuencias del ADN mitocondrial (ADNmt) ha proveído de una excelente herramienta para examinar aspectos de estructura poblacional, intercambio genético entre poblaciones y movimientos migratorios en diferentes poblaciones de peces y tiburones (Heist *et al.*, 1996; Rosel y Block, 1996, Hang, 1998; Keeney *et al.*, 2003). La rápida evolución del ADNmt como consecuencia a la alta tasa de sustitución de nucleótidos mayor a la del ADN nuclear (Parker, 1998), hace ideal a esta molécula para estudios genéticos enfocados a la estructura poblacional (Heist *et al.*, 1996). De las secciones mitocondriales estudiadas, la de mayor utilidad ha sido la región control (D-Loop), dado que en la mayoría de los animales es mucho más variable que el resto del genoma mitocondrial y es por consiguiente un marcador muy útil para el estudio de poblaciones recientemente divergidas o especies. Esta región regula la replicación y transcripción de genoma mitocondrial (Parker, 1998; Grijalva-Chon *et al.*, 2003). Una vez caracterizado este marcador puede emplearse por ejemplo, para conocer el sistema poblacional o metapoblacional.

Se han abordado estudios poblacionales en diferentes especies de tiburones utilizando como marcador el ADNmt y evaluando el polimorfismo mediante el análisis de longitud polimórfica de fragmentos de restricción (RFLPs por sus siglas en inglés). Heis *et al.* (1995)

encontraron que no existen diferencias significativas en haplotipos de ADNmt entre tiburones (*Carcharhinus plumbeus*) del Atlántico medio y el Golfo de México. Ward y Gardner (1997) al realizar una comparación de *Galeorhinus galeus* del Sureste de Australia y de Nueva Zelanda, no encontraron diferencias significativas, sin embargo encontraron grandes diferencias entre estas con Sudáfrica (Heist, 1999). Heist (1996) examinó la variación del ADNmt de *Isurus oxyrinchus* del Norte y Sur del Atlántico así como del Norte y Sur del Pacífico, determinó que existen diferencias significativas en la frecuencia de los haplotipos entre estas áreas. Ward y Gardner (1997) examinaron muestras de *Galeorhinus galeus* del Atlántico Norte y Sur, del Océano Índico (Sudáfrica), y aguas de Australia y Nueva Zelanda, encontraron los menores niveles de variación en el Atlántico con diferencias significativas en la frecuencia haplotípica entre las localidades. Grijalva-Chon *et al.* (2003) analizaron la variación genética de *Squatina californica* en dos localidades del Golfo de California, encontraron una baja variabilidad genética del ADNmt.

Para poder evaluar de manera más precisa el polimorfismo de la región control del ADNmt se utiliza la secuenciación y se ha utilizado para evaluar la estructura genética en tiburones (Heist *et al.*, 1996; Keeney *et al.*, 2003). Pardini *et al.* (2001) analizaron la región control de *Charcharodon carcharias* (tiburón blanco) encontrando diferencias significativas entre poblaciones de Australia/Nueva Zelanda y Sudáfrica. Keeney *et al.* (2003) analizaron secuencias de toda la región control del ADNmt de *Carcharhinus limbatus* (tiburón puntas negras) y detectaron diferencias significativas entre áreas de crianza del Golfo de México y el Atlántico.

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés), es un sistema genético cuya información se ha empleado más recientemente para evaluar la estructura poblacional, la variabilidad genética y el grado de vulnerabilidad de una especie dada. Los genes del MHC, se caracterizan por ser altamente polimórficos (Haig, 1998), dado que su función es reconocer moléculas propias y a los péptidos ajenos potencialmente dañinos, así como generar respuestas inmunes por causa de estos últimos, indicando a los receptores de los linfocitos T que la célula está infectada exponiendo al antígeno, de manera que los

linfocitos T puedan actuar sobre la célula infectada (Tamarin, 1996), por lo que con su estudio, se puede demostrar los problemas de poblaciones específicas debidas a su susceptibilidad a patógenos y evaluar la salud poblacional. El análisis de la diversidad de estas moléculas es recomendable en poblaciones cautivas o pequeñas (Haig, 1998).

En tiburones el MHC ha sido caracterizado (Hashimoto *et al.*, 1992; Bartl *et al.*, 1997) y ha sido una herramienta útil en estudios evolutivos (Kasahara *et al.*, 1992; Otha *et al.*, 2000). Aunque no han sido empleadas tan ampliamente como en mamíferos; se ha visto que en tiburones, al igual que en mamíferos marinos, estas moléculas se encuentran bajo selección positiva Darwiniana por lo que pueden emplearse para estudios poblacionales.

3. Justificación

El Golfo de California presenta un hábitat único debido a las condiciones fisiográficas, climáticas y oceanográficas que permiten que sea una zona de alta productividad biológica (Mittermeier *et al.*, 1997), lo cual favorece la presencia de tiburones ballena.

A pesar de que desde hace varios años se conocen las agregaciones de tiburones ballena en el Golfo de California, no existen estudios que permitan determinar el grado de vulnerabilidad de la especie y del efecto que pueden causar las actividades humanas relacionadas con la especie, por lo que son necesarios estudios que permitan conocer la viabilidad poblacional, donde uno de los factores importantes es su variabilidad genética y la estructura poblacional.

Las hipótesis planteada por Eckert y Stewart (2001) debe confirmarse o refutarse con estudios genéticos que permitan corroborar que el tiburón ballena dentro del Golfo de California es una población o se encuentra conformado por un sistema metapoblacional, ya que mediante el empleo de marcadores moleculares se puede obtener una valoración de la diversidad genética existente dentro y entre poblaciones (Haig, 1998; Parker, 1998). Los estudios genéticos respaldados con estudios de foto-identificación permitirán evaluar la permanencia de los tiburones ballena en diferentes zonas del Golfo de California, así como adquirir el conocimiento de su distribución por edad y sexo, permitiendo observar si existe la mayor fidelidad a hábitats críticos (aquellos en los que la sobrevivencia y potencial alimenticio se vean favorecidos).

En especies longevas, con maduración sexual tardía y que son estacionales o que realizan migraciones desconocidas, como es el caso del tiburón ballena, existe una mayor dificultad para estudiarlas, por lo que es difícil de evaluar y determinar su estructura y estatus poblacional (Haing, 1998). Sin embargo, mediante el empleo de marcadores moleculares se pueden abordar estos temas como son el análisis de diversidad genética, el conocimiento del tamaño eficaz poblacional y la existencia o ausencia de flujo genético. Este conocimiento

permite plantear una gestión adecuada en los programas de recuperación y conservación de especies. Es importante mencionar que la mayor comprensión de la información molecular se obtiene cuando se usa de manera conjunta con datos ecológicos, demográficos, conductuales y fisiológicos obtenidos en el campo (Haig, 1998).

El mayor problema para el análisis de los marcadores genéticos, es la elección de la región del genoma que revele la variación de los alelos y que pueda ser secuenciada eficazmente, por lo que normalmente se buscan secuencias de ADN que evolucionen relativamente rápido, de manera que las diferencias de los alelos sean comunes dentro del segmento de ADN analizado, para así poder evaluar el polimorfismo poblacional (Parker, 1998). Por ello es importante escoger un marcador molecular adecuado al planteamiento que se quiera abordar. Se puede citar como ejemplo al trabajo de Eckert y Stewart (1996) quienes analizaron la secuencia completa de citocromo b y no encontraron ninguna diferencia entre los organismos. Esto debido a que el citocromo b es una proteína de evolución muy lenta y se ha visto en la comparación de aminoácido a aminoácido en organismos sin relación de parentesco inmediato que del 20 al 50% de las posiciones son conservadas lo cual expresa la existencia de contracciones funcionales importantes, ya que esta proteína está perfectamente ajustada a su función tanto en organismos actuales como en los fósiles (Durand y Favard, 1978). Esta es la razón por la que existen diferencias mínimas provocadas por mutaciones pequeñas en las secuencias que codifican esta molécula y son muy similares en especies que son de diferentes grupos, siendo casi idéntica en organismos muy emparentados. Esta lenta tasa evolutiva hace posible establecer el grado de relación entre organismos lejanamente emparentados; sin embargo no es una molécula recomendable para el análisis en organismos cercanos, por lo que para este fin hay que recurrir a moléculas de evolución rápida como el MHC o la región control del ADNmt (Nieto y Llorente, 1994).

La falta de marcadores moleculares para el estudio del tiburón ballena justifica el objetivo del presente trabajo. El desarrollo de tales marcadores, puede ser la base para determinar si los tiburones ballena del Golfo de California están conformados por una sola población.

4. Hipótesis

- La región control del ADNmt y los genes histocompatibles son altamente polimórficos y buenos marcadores moleculares para su empleo en estudios poblacionales.
- Los tiburones ballena del Golfo de California conforman una sola población.

5. Objetivos

Objetivo general

- Aislar y caracterizar marcadores moleculares que permitan evaluar el grado de polimorfismo poblacional del tiburón ballena en el Golfo de California.

Objetivos particulares

- Establecer técnicas de obtención de biopsias para el tiburón ballena.
- Avanzar con la conformación de un catálogo fotográfico de identificación de tiburones ballena del Golfo de California.
- Diseñar primers específicos que permitan amplificar la región control del ADNmt y del MHC clase I o II del tiburón ballena.
- Caracterizar el polimorfismo de la región control del ADNmt y el de los genes histocompatibles clase I o II del tiburones ballena

6. Área de estudio

El área de estudio incluye a Bahía de Los Ángeles (BLA) en la región de las grandes islas del Golfo de California, a la Bahía de la Paz (BLP) en la región del Golfo Medio y a Bajo Gorda (BG) en la región de la boca del Golfo (Fig. 1)

El Golfo de California es una cuenca considerada como un mar marginal en conexión con el Océano Pacífico, está situado en el noroeste de la República Mexicana entre las coordenadas 23° y 32° de Latitud Norte y 107° y 115° de Longitud Oeste (Fig. 1). Se encuentra limitado al oeste por la península de Baja California y al Este por las costas de los estados de Sonora y Sinaloa (Licea *et al.*, 1995). El área ocupada por el Golfo es de 150, 000 km², teniendo una longitud aproximada de 1,000 km y 150 km de amplitud promedio, constituyendo un volumen cercano a los 123 km³ (Licea *et al.*, 1995).

El Golfo de California esta sujeto a un forzamiento dinámico por el Océano Pacífico a través de la boca; además de las mareas, entran al Golfo 1) ondas internas, 2) perturbaciones causadas por huracanes, 3) ondas de origen ecuatorial atrapadas en la costa, 4) una invasión anual de agua superficial ecuatorial, 5) oscilaciones de periodo muy largo como El Niño. Sin embargo, dentro del Golfo existen procesos físicos regionales y locales como arrastre y mezcla por vientos, mezcla por mareas, intercambios de calor, evaporación, entre otros, que afectan la dinámica y alteran las características del agua siendo estas particulares y diferentes a la del Pacífico (Lavin *et al.*, 1997).

A continuación se mencionan algunas características oceanográficas de las principales regiones en las que se subdivide, de acuerdo con Roden y Groves (1959), el Golfo de California.

Región del Alto Golfo. Comprende de la desembocadura del Río Colorado y que se extiende hasta el Norte de isla Tiburón, esta zona se caracteriza por un ambiente árido. El área

presenta fondos someros (50-200m), con pendiente ligera hacia el sudoeste. Las aguas son muy turbias y las temperaturas presentan altas variaciones (10°C en invierno y 32°C en verano). La salinidad es alta (35.2–35.5‰) ya que en esta zona la incidencia de tormentas tropicales es menor que en la zona sur del Golfo. Las mareas se encuentran entre las de mayor amplitud en el mundo (más de nueve metros) y es una zona donde ocurren altas concentraciones de nutrientes (Roden y Groves, 1959; Álvarez-Borrego y Schwartzlose, 1979).

Región de las Grandes Islas. Comprende a las islas Ángel de la Guarda y Tiburón, incluye el área de estudio de Bahía de los Ángeles (Fig.1). El fondo está conformado por cinco cuencas. Estas cuencas determinan un régimen oceanográfico único, restringiendo la circulación entre el Alto Golfo y Golfo Medio. En el Canal de Ballenas se da una mezcla intensa de masas de agua en que determina que en este se presenten las temperaturas más bajas del Golfo (Álvarez-Borrego *et al.*, 1978). Las surgencias se presentan durante todo el año suministrando una gran cantidad de nutrientes a la zona fótica, lo que determina una gran productividad en el área (Roden y Groves, 1959).

Región del Golfo Medio. Se localiza entre el límite sur de la Región de las Grandes Islas hasta la Bahía de Topolobampo en el este y la Bahía de La Paz al oeste, incluye el área de estudio de la Bahía de La Paz (Fig.1). Sus cuencas son profundas. Los cambios estacionales en esta región son marcados debido a la intrusión estacional de masas de agua tropicales y subtropicales (Álvarez Borrego y Schwartzlose 1979). Existe una masa de agua característica de alta salinidad llamada "Agua del Golfo" producida por la alta evaporación que ocurre en esta zona (Roden y Groves, 1959).

Región de la Boca del Golfo. Comprende del límite Sur de la región del Golfo medio hasta Cabo Corrientes en el este y Cabo San Lucas en el Oeste, incluye el área de estudio de Punta Gorda (Fig. 1). Se comunica con el Océano Pacífico a través de una boca de aproximadamente 200 km de ancho. Presenta cuencas que exceden los 2000 m de

profundidad. Presenta una precipitación estacional de 500 hasta 1000 mm/año. Su estructura hidrográfica es complicada debida a la confluencia de distintas masas de agua en la boca del Golfo (el agua fría de la Corriente de California de baja salinidad ($S \text{ ‰} \leq 34.60$), que fluye hacia el sur a lo largo de la costa oeste de Baja California; el agua caliente del Pacífico Tropical Oriental de salinidad más alta ($34.65 \leq S \text{ ‰} \leq 34.85$), que fluye del sureste hacia la boca del Golfo y el agua cálida de alta salinidad ($S \text{ ‰} \geq 34.90$) del Golfo de California mismo). La amplitud de mareas en la zona es de 1 m, la más baja que se registra en el Golfo (Roden y Groves, 1959; Álvarez-Borrego y Schwartzlose, 1979).

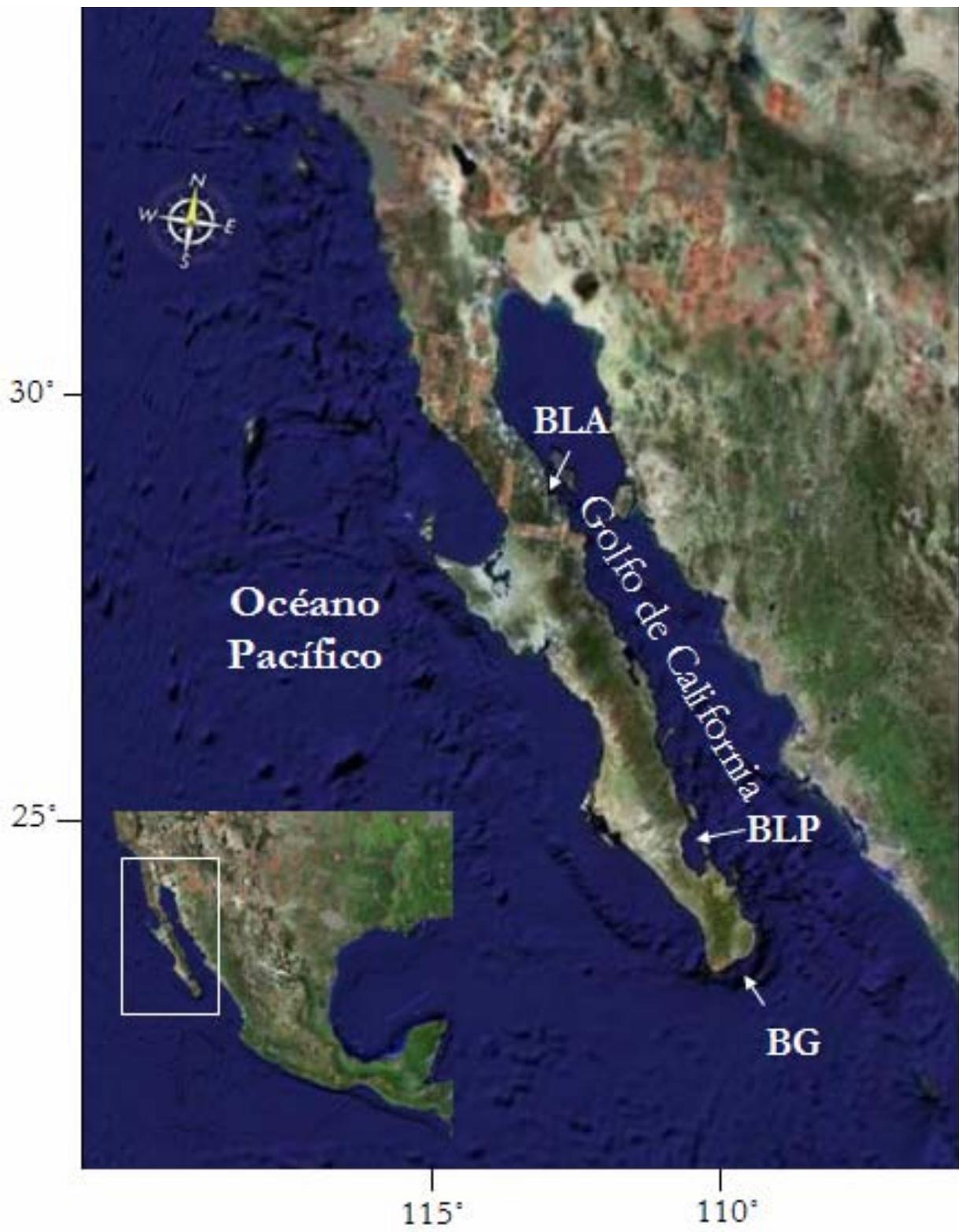


Figura 1. Área de estudio: Golfo de California y sus localidades, donde BLA = Bahía de los Ángeles, B.LP Bahía de La Paz y BG=Banco Gorda.

7. Materiales y Métodos

7.1 Trabajo de campo

Las salidas de campo en la Bahía de La Paz se realizaron mensualmente a partir de agosto de 2001 a julio de 2002. Del mes de noviembre de 2002 al mes de abril de 2005 se realizaron salidas en la Bahía de La Paz únicamente en meses con mayor número de avistamientos: octubre-diciembre y mayo-junio; o cuando nos reportaban de la presencia de tiburones ballena. Banco Gorda se visitó en junio de 2003 y Bahía de Los Ángeles, por su parte, se visitó en octubre de 2003 y de 2004.

Las observaciones en campo se llevaron a cabo desde embarcaciones tipo panga (8 m de eslora) propulsados con motores fuera de borda. La fecha, hora, posición geográfica del avistamiento determinada con un Posicionador Geográfico Global (GPS) y estado del mar (escala Beaufort) se anotaron en formas previamente diseñadas (Ketchum, 2003). Para identificar a los organismos se empleó la metodología mencionada por Ketchum (2003) donde a cada organismo se le miden 1) la longitud total (LT) con un cabo y 2) la altura de la primera aleta dorsal (AD1) con ayuda de un tubo de PVC previamente marcado, además 3) se determina el género por la presencia o ausencia de mixopterigios y 4) se anotan características de manchas o patrones de coloración y cicatrices. Simultáneamente se tomó un video y/o fotografía utilizando cámara subacuática de video y/o una cámara fotográfica subacuática Nikonos II. La foto-identificación se realizó con base en la metodología propuesta por Taylor (1994) siendo importante el área posterior a las aberturas branquiales izquierdas. Esta información fue anotada en la hoja de registro empleada por Ketchum (2003) (Apéndice A).

Para el análisis genético, se obtuvieron biopsias de piel de distintos individuos juveniles y adultos utilizando un arpón tipo hawaiano de 1.9 m de largo con una punta de acero inoxidable de 6 mm de diámetro diseñada específicamente para obtener muestras. Con la finalidad de evitar la transmisión de alguna enfermedad o de infectar al animal durante la

obtención de la biopsia; la punta se esterilizaba quemándola con ayuda de un soplete portátil y se desinfectaba con alcohol etílico antes de ser utilizada. Las biopsias fueron preservadas en alcohol etílico absoluto y en congelación hasta su análisis en laboratorio (Grijalva-Chon *et al.*, 2003). Las muestras se analizaron en el laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

Se realizó un catálogo de foto-identificación de los individuos, empleando como área distintiva el patrón de coloración de las aberturas branquiales del lado izquierdo de acuerdo a lo propuesto por Taylor (1994). A cada tiburón se le asignó una clave la cual corresponde al área (BLP, BLA, BG), el número de tiburón del área, y el número total de las tres áreas; por ejemplo: BLP08TB37 que es un tiburón encontrado en la Bahía de La Paz, es el octavo de esta área pero es el número 37 del total de los tiburones.

7.2 Diseño de la punta de acero inoxidable para toma de biopsias

Para la obtención de biopsias se diseñó una punta de acero inoxidable que permitiera la obtención de tejido de tiburón ballena para el análisis genético. Se modificó un diseño utilizado para la toma de biopsias de mamíferos marinos. La primer modificación a dicha punta fue el diámetro, ya que estas puntas se utilizan con ballesta por lo que tienen una cuerda de 8 mm de diámetro, por lo que se modificaron para adaptarlas al arpón hawaiano, reduciendo el diámetro de la cuerda a 6 mm. En la primer prueba para obtener tejido se observó que la distancia entre los dientes internos y el filo de la punta eran muy grande, por lo tanto era difícil la obtención de tejido, así que se redujo esta distancia. En la siguiente prueba se observó que los dientes eran un tope más que hacer su función de sujetar el tejido, por lo que se abrió el paso de luz entre los dientes. La punta actual tiene la distancia adecuada entre los dientes y el filo de la punta (7.7 mm), así como el paso de luz entre los dientes (1.6 mm) para sujetar el tejido (Fig. 2, b). Esta punta se modificó teniendo en el filo una inclinación tipo aguja (Fig. 2, a) para una mejor penetración, ambas puntas han dado buenos resultados. Con la finalidad de obtener más tejido, el diámetro de la punta se hizo más ancho

(7 mm) (Fig. 2, c). Para no dañar al organismo con una mayor penetración del arpón se utiliza un tope en el momento de la toma de la biopsia (fig. 2, d). Por otro lado, la técnica de obtención de la biopsia debe de ser nadando y el tiro es lateral al organismo más que perpendicular para una buena obtención de tejido.



Figura 2. Puntas para toma de biopsias.

7.3 Trabajo de laboratorio

7.3.1 Extracción del ADN

Para la extracción del ADN total de las muestras de tiburones ballena se realizaron diferentes pruebas, como el kit de extracción “Fast Prep”, fenol:cloroformo, fenol:cloroformo:alcohol isoamilico, y el de Rossel y Block (1995), ninguno de los protocolos mencionados dieron buenos resultados, finalmente el ADN total de las muestras se extrajo mediante una combinación del kit de extracción “Fast Prep” y el protocolo de fenol/cloroformo. Para macerar el tejido (0.02-0.05 g) se emplearon los tubos del kit de extracción Fast Prep realizando 3 ciclos con la centrifuga Fast Prep o se maceraron con perlas de vidrio con ayuda de un equipo de vortex. Posteriormente se dejaron digerir toda la noche a 60°C en un buffer de lisis (10mM Tris (pH 7.5), 200 mM EDTA, 1% SDS) y 0.6 mg/ml proteinasa k (Hoelzel, 2001). El ADN se extrajo con 2 lavados con fenol y uno con cloroformo (Hoelzel, 2001), seguido de su precipitación con acetato de amonio 4M frío e isopropanol frío durante toda la

noche y se lavo con etanol al 70% frío. El ADN fue resuspendido en agua ultrapura miliQ (resistibilidad a la conductividad de 18.2 mΩ) o en buffer TE (Tris-EDTA).

La extracción se corroboró mediante un gel de electroforesis al 1.5% de agarosa. A su vez se cuantificó el ADN obtenido mediante un espectrofotómetro de absorción. Con base en la cuantificación se hicieron alícuotas con 100 ng/μl de ADN, las cuales se preservaron a -20°C hasta su posterior análisis.

7.3.2 Análisis de primers

Previo a la amplificación de la región control, los primers fueron analizados mediante el programa computacional PrimerSelect de DNASTAR, analizando la alineación de los primers con secuencias del *Heterodontus francisci* (Genbank Accesion No. AJ310141) encontradas en el banco de genes GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

7.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en control positivo

La calidad del ADN se probó mediante PCR, con el objetivo de amplificar la secuencia que codifica el ARNr 28s, dado que esta secuencia es muy conservada tanto en procariotas como en eucariotas ya que en los ribosomas es el sitio donde se sintetizan las proteínas. Para PCR se emplearon los primers GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG y el GGT CCG TGT TTC AAG ACG G. Las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa fueron un paso inicial de desnaturalización a 93°C por 5 minutos y 36 ciclos de las condiciones siguientes: 93°C por 1 minuto, 52°C por un minuto y 72°C por 2 minutos. El paso final fue de 72°C por 10 minutos.

La región anterior fue empleada únicamente en las primeras muestras, ya que posteriormente se empleo como control positivo al citocromo b dado que esta secuencia ha sido empleada en diferentes tiburones incluyendo el tiburón ballena, de tal manera que se emplearon los primers: GluDG-L14724-TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG y CB6ThrH-15930- CTC

CAG TCT TCG RCT TAC AAG (Martin y Palumbi, 1993), los cuales amplifican toda la secuencia de citocromo b que de acuerdo con los autores cuenta con 1146 pb en todos los tiburones que analizaron. La amplificación se realizó en volúmenes de 50 µl con 0.5 a 1 µl de ADN (stock de 100 ng/µl), 1 µl de cada primer (stock a 10µM), 3 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP y una unidad de Taq. Las condiciones del PCR fueron: 12 minutos para desnaturalización a 94°C, seguido de 35 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C de alineación y 2 minutos a 72°C de extensión. Finalmente se dieron 10 minutos a 72°C. La amplificación se corroboró en un gel de agarosa al 1.5%

7.3.4 PCR para amplificar la región control del ADNmt

Para la amplificación de la región control del ADNmt se probaron diferentes primers. Los mencionados en Grijalva-Chon *et al.* (2003), los cuales nunca dieron una amplificación. A su vez se emplearon los primers universales mencionados en Kocher *et al.* (1989) los cuales dieron poco producto.

Con la finalidad de amplificar la región control eficazmente se trabajaron con tres juegos de primers:

- Universales para elasmobranchios: Cytb-1040 GGN CAA CCM GTY GAA CAA CC y 12 rev 326 ACT CGT ATA ACC GCG GTG GCT (Sandoval-Castillo *et al.*, 2004).
- Combinación de primers Sandoval-Castillo *et al.* (2004) y Kocher *et al.* (1989) Cytb-1040 GGN CAA CCM GTY GAA CAA CC y H00651 TAA CTG CAG AAG GCT AGG ACC AAA CCT.
- Combinación de primers Martin y Palumbi (1993) y Sandoval-Castillo *et al.* (2004). El primer empleado en Martin y Palumbi (1993) como reverso para amplificar el citocromo b, fue invertido y empleado como delantero para amplificar la región control, dado que se encuentra a un lado del citocromo b. La combinación de primers fue: ThrFTB- CTT

GTA AGR CGA AGAS CTG GAG y 12 rev 326 ACT CGT ATA ACC GCG GTG GCT (Sandoval-Castillo *et al.*, 2004).

Las primeras pruebas se realizaron en reacciones de 25 μ l con 0.5 - 1 μ l de ADN (stock de 100 ng/ μ l), 0.5 μ l de cada primer (stock a 10 μ M), 3 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP y media unidad de Taq. Las condiciones del PCR fueron: 12 minutos para desnaturalización a 94°C, seguido de 35 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C de alineación y 2 minutos a 72°C de extensión. Finalmente se dieron 10 minutos a 72°C. El PCR se corroboró en un gel de agarosa al 1.5%. En todos los casos con este PCR se obtuvieron varias bandas inespecíficas, con lo que se procedió a hacer un PCR de gradientes de temperaturas con las mismas condiciones de reactivos: la temperatura de alineamiento fue de 50°C a 62°C.

7.3.5 Aislamiento del producto de PCR

En todos los casos se obtuvo poco producto de PCR con bandas inespecíficas por lo que se aisló el producto deseado cortando la banda directamente del gel de agarosa y se purificó empleando las columnas de purificación de QIAGEN siguiendo la metodología del proveedor. Mediante esta técnica se pierde parte del producto de PCR por lo que se optó por clonar el fragmento aislado mediante un vector de clonación en células competentes *E. coli* (Invitrogen) que fueron transformadas siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos positivos fueron corroborados mediante un PCR y se les extrajo el ADN plasmídico siguiendo el protocolo convencional miniprep (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA inserto fue secuenciado en ambas direcciones utilizando los primers M13 en un secuenciador automático AB1377.

7.3.6 Análisis de secuencias y diseño de primers específicos

Del secuenciador automático se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de ambas cadenas (cadenas complementarias), de cada muestra y sus respectivos cromatogramas. Estas

secuencias fueron editadas mediante el programa Chromas. El consenso de las cadenas complementarias se realizó mediante el programa computacional SeqMan (DNASTar), donde se alinearon los cromatogramas de ambas cadenas. Posteriormente con la finalidad de corroborar la amplificación de la región control del ADNmt, se sometieron a una búsqueda de similitud con otras secuencias mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Altschul *et al.*, 1990).

Para identificar el área más polimórfica de la región control del ADNmt las secuencias fueron alineadas mediante el método clustal con el programa MegAlign. Una vez identificado el fragmento se diseñaron primers específicos para amplificarlo, esto con ayuda del programa PrimerSelect de DNASTar.

7.3.7 PCR con primers específicos.

Con la finalidad de estandarizar la PCR con los primers específicos diseñados, se realizó un PCR de gradientes de temperatura y MgCl en un volumen total de 12.5 µl. Se utilizó el primer diseñado TB31F- TGC ATG GTT TTA TGT ACG TC contra el RC-TB3R GGC AGG TGT CGG AGC TT y el TB32R- GAG CTT CAA GCC GAA ACT A. El gradiente de temperatura con el primer juego de primers fue de 50 a 64°C y en para el segundo juego fue de 54 a 66°C. A su vez el gradiente de MgCl para cada temperatura fue de 1, 2 y 3 mM de MgCl. Las condiciones del PCR (0.37 con 1 µl de ADN, stock de 100 ng/µl), 0.25 µl de cada primer (stock a 10µM), 100 µM de cada dNTP y 0.06 µl de Taq (1U/ µl) permanecieron constantes. Las condiciones del PCR fueron: 12 minutos para desnaturalización a 94°C, seguido de 35 ciclos: 45 segundos a 94°C, 45 segundos 50-66°C de alineación y 45 segundos a 72°C de extensión. Finalmente se dieron 10 minutos a 72°C. El PCR se corroboró en un gel de agarosa al 1.5%. La temperatura óptima para el primer juego de primers fue de 61°C mientras que la del segundo juego fue de 63°C. Por su parte, la concentración de MgCl fue de 1.5 mM. El producto de PCR fue de muy buena calidad y con una alta concentración, por lo

que con estas condiciones se amplificaron todas las muestras y se secuenciaron en ambas direcciones utilizando los primers específicos en un secuenciador automático AB1377.

7.3.8 Análisis del polimorfismo del ADNmt

Las secuencias obtenidas del secuenciador fueron editadas de igual manera como la descrita anteriormente y además se editaron todas las secuencias al mismo sitio de inicio y fin.

Una vez editadas las secuencias, se realizó un alineamiento con el programa MegAlign (DNASStar) mediante el método clustal y se determinó la distancia de alineación, con lo que se determino el número de haplotipos.

Mediante el programa computacional PAUP (Swofford, 1998) se realizó un análisis filogenético con cada haplotipo único usando distancias gamma (0.5, 1) basado en el modelo de Tamura-Nei y el algoritmo de vecino mas cercano (NJ, por sus siglas en inglés, neighbor joining). El resultado de la topología del árbol construido fue analizado mediante bootstrap (1000 replicas). La secuencia de región control del tiburón perro *Heterodontus francisci* (Genbank Accesion No. AJ310141) se alineó con el programa MegAlign (DNASStar) con la secuencia completa TB3 con la finalidad de ubicar el sitio de inicio y final de la secuencia analizada obtenida con los primers específicos, una vez ubicado, la secuencia de *Heterodontus* se corto al mismo inicio y fin del resto para la construcción del árbol, una vez lista esta secuencia fue empleada como grupo externo en la construcción del árbol.

Con la finalidad de ilustrar las interrelaciones entre los haplotipos, las cuales no son tan evidentes en el árbol filogenético, se realizo una red informática con todos los haplotipos encontrados, mediante el programa computacional network 4.1 (Bandelt *et al.*, 1999).

Los análisis estadísticos como el número de sitios polimórficos, número de transiciones, transversiones, deleciones e inserciones, así como la composición nucleotídica fueron calculados mediante el programa computacional Arlequín 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

7.3.9 Diversidad haplotípica.

La diversidad haplotípica (h) es la probabilidad de que dos haplotipos seleccionados al azar sean el mismo. Se calculó de acuerdo con la fórmula de Nei (1987). Se corroboró mediante el programa computacional Arlequín 2.0 (Schneider *et al.*, 2000), utilizando distancias gamma y el modelo de Tamura-Nei.

$$h = 1 - \sum_{i=1}^j p_i^2$$

Donde j es el número de haplotipos diferentes y p la frecuencia de los haplotipos

La diversidad haplotípica sin N es :

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^j p_i^2 \right)$$

Donde n es el número de copias de genes (haplotipos) en la muestra.

7.3.10 Diversidad nucleotídica.

La diversidad nucleotídica (π) es la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos seleccionados al azar de la muestra sean diferentes. Se calculó por medio de la fórmula de Nei (1987) mediante el programa computacional Arlequín 2.0 (Schneider *et al.*, 2000), utilizando distancias gamma y el modelo de Tamura-Nei

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L} \quad V(\hat{\pi}_n) = \frac{n+1}{3(n-1)L} \hat{d} + \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)} \hat{d}^2$$

Donde \hat{d}_{ij} es el número de mutaciones por nucleótido estimadas que han ocurrido desde la divergencia de los haplotipos i y j, k es el número de haplotipos y p_i es la frecuencia del haplotipo i. L es el número de nucleótidos en la secuencia.

7.3.11 Estructura poblacional.

Se realizó un análisis de variancia molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés) (Excoffier *et al.*, 1992) mediante el programa computacional Arlequín 2.0 (Schneider *et al.*, 2000), para examinar en mayor detalle la concordancia entre las distancias genéticas y las diferentes regiones geográficas del Golfo de California.

En este análisis, los individuos son asignados a poblaciones y las poblaciones son anidadas en grupos basados en un criterio no genético; en este caso, la localización geográfica de la muestra. Para el presente estudio se asignó un solo grupo: el Golfo de California con tres poblaciones (BLA, BLP y BG). El análisis de AMOVA calcula los componentes de variancia genética y un análogo a la F-estadística jerárquica, la FST y prueba la significancia de la variancia observada mediante el método de permutaciones (Schneider *et al.*, 2000). Este análisis es determinado comparando valores a una distribución nula de 100 muestras generadas permutando los haplotipos entre poblaciones.

7.3.12 PCR para amplificar los genes del complejo de Histocompatibles I o II

Para la amplificación de los genes histocompatibles se probaron diferentes primers (Otha *et al.*, 2000). A su vez se emplearon los primers para DRB (MHC clase II), el juego de primers

F-GH46 y el R-AMP-B, y el juego de F-GH46 y R-GH50. La amplificación se realizó en volúmenes de 50 μ l con 0.5 a 1 μ l de ADN (stock de 100 ng/ μ l), 1 μ l de cada primer (stock a 10 μ M), 3 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP y una unidad de Taq. Las condiciones del PCR fueron: 12 minutos para desnaturalización a 94°C, seguido de 35 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C de alineación y 2 minutos a 72°C de extensión. Finalmente se dieron 10 minutos a 72°C. El producto de PCR se corroboró en un gel de agarosa al 1.5%. Debido a las condiciones y a lo inespecífico de los primers se obtuvieron muchas bandas las cuales se aislaron mediante clonación. El producto de PCR fue ligado y clonado directamente en el vector de clonación (TOPO vector, Topo TA cloning), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos positivos fueron corroborados mediante un PCR, para lo cual se obtuvo una muestra por punción de una de las clonas positivas y se enjuagó en 10 μ l de agua miliQ. Las células se lisaron mediante shock térmico a 96°C durante 5 minutos y posteriormente se colocaron en hielo. Se utilizaron 5 μ l como templado en el PCR con las condiciones mencionadas. El producto de PCR fue corroborado mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1.5%.

La amplificación del DRB se envió para su secuenciación a MacroGen (www.macrogen.com). Las secuencias fueron sometidas a una búsqueda de similitud con otras secuencias con BLAST (Basic local alignment search tool, GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Altschul *et al.*, 1990) para corroborar la amplificación del DRB.

8. Resultados.

8.1 Observaciones en campo y foto identificación.

En total se obtuvieron 43 muestras de piel de tiburón ballena (biopsias), de las cuales 2 se obtuvieron de organismos varados y 41 de organismos vivos. En julio del 2001 en Punta Arenas (60 Km al Sureste de La Paz), se varó una hembra de 11.3 m, de la cual se obtuvieron muestras de músculo, piel y cartílago (proporcionadas por J. Ketchum, CICIMAR, La Paz, BCS), las muestras se colocaron en alcohol etílico absoluto y se congelaron. En Bahía de Los Ángeles en noviembre de 2002 se varó una hembra de aproximadamente 4 m, se tomaron muestras de piel, músculo y cartílago (proporcionadas por A. Resendiz y J. Nelson), dichas muestras estuvieron en formol durante aproximadamente 4 días y posteriormente se colocaron en alcohol etílico absoluto y se congelaron.

De las 41 muestras obtenidas de tiburones vivos, 13 fueron de tiburones encontrados en el área aledaña al Mogote en la Bahía de La Paz (BLP), 5 de Bajo Gorda (BG) y 23 de Bahía de Los Ángeles (BLA).

8.1.1 Descripción de los tiburones encontrados en la Bahía de la Paz.

En la BLP solo se tienen muestras de organismos juveniles. En octubre de 2002 se obtuvo la muestra de un organismo de 2-3m de largo (LT) y en noviembre del mismo año otros dos organismos, una hembra y un macho de 4 y 3 metros (LT), respectivamente. En diciembre de 2003 se obtuvo la muestra de 3 individuos de 2.5, 5 y 4 metros (LT), respectivamente, siendo los dos primeros machos y del tercero no fue posible determinar el sexo.

En noviembre de 2004 se obtuvieron muestras de 7 individuos: 4 hembras y 3 machos. Las tallas de las hembras fueron de 2 a 5 metros (LT), mientras que las de los machos de 4.5 a 6.5 metros (LT).

En abril de 2005 se obtuvieron muestras de 4 individuos machos cuyas tallas (LT) fueron de 2 a 6.5 metros. Las muestras de abril de 2005 quedaron fuera del análisis genético.

En total se obtuvieron 15 muestras de tiburones ballena de la Bahía de La Paz, de los cuales 5 fueron hembras, 8 machos y 2 de sexo no determinado. De tal manera que la proporción sexual fue de 1 macho:0.62 hembra (Tabla I).

Tabla I. Características obtenidas de los tiburones ballena de BLP para su identificación. LT=longitud total, AD1= Altura de la primera aleta dorsal, ni= no identificado, nd= no dato.

Org.	Localidad	sexo	Fecha	LT (m)	AD1 (cm)
BLP01TB03	Mogote	ni	23/oct/02	~ 2	nd
BLP02TB04	Mogote	macho	14 /nov/ 02	4	45
BLP03TB05	Mogote	hembra	15/nov/ 02	~ 3	nd
BLP04TB27	Mogote	macho	12/dic/03	~ 2	32
BLP05TB28	Mogote	macho	12/dic/03	5	45
BLP06TB29	Mogote	ni	21/dic/03	~ 4	35
BLP07TB36	Mogote	hembra	20/nov/04	3.5-4	nd
BLP08TB37	Mogote	hembra	21/nov/04	2.5	35
*BLA18BLP09TB30, recap.	Mogote	hembra	21/nov/04	4-5	nd
BLP10TB38	Mogote	hembra	21,22/nov/04	2.5-3	38
*BLP11TB39, recap.	Mogote	Macho	22/nov/04	4.6	45
*BLA03BLP12TB13, recap.	Mogote	Macho	22,23/nov/04	6.5	57
BLP13TB40	Mogote	Macho	22,23/nov/04	5.5-6	46
*BLP11TB39, recap.	Mogote	macho	16/abril/05	4.65	45
BLP14TB41	Mogote	macho	16/abril/05	~ 3	nd
BLP15TB42	Mogote	macho	16/abril/05	5	50-60
*BLA03BLP12TB13, recap	Mogote	macho	16/abril/05	6.5	57

8.1.2 Descripción de los tiburones encontrados en Bahía de los Ángeles.

Al igual que en la BLP, en BLA sólo se encontraron tiburones juveniles. En 2003 se tomaron biopsias de 16 tiburones de los cuales 6 fueron hembras, 9 machos y de un organismo no fue posible determinar el sexo. La talla de las hembras fue de 5-6 metros (LT), y la de los machos de 4 a 7.5 metros (LT).

En 2004 se encontraron 11 tiburones, de los cuales 5 fueron hembras, 5 machos y uno al que no se le determinó el sexo. La talla de las hembras osciló entre 5-6.5 m (LT) mientras que en

machos fue 3.5-7.5 (LT). Cabe mencionar que con base en la foto-identificación se obtuvieron recapturas de 4 individuos (2 hembras y 2 machos) en 2003 y 2004.

En total se obtuvieron 23 muestras de tiburón ballena de BLA de las cuales 9 fueron hembras, 12 machos y dos de los que se desconoce el sexo (Tabla II). La proporción sexual fue de 1 macho:0.75 hembra.

Tabla II. Características obtenidas de los tiburones de BLA para su identificación. LT=longitud total, AD1= Altura de la primera aleta dorsal, ni= no identificado, nd= no dato.

Org.	sexo	Fecha	LT (m)	AD1 (cm)
BLA01TB11	hembra	22,23/oct/04	5.5-6	42
BLA02TB12	hembra	22/oct/03	5	39
* BLA03BLP12TB13	macho	22/oct/03	5.5	55
BLA04TB14	macho	22/oct/03	5.5	nd
BLA05TB15	macho	22/oct/03	4	30
BLA06TB16	macho	22/oct/03	4.5	38
BLA07TB17	hembra	22/oct/03	6.5	41
BLA08TB18	macho	22/oct/03	7.5	nd
BLA09TB19	macho	23, 28/oct/04	7.5	40-45
BLA10TB20	macho	23/oct/03	7.5	nd
BLA11TB21	hembra	23/oct/03	5	41
BLA12TB22	hembra	24/oct/03	6	nd
BLA13TB23	macho	24/oct/03	5	37
BLA14TB24	macho	10,24,27/oct/03	6	40
BLA15TB25	hembra	27/oct/03	6	39
BLA16TB26	ni	28/oct/03	5.5	nd
* BLA01TB11, recaptura	hembra	18/oct/04	6.3	157
* BLA07TB17, recaptura	hembra	18/oct/04	6.5	52
* BLA04TB14, recaptura	macho	18/oct/04	6	40
BLA18BLP09TB30	hembra	18,20/oct/04	5-5.5	41-48
BLA24TB41	macho	18/oct/04	7.5	nd
BLA19TB31	macho	19/oct/04	5	42
* BLA09TB19, recaptura	macho	20-/oct/04	6-6.5	52
BLA20TB32	hembra	19/oct/04	5	31
BLA21TB33	hembra	19/oct/04	6.5	48
BLA22TB34	ni	20/oct/04	5.5	nd
BLA23TB35	macho	20/oct/04	3.5	23

Considerando de manera conjunta a los tiburones observados en BLP y BLA tenemos una proporción sexual total de tiburones juveniles de 1macho:0.78hembra.

8.1.3 Descripción de los tiburones encontrados en Banco Gorda.

En junio de 2003 se visitó Banco Gorda, donde se encontraron 5 hembras adultas (grávidas), cuya talla osciló entre 9 y 12 metros (LT) (Tabla III).

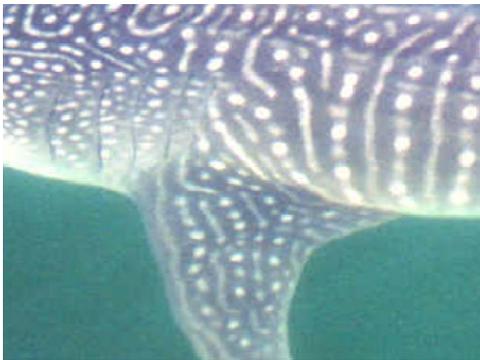
Tabla III. Características obtenidas de los tiburones de BG para su identificación. LT=longitud total, AD1= Altura de la primera aleta dorsal, ni= no identificado, nd= no dato.

Org.	sexo	fecha	LT (m)	AD1 (cm)
BG01TB06	hembra	10/jun/03	~ 12	100
BG02TB07	hembra	10/jun/03	~ 9	nd
BG03TB08	hembra	11/jun/03	~ 12	105
BG04TB09	hembra	11/jun/03	~ 11	97
BG05TB10	hembra	11/jun/03	11.45	95

8.1.4 Foto-identificación

Los organismos fueron foto-identificados con la finalidad de evitar la obtención de muestras del mismo organismo. Esto permite a su vez evaluar aquellas áreas importantes para la foto-identificación, además de las cicatrices, mordidas, talla y sexo, con lo que se construyó un catálogo para la foto-identificación de los tiburones ballena observados durante el estudio (CD Anexo), utilizando el patrón de coloración de la parte posterior de las aberturas branquiales del lado izquierdo (Taylor, 1994) y/o el patrón de coloración de la aleta dorsal, así como de cicatrices y golpes (Fig. 3 y 4).

Con base en la foto-identificación se obtuvieron cuatro recapturas en BLA de tiburones primero observados en 2003 y recapturados en 2004 (ver, catálogo foto-identificación, CD Anexo). Por su parte en BLP se recapturaron en 2005 dos tiburones foto-identificados en 2004 (ver, catálogo foto-identificación, CD Anexo). Entre estas dos localidades se tienen dos recapturas: 1) un tiburón foto-identificado en BLA en octubre de 2003 y recapturado en BLP en noviembre de 2004, y 2) una hembra observada en BLA en octubre de 2004 y recapturada en BLP en noviembre de 2004, con solo un mes de diferencia (Fig. 5).



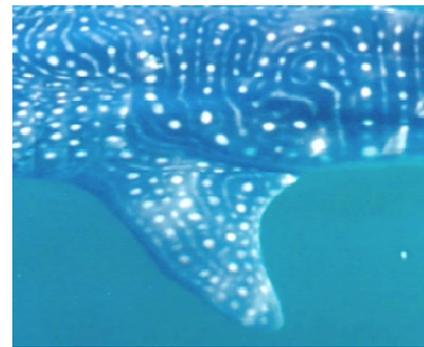
BLA06'TB16



BLA09'TB19



BLA05'TB15



BLA03BLP12'TB13

Figura 3. Ejemplo del catálogo de los tiburones foto-identificados en Bahía de Los Ángeles en octubre de 2003.

Para la identificación de los tiburones ballena además de considerar la foto-identificación también se tomó en cuenta las características de cada tiburón obtenidas en el campo (Tabla I, II y III) como el sexo, longitud total (LT), altura de la primer aleta dorsal (AD1), la localidad, la fecha y las observaciones donde se mencionan aquellos rasgos distintivos de cada tiburón como una cicatriz, la falta de una aleta, algún patrón de coloración distintivo, etc., que nos permite identificarlo y así evitar la toma de muestras del mismo organismo varias veces.



BGTB06



BGTB09

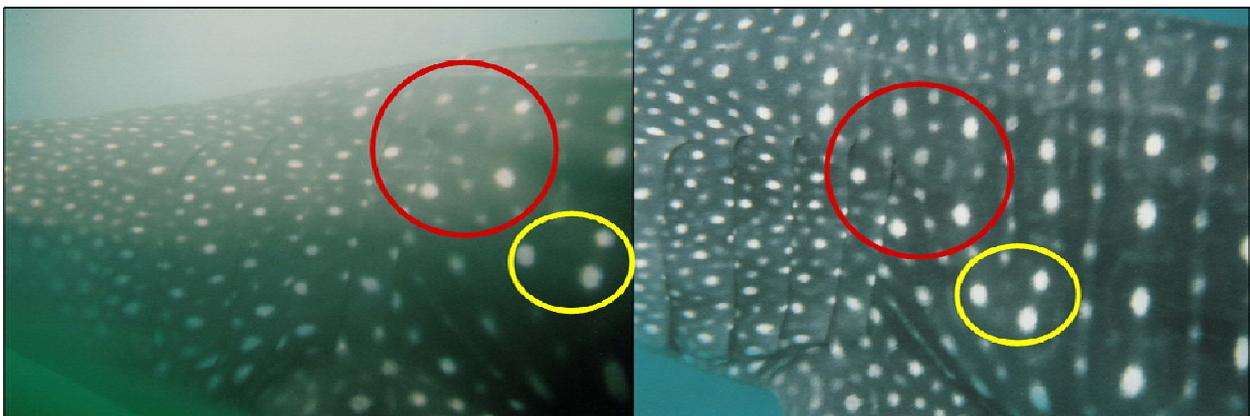


BGTB07



BGTB10

Figura 4. Ejemplo del catálogo de los tiburones foto-identificados en Banco Gorda en junio de 2003.



a)

b)

Figura 5. Hembra de 5 m observada en a) BLA en octubre de 2004 y recapturada en b) BLP en noviembre de 2004.

8.2 Trabajo de laboratorio.

8.2.1 Extracción de ADN.

Se analizaron varias técnicas de extracción para la obtención de ADN genómico, de acuerdo a los resultados obtenidos en el gel de electroforesis y a los análisis cuantitativos en el espectrofotómetro y a la determinación de pureza de acuerdo a la absorbancia registrada (260nm/280nm) el mejor método de extracción fue el desglosado en la metodología, obteniéndose entre 400 y 800 ng/ μ l de ADN genómico con una absorbancia de 1.8 a 260nm/280nm normalmente. La figura 6 muestra el ADN total obtenido de 3 tiburones (BLA15TB25, BLA13TB23, BLA04TB14) y el stock de trabajo preparado a 100ng/ μ l.

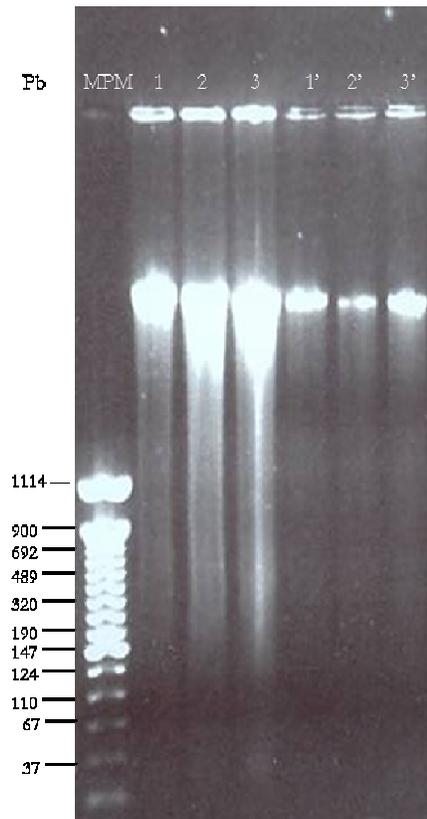


Figura 6. ADN total obtenido de 3 tiburones (1=BLA15TB25, 2=BLA13TB23, 3=BLA04TB14) y las alícuotas de trabajo preparadas a menor concentración (100ng/ μ l) (1'=BLA15TB25, 2'=BLA13TB23, 3'=BLA04TB14). MPM=marcador de peso molecular. Pb=pares de bases.

8.2.1 PCR en control positivo

De acuerdo con Martin y Palumbi (1993) el tamaño del citocromo b en tiburones es de 1146 pb. La amplificación obtenida mediante el PCR fue muy similar, se obtuvo una sola banda de buena calidad. La figura 7 muestra el gel de electroforesis.

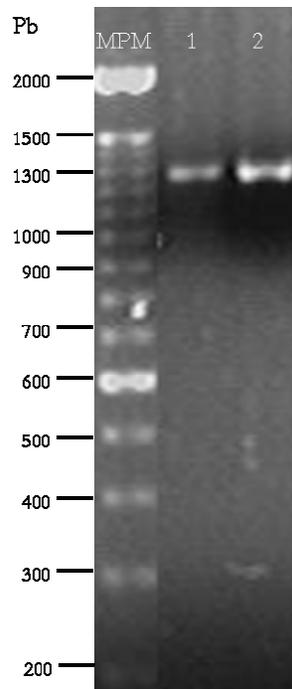


Figura 7. Producto de PCR con primer para amplificación del citocromo b. 1=BLA15'TB25, 2=BLA13'TB23, Pb= pares de bases, MPM=Marcador de peso molecular.

8.2.2 PCR para amplificar la región control del ADNmt

De los tres primers, con los que se obtuvieron los mejores productos fue con los universales para elasmobranquios (Sandoval-Castillo *et al.*, 2004) y con la combinación de primers de Martin y Palumbi (1993) invertido y Sandoval-Castillo *et al.* (2004). Sin embargo, se obtuvieron bandas inespecíficas. Con la combinación primers de Sandoval-Castillo *et al.* (2004) y Kocher *et al.* (1989) se obtuvo una sola banda pero con poco producto (Fig. 8). De acuerdo con las secuencias de la región control de tiburones encontradas en el banco de

genes, el fragmento es aproximadamente de 1500-1800 pb. Los productos obtenidos entraron en este rango con variaciones lo cual puede deberse a la localización de donde se alinea el primer. La figura 8 muestra el producto de PCR de gradientes de temperatura con ambos primers, del 1 al 5 son los primers mencionados en Sandoval-Castillo *et al.* (2004) y del 6 al 10 la combinación de primers de Martin y Palumbi (1993) invertido y Sandoval-Castillo *et al.* (2004), el gradientes de temperatura fue de 56, 58, 60 62 y 64, se ve que el mejor producto es de 60°C para los primers de Sandoval-Castillo *et al.* (2004) y de 58°C los primers de Martin y Palumbi (1993) invertido y Sandoval-Castillo *et al.* (2004).

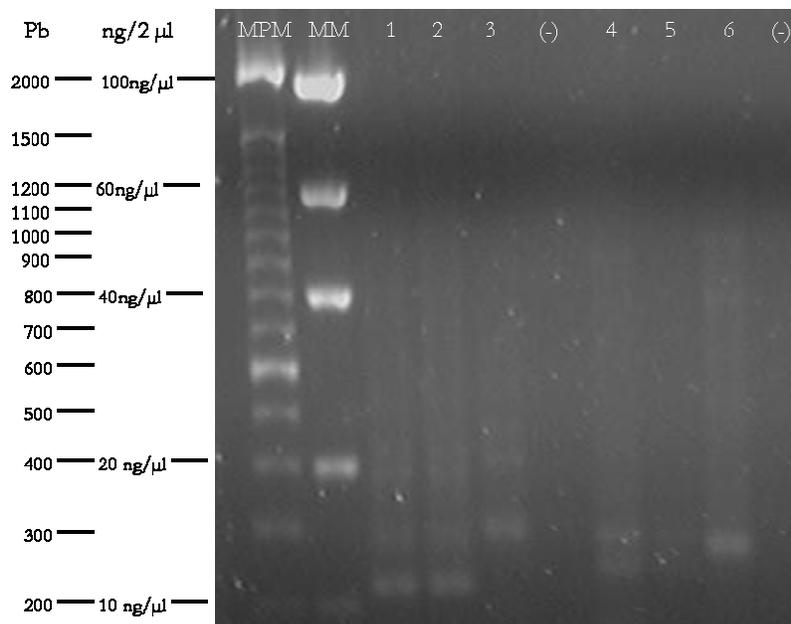


Figura 8. Producto de PCR de gradientes de temperatura con ambos primers, del 1 al 5 son los primers mencionados en Sandoval *et al.* (2004) y del 6 al 10 la combinación de primers de Martin y Palumbi (1993) invertido y Sandoval *et al.* (2004). El gradiente de temperatura fue de 56°, 58°, 60°, 62° y 64°C. Pb=pares de bases. MPM= marcador de peso molecular. MM=marcador de masa molecular.

8.2.3 Análisis de secuencias y diseño de primers específicos

Se secuencio la región control del ADNmt de 4 diferentes organismos. Mediante BLAST se pudo corroborar la amplificación de esta región, junto con parte del Citocromo b y del 12s

del ADNmt. En total se amplificaron 1846 pares de bases (pb), de las cuales correspondieron 232 pb al citocromo b, 232 pb al ARNt Phe y 1200 pb a la región control del ADNmt.

El análisis con el BLAST a su vez mostró la alta homología que presentó el citocromo b y el ARNt Phe con el de otros elasmobranquios y la casi nula homología de la región control del ADNmt con otros elasmobranquios. Con el organismo que se obtuvo mayor homología fue el *Heterodontus francisci* la cual correspondió al 91% de homología en 232 pb correspondientes al ARNt Phe, el 86% de 232 pb correspondientes al Citocromo b y ARNt- Thr, 90% en 62 pb de las 1200 pb región control del ADNmt, 88% con 61 pb pertenecientes al ARNt-Pro y el 88% de 44 pb pertenecientes a ARNt-Pro.

Mediante el alineamiento de las secuencias se determinaron las 580 pb más polimórficas de la región control del ADNmt, los primers se diseñaron para amplificar este fragmento compuesto por 728 pb. La figura 9 muestra el mapa de la secuenciación, el cual se obtuvo con base en la referencia de la secuencia de *Heterodontus francisci*. Se puede ver que junto con la región control del ADNmt se aislaron bases que corresponden al citocromo b y al ARNt Phe. Las bases que se encuentran enmarcadas representan los primers diseñados que encierran las 580 pb más polimórficas de la región control del ADNmt.

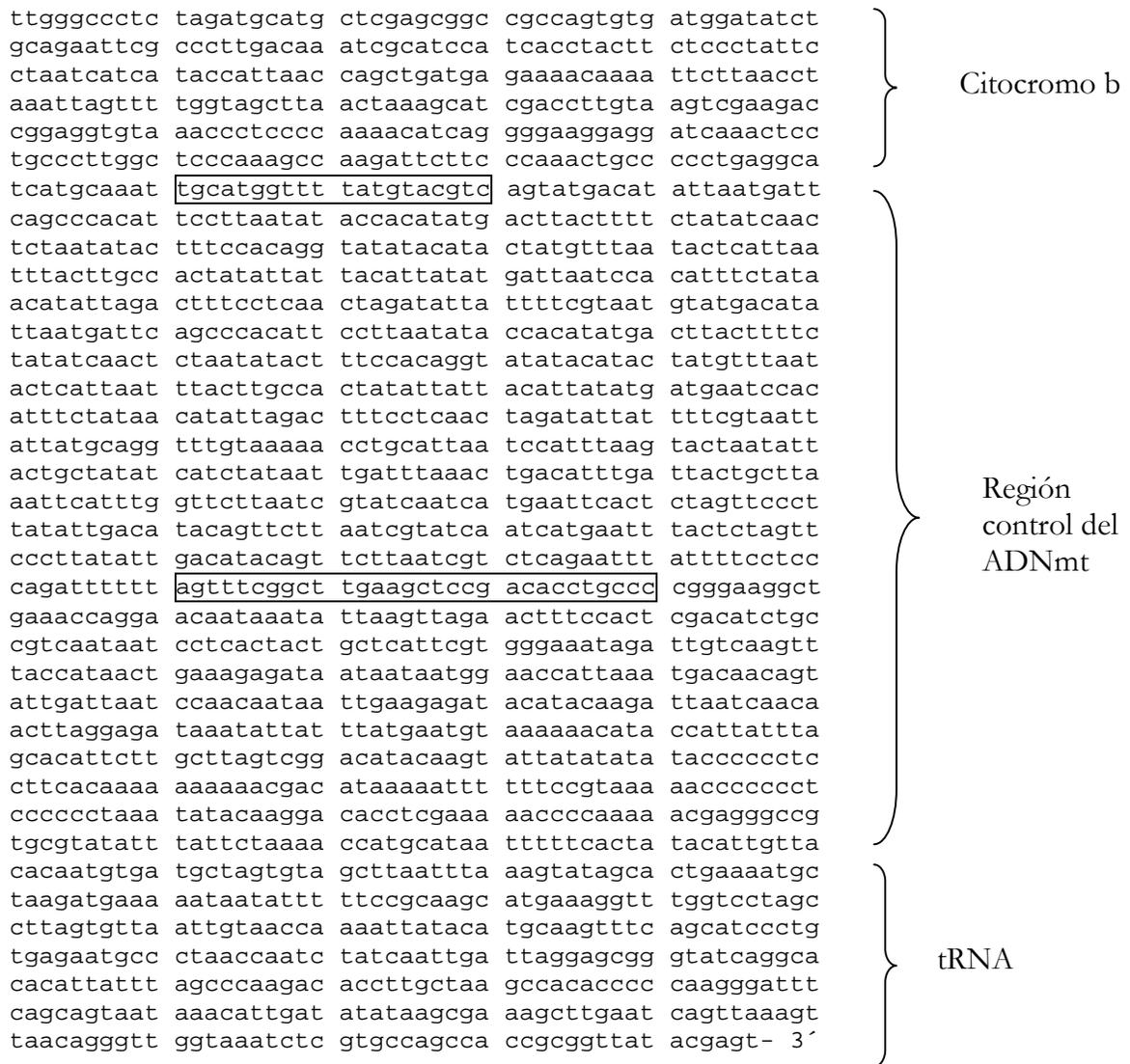


Figura 9. Mapa de secuencia tomando a *Heterododontus* como referencia. Junto con la región control del ADNmt se aislaron bases que corresponden al Citocromo b y al ARNt Phe. Las bases que se encuentran enmarcadas representan los primers diseñados que encierran las 580 pb más polimórficas de la región control del ADNmt.

8.2.4 Análisis del polimorfismo del ADNmt

De las 43 muestras solo se obtuvieron 39 secuencias, ya que el ADN del organismo varado en Punta Arenas estaba fragmentado, por lo que no se obtuvo amplificación de la muestra y la calidad del ADN de una muestra de BLA (BLA02TB12) fue baja para la secuenciación, las

otras dos muestras corresponden a los organismos de 2005 por lo que no se incluyeron en el análisis genético. De las secuencias analizadas, el tamaño del fragmento de la región control vario entre 600 pb y 711 pb, siendo en la mayoría de los casos un fragmento de 602 pb. La composición nucleotídica del fragmento fue de 18.52% citosina, 41.45% timina, 32.58%, adenina, 7.45% guanina. El análisis de secuencias reveló 181 sitios polimórficos conformados por 48 sustituciones (31 transiciones, 17 transversiones), y 137 indels (inserciones/delecciones) presentes en tres sitios, resultando en 17 haplotipos (Tabla IV). Cabe mencionar que estas sustituciones se debieron principalmente a los haplotipos RC12 y RC32, ya que se volvió a correr el programa sin estos y se determinaron únicamente 18, a su vez los indels también disminuyeron a 15 al eliminar estos haplotipos.

Tabla IV. Sitios polimórficos

	4	9	9	5	6	6	6	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	9	9	0	0	N	
Consenso	C	T	T	G	G	T	G	A	T	A	G	T	T	C	A	G	C	C	T	A	T	C	C	
RC11	3
RC12	.	.	C	.	A	C	C	T	C	T	A	C	A	T	.	T	T	A	G	T	C	T	G	1
RC13	.	.	.	A	5
RC15	T	C	.	.	.	2
RC16	C	.	.	.	1
RC20	3
RC21	T	A	.	.	C	3
RC24	C	.	.	.	5
RC28	C	.	.	.	1
RC32	.	.	C	.	A	C	C	T	C	T	A	C	A	T	.	T	T	A	G	T	C	T	G	1
RC33	C	.	.	.	1
RC41	C	.	.	.	1
RC5	.	C	A	.	T	C	1
RC6	T	8
RC7	.	.	Y	C	.	.	.	1
TB3	C	.	.	.	1
TB4	T	G	.	.	.	C	1

39

Tabla IV. Sitios polimórficos (continuación).

	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	6	6	
	1	1	1	1	2	2	2	2	3	4	5	6	0	1	2	7	8	9	9	1	1	4	2	4	
	2	4	7	9	1	2	3	9	2	9	7	8	0	6	2	3	4	8	9	0	3	5	7	2	N
Consenso	G	C	A	T	T	T	C	C	C	T	T	T	T	T	A	G	C	A	G	A	T	C	T	A	
RC11	3
RC12	T	T	T	G	A	A	T	.	T	-	C	.	C	G	1
RC13	5
RC15	C	.	.	A	2
RC16	C	C	1
RC20	3
RC21	C	3
RC24	C	.	C	C	5
RC28	1
RC32	T	T	T	G	A	A	T	T	.	-	.	.	C	.	.	.	T	1
RC33	1
RC41	C	.	C	C	C	1
RC5	C	C	.	.	G	.	.	C	G	.	.	1
RC6	C	8
RC7	C	.	.	C	G	1
TB3	C	.	.	.	G	C	1
TB4	C	R	W	1

39

En la posición 172 (Tabla V), se encontró el indel 1, donde 6 haplotipos (RC12, RC16, RC24, RC32, RC41, RC5) tuvieron una inserción, en tres de ellos (RC16, RC24, RC41) fue la misma inserción constituida por 10 pb, dos de ellos (RC12 y RC32) a su vez compartieron una inserción de 75 pb y finalmente una única inserción en un haplotipo (RC5) de 91 pb.

Tabla V. Indel 1.

	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	
	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	N
Consenso	T	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RC11	3
RC12	.	.	.	T	A	T	.	C	A	T	T	A	1
RC13	5
RC15	2
RC16	.	.	A	T	G	T	A	C	G	T	C	A	1
RC20	3
RC21	3
RC24	.	.	A	T	G	T	A	C	G	T	C	A	5
RC28	1
RC32	.	.	.	T	A	T	.	T	A	T	T	A	1
RC33	1
RC41	.	.	A	T	G	T	A	C	G	T	C	A	1
RC5	.	.	T	T	A	T	G	C	G	T	T	A	1
RC6	8
RC7	-	-	1
TB3	-	-	1
TB4	1
													39

Esta inserción estuvo seguida de un buen alineamiento a partir de la posición 284 a excepción de los haplotipos RC12 y RC32 que continuaron con sitios polimórficos (Tabla IV), en el alineamiento inmediato a la inserción, presentaron una delección de 17 pb (Tabla VI) en la posición 339 hasta la 355, y fue hasta la posición 356 donde hubo un buen alineamiento con el resto de las secuencias.

Tabla VI. Delección encontrada en las secuencias 12 y 32.

	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	N	
	6	0	0	0	0	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	
	6	0	1	2	3	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4	5	
Consenso	A	T	A	T	A	A	T	A	C	T	T	T	C	C	A	A	G	G	T	A	T	
RC11	3
RC12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
RC13	5
RC15	2
RC16	1
RC20	3
RC21	3
RC24	5
RC28	1
RC32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
RC33	1
RC41	1
RC5	1
RC6	8
RC7	1
TB3	1
TB4	1
																						39

El siguiente indel (indel 2) fue de la posición 423 hasta la 443, el cual divide a las secuencias en 3 grupos: 4 haplotipos (RC13, RC20, RC28, RC5) que comparten una inserción de 13 pb de la posición 427-439. 7 haplotipos (RC12, RC32, RC15, RC21, RC33, RC6, TB4) que comparten una delección de 17 pb de la posición 423 - 439 y 5 haplotipos (RC16, RC24, RC41, RC7, TB3) que comparten una delección de 17 pb de la posición 427- 443 (Tabla VII).

Tabla VII. Indel 2.

	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	N	
	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4		
	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3		
Consenso	C	A	T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
RC11	3	
RC12	1	
RC13	A	T	A	T	G	A	T	C	T	T	C	C	A	C	A	T	T	5	
RC15	2	
RC16	-	-	-	-	C	A	T	T	1	
RC20	A	T	A	T	G	A	T	C	T	T	C	C	A	C	A	T	T	3	
RC21	3	
RC24	-	-	-	-	C	A	T	T	5
RC28	A	T	A	T	G	A	T	C	T	T	C	C	A	C	A	T	T	1	
RC32	1	
RC33	1	
RC41	-	-	-	-	C	A	T	T	1
RC5	A	T	A	T	G	A	T	C	T	T	C	C	A	C	A	T	T	1	
RC6	8	
RC7	-	-	-	-	C	A	T	T	1
TB3	-	-	-	-	C	A	T	T	1
TB4	1	
																						39	

El haplotipo más frecuente (RC6) se presentó en las tres localidades, 5 haplotipos frecuentes (RC20, RC21, RC11, RC13, RC24) se encontraron presentes en Bahía de Los Ángeles y Bahía de La Paz, de los cuales los haplotipos RC24 y RC13 se encontraron con alta frecuencia. De los 14 haplotipos presentes en BLA, 8 haplotipos (RC12, RC15, RC16, TB3, RC32, RC33, TB4, RC28) fueron únicos al área. De los 7 haplotipos encontrados en BLP, sólo 1 fue único (RC41). En las 5 hembras adultas presentes en BG se encontraron 3 haplotipos, donde el más frecuente fue el haplotipo común entre las 3 localidades (RC6) y 2 haplotipos únicos (RC5 Y RC7) (Tabla IX). La figura 10 muestra en porcentaje la frecuencia de los haplotipos en cada localidad y los haplotipos comunes entre las mismas.

Tabla VIII. Distribución geográfica de los haplotipos de región control encontrados en las muestras de tiburón ballena del Golfo de California

Haplotipo	Secuencia	BLA	BLP	GB
1	RC20	2	1	0
2	RC21	1	2	0
3	RC5	0	0	1
4	RC6	2	3	3
5	RC7	0	0	1
6	RC11	2	1	0
7	RC12	1	0	0
8	RC13	2	3	0
9	RC15	2	0	0
10	RC16	1	0	0
11	RC24	3	2	0
12	TB3	1	0	0
13	RC32	1	0	0
14	RC33	1	0	0
15	RC41	0	1	0
16	TB4	1	0	0
17	RC28	1	0	0

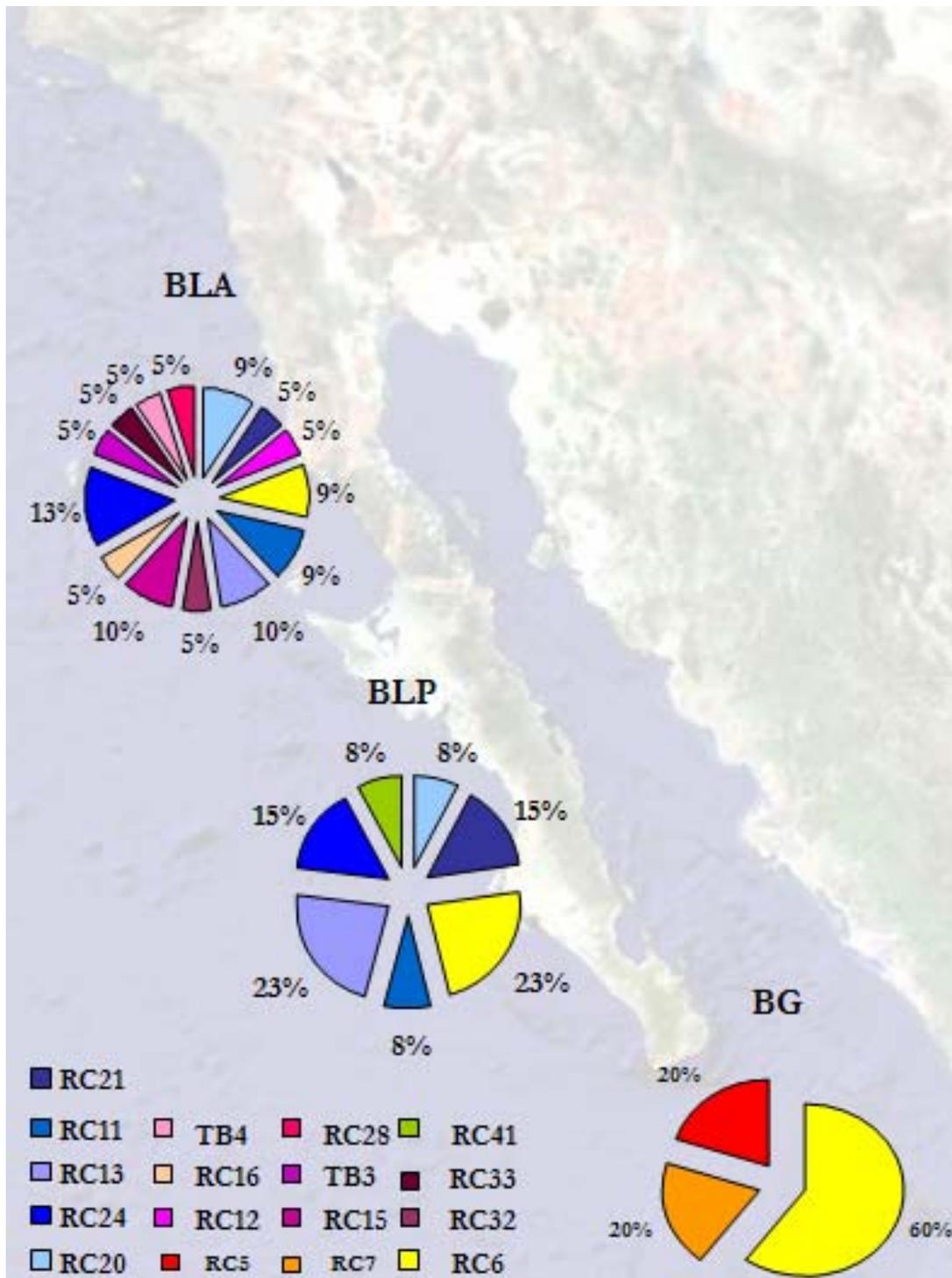


Figura 10. Frecuencia de haplotipos en las tres localidades. El haplotipo RC6 fue el más frecuente y se encontró en las tres localidades. Cinco haplotipos se encontraron presentes tanto en BLA como en BLP. En BLA (n=21) ocho haplotipos fueron únicos. En BLP (n=13) un solo haplotipo único. En BG (n=5) el haplotipo más frecuente fue el RC6, junto con 2 haplotipos únicos.

El árbol filogenético (Fig. 11) generado por la aplicación del algoritmo neighbor-joining mostró cuatro clados que representan diferentes linajes de haplotipos referidos como A, B, C y D, los cuales están soportados por valores de bootstrap moderados y es evidente que no se están agrupados con base a las localidades.

En la base del árbol tenemos al clado A compuesto por los haplotipos TB4, RC15, RC6, y RC21, el cual representa el linaje basal o ancestral, seguido por los clados B (RC16, TB3, RC24 y RC41), C (RC11, RC13 y RC20) y D (RC12 y RC32), esto por la cercanía a la secuencia de *Heterodontus*. La distancia entre estos haplotipos, con respecto al grupo fuera fue la mas alta de acuerdo con el alineamiento mediante bootstrap con el programa computacional MegAlign (DNASar) el cual fue de 87.9. Se ve claramente como el clado D además de ser el más lejano representan un grupo monofilético. Podemos ver como los haplotipos RC5, RC33, RC28, RC7 no están resueltos, aunque aparentemente el RC7 esta relacionado con los haplotipos RC12 y RC32 el valor de bootstrap de 50 indica que solo lo es con una certeza del 50%. Por su parte la red de informática muestra su cercanía al grupo B (Fig. 12 y 13).

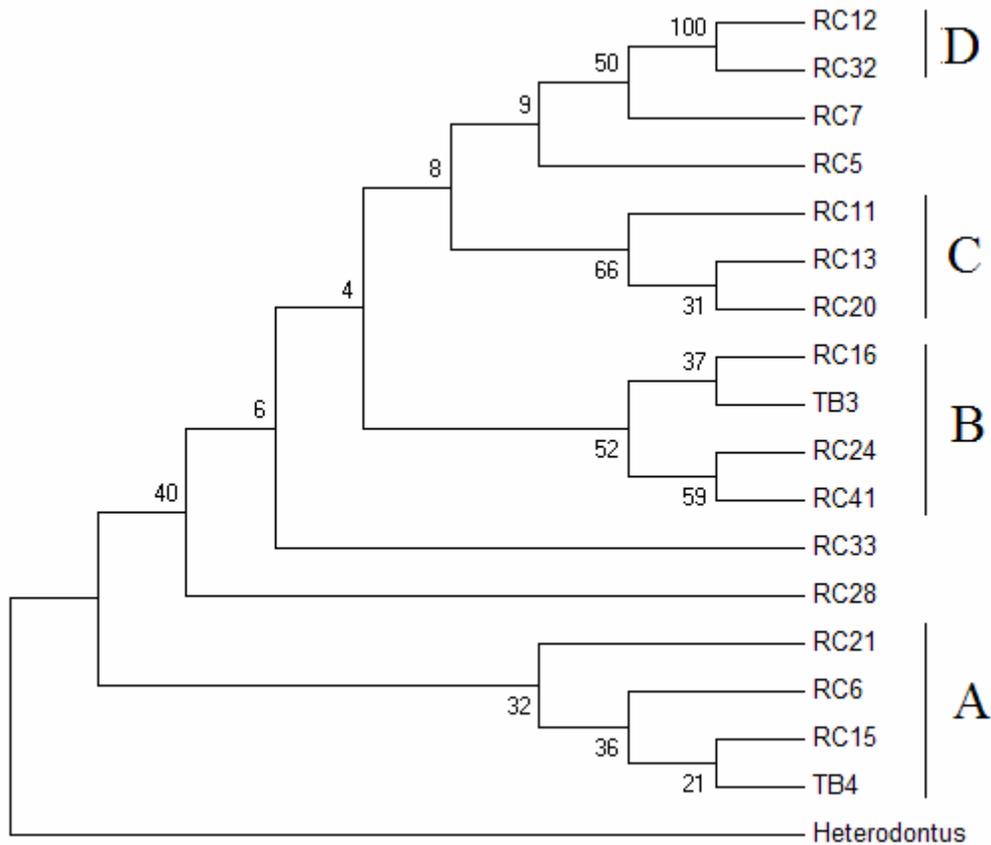


Figura 11. Árbol filogenético realizado con el Modelo de Tamura-Nei, el algoritmo neighbor-joining y distancias gamma con 1000 replicas. Los números de los nodos muestran los valores de bootstrap y las letras los clados.

Se realizaron dos redes de informática basadas en las relaciones entre los haplotipos, uno con las secuencias completas y otro sin el indel 1. La figura 12 muestra la primera red con las secuencias completas. Esta red no mostró una agrupación por áreas geográficas, ya que se ve claramente como un haplotipo (RC6) está representado en las tres localidades, y cuatro se comparten entre BLA y BLP (RC24, RC21, RC11, RC13). A su vez los haplotipos únicos de cada localidad no se ven agrupados entre sí, es decir, las relaciones entre los haplotipos son independientes de las localidades.

Ambas redes mostraron a su vez cuatro diferentes grupos de haplotipos, los cuales coinciden en su mayoría con los clados A, B, C y D del análisis filogenético (Fig. 11). El grupo A del análisis de red incluye al haplotipo mas frecuente RC6, del cual se derivan los haplotipos (RC15, RC21 y TB4) los cuales difieren entre sitio por una sustitución. El grupo B comienza con los haplotipos RC7 y TB3 difiriendo por 3 sustituciones, seguidos por tres haplotipos (RC24, RC16, RC41) los cuales presentan un indel común de 10 pb. El grupo C comienza con el haplotipo RC28 seguido por el RC20 y RC13 y RC11, quienes presentan un indel en común de 17 pb. Finalmente el grupo D esta compuesto por los haplotipos RC5, RC32 y RC12 (Fig. 12).

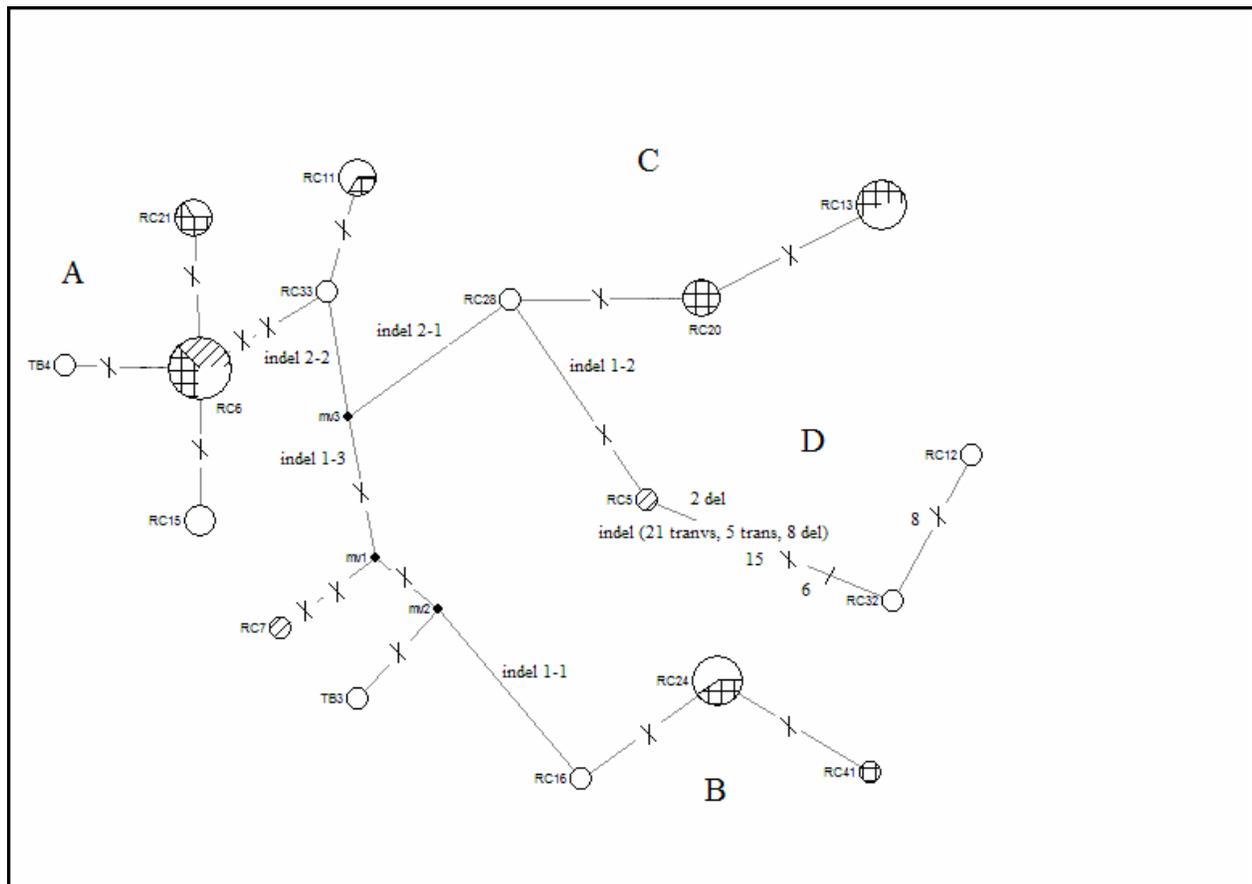


Figura 12. Red de informática con las secuencias completas de los 17 haplotipos. El tamaño de los nodos es proporcional a la frecuencia. BLA esta representada en blanco. BLP esta representada con cruces. BG esta representada en líneas. En las ramas las cruces representan transversiones, las líneas perpendiculares transversiones, a su vez se muestran los indels, trans=transiciones, tranvs=transversiones, del=delecciones). Los nodos negros (mu) representan posibles haplotipos ancestrales.

Dentro de los haplotipos que solo se encontraron presentes en BLA (RC12, RC15, RC16, TB3, RC32, RC33, TB4, RC28), los haplotipos TB4 y RC15 difieren del haplotipo que se encuentra en las tres localidades (RC6) por una transversión. El haplotipo RC33 solo difiere del haplotipo RC6 por dos transversiones y del RC11 (que se comparte entre BLA y BLP) por una transversión. El haplotipo RC28 difiere por una transversión del haplotipo RC20 el cual estuvo presente únicamente en BLP. De acuerdo con la red el haplotipo TB3 difiere del RC7 (único de BLP) por 4 transversiones. El haplotipo RC16 difiere del haplotipo RC24 (presente en BLA y BLP) por una transversión. El haplotipo RC41 fue único de BLP el cual difiere del RC24 (presente en BLA y BLP) por una transversión.

Los haplotipos RC7 y RC5 fueron únicos de BG, el haplotipo RC7 difiere del haplotipo TB3 (único de BLA) por 4 transversiones. El haplotipo RC5 difiere del haplotipo RC28 (único de BLA) por el indel 1-2, 8 transversiones y una delección. Esta red muestra una relación aparente de los haplotipos RC12 y RC32 con el haplotipo RC5, con lo que se propone que para llegar a estos haplotipos el indel 1 del RC5 tuvo que tener 21 transversiones, 5 transiciones y 8 delecciones) además de 15 transversiones, 6 transiciones y 2 delecciones, lo cual evolutivamente hablando son muchos eventos aislados que tuvieron que ocurrir para llegar a ello, por ello proponemos que mas bien el indel 2 de estos haplotipos fue un solo evento aislado y diferente al del RC5, es decir una inserción grande en esa posición, y de esta forma al analizar las relaciones a mano se propone que mas bien vengan del haplotipo RC33, ya que en todo lo demás se parecen mas a este. Por ello se realizo otra red sin parte del indel 1 para corroborar esto (Fig. 13), es decir, se dejaron las 10 primeras pb y las ultimas 3 pb del indel 1 las cuales nos permiten agrupar con base en ello 4 diferentes grupos (Fig. 13).

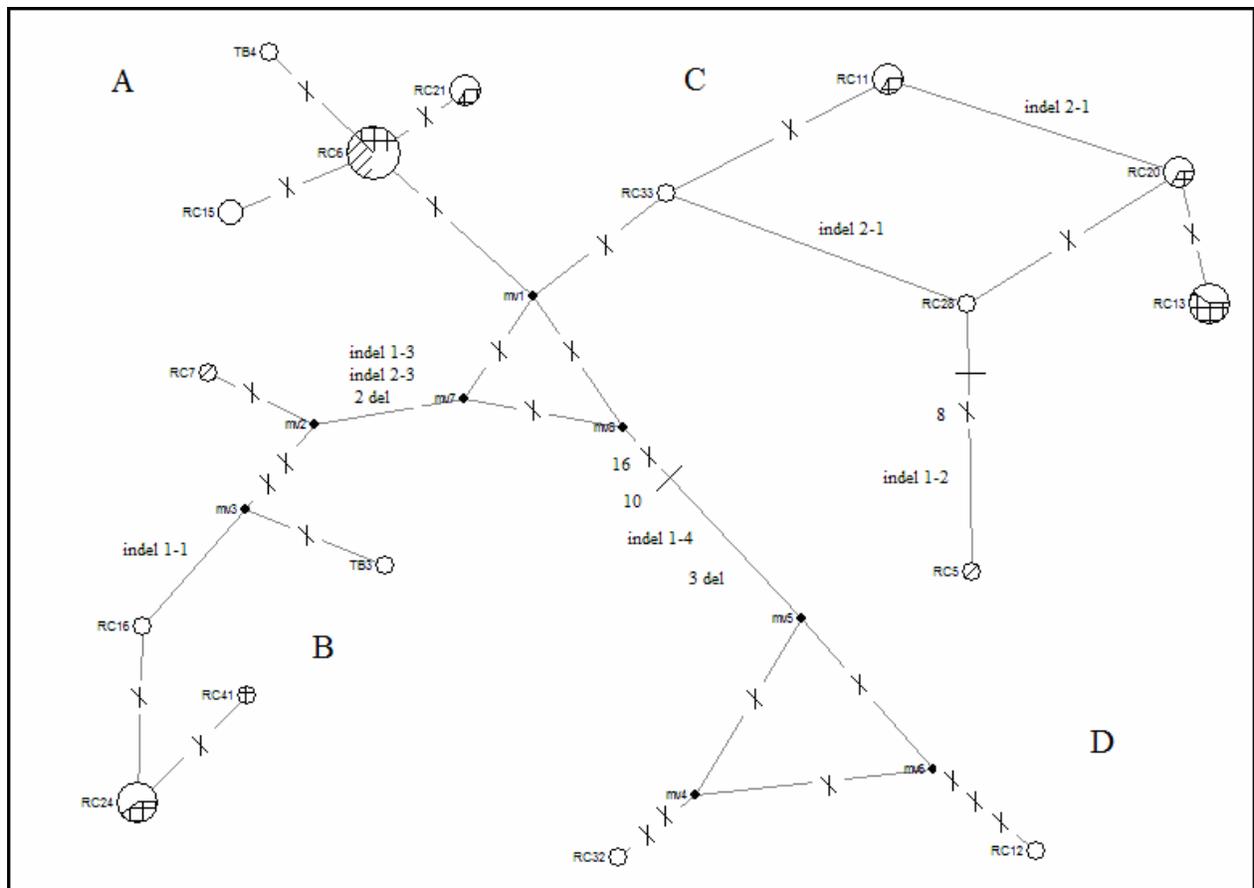


Figura 13. Red de informática con las secuencias sin parte el indel 1 de los 17 haplotipos. El tamaño de los nodos es proporcional a la frecuencia. BLA esta representada en blanco. BLP esta representada con cruces. BG esta representada en líneas. En las ramas las cruces representan transversiones, las líneas perpendiculares transversiones, a su vez se muestran los indels, trans=transiciones, tranvs=transversiones, del=delecciones). Los nodos negros (mu) representan posibles haplotipos ancestros.

En esta red el grupo A y B coincide con la red construida con el indel 1, sin embargo el grupo C esta conformado por los haplotipos RC33, RC11, RC20, RC13, RC28 y RC5, mientras que el grupo D esta conformado únicamente por los haplotipos RC12 y RC32.

En ambas redes, las inserciones grandes de los haplotipos RC12, RC32 y RC5 difieren bastante del resto viniendo de dos linajes maternos (RC12-RC32 y RC5) muy diferentes del resto, lo cual a su vez coincide con el árbol, ya que el haplotipo RC5 no esta resuelto dado la gran diferencia que presenta con respecto al resto de haplotipos, por lo que se puede considerar como otro linaje E y en la segunda red como el grupo E el cual se ve que difiere del haplotipo RC28 con un indel grande, 8 transiciones y 1 deleción. Los haplotipos RC12 y

RC32 conforman otro linaje, esto se refuerza con los 29 sitios polimórficos causados únicamente por los haplotipos RC12 y RC32 después del indel 1 (Tabla IV).

8.2.5 Diversidad haplotípica y nucleotídica.

La diversidad haplotípica (h) total fue muy alta (0.92). Por su parte entre localidades la diversidad haplotípica vario, siendo la más alta en Bahía de los Ángeles (0.96), seguida por la Bahía de La Paz (0.89) y la más baja en Banco Gorda (0.7). Por su parte, la diversidad nucleotídica (π) total fue muy baja (0.005), incluso la encontrada en cada localidad. La tabla VIII resume el numero de individuos de tiburón ballena colectados (n) analizados para cada localidad Bahía de Los Ángeles (BLA), Bahía de La Paz (BLP) y Banco Gorda (BG), número de haplotipos encontrados, diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) determinados para cada localidad.

Tabla IX. Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) por localidad, donde N es el número de individuos de cada localidad.

Localidad	N	No. hap.	π	h
BLA	21	14	0.007	0.96
BLP	13	7	0.003	0.89
GB	5	3	0.005	0.7

8.2.6 Estructura genética poblacional

La estructura genética poblacional se analizó mediante un marco de análisis de variancia. El análisis de variancia molecular empleado en el Arlequin es básicamente similar a otros basados en el análisis de variancia de la frecuencia haplotípica, pero a su vez también cuenta el número de mutaciones entre los haplotipos moleculares, el cual es evaluado primero.

Un análisis jerárquico de variancia parte el total de variancia en componentes de covariancia detectando diferencias intra-individuales e inter-individuales y/o inter -poblacionales.

El resultado se traduce en un AMOVA (Tabla X), el cual mostró que la mayor variación en la región control del ADNmt esta dentro de las localidades (98%) y únicamente el 2% entre localidades. Esto sugiere que no existe una estructura genética entre las tres localidades del Golfo de California ($P > 0.15$, $F_{ST} 0.0187$).

Tabla X. AMOVA

Fuente de variación	Varianza	% total	P	FST
Entre poblaciones	0.008	1.88	0.178	0.018
Dentro poblaciones	0.455	98.12		

8.2.7 PCR para amplificar los genes histocompatibles I o II

Los primers empleados para la amplificación de los genes Histocompatibles I o II mencionados en Otha *et al.* (2000), no dieron buen resultado. Por su parte, ambos primers empleados para DRB dieron poco producto pero fue el necesario para clonar. La figura 14 muestra el gel de electroforesis.

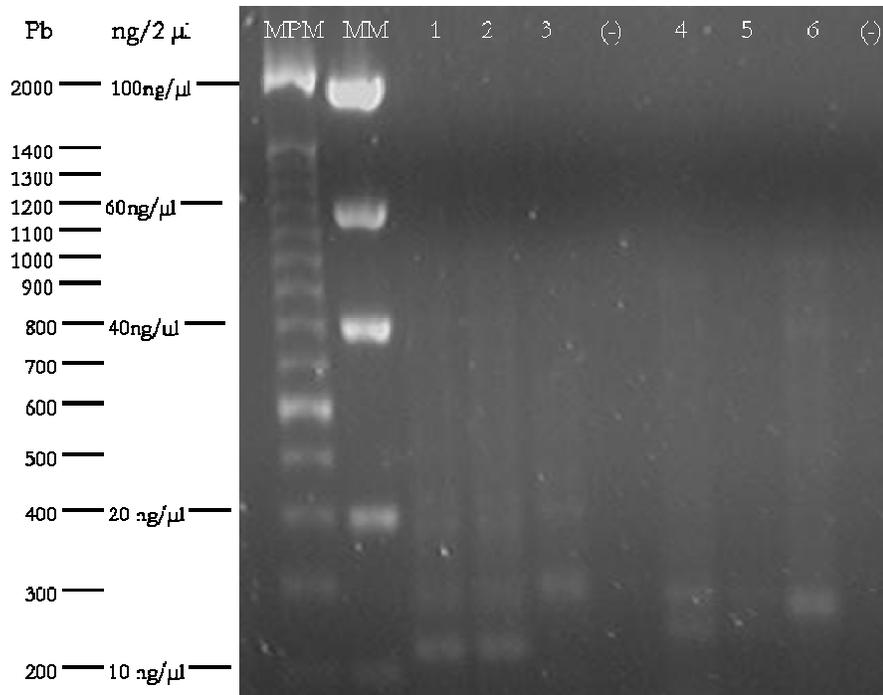


Figura 14. Producto de PCR de amplificación de MHC II. Marcador de peso molecular (MPM), Marcador de masa (MM), muestras de 1-3 se amplificaron con los primers F-GH46 y el R-AMP-B, mientras que las muestras de 4-6 con los primers F-GH46 y R-GH50.

Con la clonación se obtuvieron 3 diferentes fragmentos los cuales se enviaron a secuenciar. Mediante el análisis del BLAST se pudo constatar que no se logró amplificar el DRB del MHC clase II. Debido a lo anterior se decidió no continuar con la amplificación de estas moléculas dado el tiempo de trabajo que tomaría esto.

9. Discusión

9.1 Obtención de biopsias

Una parte crítica para la realización del presente trabajo fue el diseño de la punta de acero inoxidable para la obtención de biopsias de tiburón ballena.

Con las primeras puntas modificadas, solo se obtuvieron pequeñas cantidades de tejido (-0.01 g). Gracias a que se desarrolló un método con el que se obtuvo ADN en cantidad suficiente y de buena calidad, incluso con poco tejido (0.02 g), se logró amplificar y con buen producto la región control del ADNmt; sin embargo, en las muestras de poco tejido (-0.01 g) el ADN no fue visible en el gel de electroforesis, a pesar de ello se logró la amplificación y secuenciación de estas muestras.

Debido al gran esfuerzo que se necesita para la observación de tiburón ballena y a lo costoso que resulta el trabajo de campo, es muy importante la obtención de biopsias con suficiente tejido, lo anterior se logró después de varias modificaciones a las puntas, con lo que pudimos obtener un respaldo de cada muestra con el que se podrán realizar otros estudios como el de isótopos estables o de ácidos grasos.

La tecnología del PCR permite la detección de marcadores moleculares a partir de cantidades mínimas de tejido o DNA, sin embargo, la calidad y naturaleza del tejido pueden ser factores críticos para el éxito en la amplificación. Esto se vio en la muestra del tiburón ballena varado en punta arenas ya que debido a que llevaba aproximadamente 15 días de muerto, el ADN estaba fragmentado, de tal manera que no se logró la amplificación del ADNmt.

Es importante que durante la obtención de las biopsias no se dañe al organismo. Durante la colecta se pudo observar que los organismos pequeños (2-3 m) reaccionaban al momento de obtener la biopsia, pero los organismos medianos (4-7.5 m) casi no reaccionaban, mientras que los adultos (9-12 m) no reaccionaban. Es importante informar que en BLA se tuvo la

oportunidad de observar una semana después a los organismos biopsiados, con lo que se determinó que la marca de la biopsia a la semana prácticamente había desaparecido.

9.2 Observaciones en campo.

Las observaciones en campo indican una aparente segregación latitudinal de tallas a lo largo del Golfo de California. En BG se registraron únicamente organismos adultos (>9 m, LT); mientras que en BLA y BLP solo se encontraron juveniles (<9 m, LT); sin embargo, Rodríguez *et al.* (2003) reportaron la presencia de un tiburón de 10 m (LT) en el área de BLA. Eckert y Stewart (2001) ya habían reportado esta aparente segregación latitudinal del tiburón ballena acorde a su talla, mencionando que los individuos jóvenes (< 4 m), se distribuyen en el Alto Golfo, probablemente aprovechando la alta productividad del área, mientras que los organismos más grandes (> 9 metros) se distribuyen en el bajo Golfo (Eckert y Stewart, 1996; Eckert y Stewart, 2001). A su vez mencionan que existe una aparente segregación de sexos, dado que en dicha zona se encuentran la mayor parte de las hembras adultas y preñadas (Eckert y Stewart, 1996; Eckert y Stewart, 2001; Ketchum., 2003), las cuales probablemente migran cruzando hacia el Pacífico occidental, mientras que en el Alto Golfo se encuentra la mayor parte de machos (Eckert y Stewart, 1996; Eckert y Stewart, 2001). Con base en los resultados genéticos encontrados en el presente trabajo, donde se determinó que en el Golfo de California existe una población de tiburones ballena, la proporción sexual de los tiburones juveniles considerada es la total determinada juntando los datos de BLA y BLP, donde no fue evidente la segregación de sexos, ya que se registró una proporción sexual de 1 macho:0.78 hembra ($n=38$); sin embargo, es interesante el hecho de lo contrastante de la proporción sexual encontrada en BLA (1 macho:0.75 hembra) y BLP (1 macho:0.68 hembra), los resultados encontrados en BLP coinciden con los reportados para el área por Ketchum (2003) quien menciona una proporción sexual para BLP de 1 macho :0.67 hembra y por Clark y Nelson (1997) quienes determinan 1macho:0.5 hembra, estos resultados coinciden con los reportados en lugares como Belice (Rachel Graham *com pers.*, Wildlife Conservation Society, Belize), Holbox (Juan Pérez *com pers.*, CONANP, Q. Roo) y Australia (Brad Norman

com pers., ECOCEAN), donde se ha reportado la ausencia de hembras juveniles, en contraste, en el presente trabajo fué evidente la falta de machos adultos.

Ketchum (2003) encontró una evidente segregación espacial por talla y sexo dentro de la Bahía de La Paz, encontrando en el área costera de la bahía (Mogote y Punta Prieta, Anexo II) únicamente organismos juveniles y en su mayoría machos, con registros de tiburones pequeños (2 m), lo cual concuerda con las observaciones del presente estudio. Dicho autor, a su vez, menciona la presencia de tiburones adultos siendo en su mayoría hembras (proporción sexual: 1macho:5hembras) y aparentemente grávidas en las aguas oceánicas y profundas de BLP, al este de la isla Espíritu Santo y El Bajo de Espíritu Santo (EBES) (Ketchum, 2003).

La segregación de tallas a lo largo del Golfo de California y la diferencia de ambientes en los que fueron encontrados los organismos (*i.e.* juveniles-costeros y adultos-oceánicos), así como la evidente falta de machos adultos, sugiere que los diferentes grupos de edad y sexo realizan diferentes migraciones. Estas observaciones concuerdan con la literatura, donde se menciona que parece haber una segregación espacial y estacional de las poblaciones, avistándose a menudo en la misma zona y en la misma época del año animales de tamaño similar y en general del mismo sexo (Norman, 1999; Ketchum, 2003); mientras que otros grupos de edad y predominantemente del sexo contrario se encuentran en otros lugares (Eckert y Stewart 2001; Norman, 2004). Con base en lo anterior y con analogías con otros tiburones migratorios, donde se ha visto que los diferentes sexos y grupos de edad pueden realizar migraciones diferentes; se ha planteado que los juveniles de tiburón ballena pueden tener diferente migración que los tiburones ballena adultos (Norman, 2004). Por su parte, los machos y hembras adultas también pueden presentar diferencias en su migración, ya sea de diferente duración o a diferentes distancias (Norman, 2004). Por ejemplo, las migraciones de las hembras adultas de algunas especies están vinculadas con los ciclos de reproducción, que tienen una duración de dos años (Norman, 2004). Los datos del presente estudio y las observaciones realizadas en otros sitios del mundo (Norman, 1999; Norman, 2004),

confirman las diferencias entre las migraciones de juveniles y diferencias entre machos y hembras adultos.

Con la evidente ausencia o baja presencia de machos adultos en BG, lo cual también ha sido observado por Ketchum (2003) en BLP (proporción sexual: 1macho:5hembras), se puede proponer la hipótesis de que los machos adultos presentan una migración diferente a la de las hembras y que probablemente al alcanzar la madurez sexual, salen del Golfo de California en busca de áreas de reproducción. Basandose en la evidencia de las grandes migraciones que realizan estos tiburones se puede inferir que los machos migran hacia diferentes áreas para la reproducción. Esta situación ha sido vista en otros tiburones como el tiburón blanco (*Carcharodon carcharias*); ya que el seguimiento de ejemplares marcados y de estudios de ADN han demostrado que los tiburones blancos machos migran hacia diferentes cuencas oceánicas; mientras que las hembras tienden a permanecer en las aguas costeras del continente en el que nacieron (Pardini *et al.*, 2001).

Con base en lo anterior y a los diferentes trabajos que muestran que los tiburones ballena son organismos altamente migratorios (Eckert y Stewart, 2001; Norman, 2004), se puede proponer que existe una estructura metapoblacional, es decir, existen subpoblaciones, entre las cuales existe un flujo genético realizado principalmente por los machos adultos. Por lo tanto, se puede pensar en rechazar la hipótesis nula planteada por Eckert y Stewart (2001), donde mencionan que no hay diferencias genéticas inter-regionales o inter-oceánicas entre poblaciones del tiburón ballena. Sin embargo, no existe suficiente evidencia directa que invalide esta hipótesis y son necesarias muestras de otras partes del mundo, particularmente de localidades del Pacífico Oriental, para poder rechazarla tajantemente.

La teoría metapoblacional menciona que en la naturaleza, los organismos normalmente no se distribuyen de manera continua en el espacio y que a menudo se agrupan como resultado de las variaciones en las características geofísicas y ecológicas del paisaje (Hanski y Gilpin, 1997). Las concentraciones de los individuos en un área particular constituyen las poblaciones locales, con niveles de organización donde ocurren interacciones conductuales, genéticas y

ecológicas (Hanski y Gilpin, 1997). Las poblaciones locales están generalmente separadas unas de otras por varios hábitat impropios, donde las densidades de las especies disminuyen o no existen; sin embargo, muchas especies presentan mecanismos que les permiten a los individuos cruzar estos hábitat impropios en alguna parte de su ciclo y así las poblaciones locales son potencialmente conectadas con otras poblaciones a través de dispersión y migración (Hanski y Gilpin, 1997).

El conocimiento de la estructura poblacional/metapoblacional del tiburón ballena toma especial relevancia dado que los sistemas metapoblacionales dentro de la conservación, son de gran interés, ya que la estructura metapoblacional tiene una mayor influencia en el mantenimiento y pérdida de variación genética, lo cual es importante con la fragmentación del hábitat, donde la dinámica metapoblacional es apropiada para describir la estructura poblacional en un nivel regional (Hanski y Gilpin, 1997). Por lo que ha surgido el interés de valorar la variación genética de especies que se distribuyen con un sistema metapoblacional y que habitan en un lugar fragmentado (Hanski y Gilpin, 1997).

Ketchum (2003) menciona que la frecuencia de hembras aparentemente grávidas observadas en ambientes oceánicos como EBES, cercano a la BLP, puede constituir una importante evidencia de que usen estos ambientes como áreas de crianza primaria, es decir, que esta especie procrea sus crías en la porción profunda de la Bahía de La Paz o en aguas profundas cercanas (Ketchum, 2003). Por su parte, la presencia de hembras aparentemente preñadas en el área de BG, e incluso una de ellas con la cloaca distendida (observaciones personales de James Ketchum y Dení Ramírez, CICIMAR), son indicio de que esta zona también sea un área de crianza primaria, lo cual puede ser factible dado las características similares al EBES como el ser aguas oceánicas y profundas. Ketchum (2003) a su vez menciona, la presencia de tiburones juveniles de 2 m en el área aledaña al Mogote y Punta Prieta siendo evidencia de que son áreas de crianza secundaria, ya que es una zona con una intensa producción secundaria durante gran parte del año (Ketchum, 2003). Esta productividad es la base de una importante cadena trófica que sostiene una constante presencia de cardúmenes de sardinas y

otros peces pequeños (Ketchum, datos no publ.). En ciertas épocas del año ocurren afloramientos de zooplancton lo cual atrae a mantas gigantes (*Manta birostris*), rayas diablo (*Mobula* spp.), tiburones ballena y algunas especies de ballenas (e.g. ballena jorobada y de aleta) (Observaciones personales de James Ketchum y Dení Ramírez, CICIMAR). Esta zona, además de alimento y aguas cálidas le proporciona protección a los tiburones ballena juveniles (Ketchum, 2003).

Durante el presente estudio solo se observaron organismos juveniles (3-7 m) en BLA pero nunca organismos tan pequeños como los vistos en el área cercana al Mogote, lo cual a su vez refuerza la hipótesis de que el área costera de BLP sea usada como área de crianza secundaria. En el caso de que las aguas oceánicas de EBES y BG sean áreas de crianza primaria y las aguas costeras de BLP áreas de crianza secundaria, deberán de considerarse hábitat críticos para la conservación de la especie, los cuales deberán de considerarse dentro del plan de manejo y ordenamiento de BLP, BLA, BG y del Golfo de California en general.

9.3 Foto-identificación

En el presente estudio, se confirmó la importancia de fortalecer el análisis genético con datos demográficos y ecológicos, como lo sugiere Haig (1998) que en este trabajo fueron la determinación del sexo, la longitud total y la foto identificación de los organismos. Sin la foto-identificación, los resultados de genética podrían haberse interpretado mal, ya que si se hubiera analizado al mismo organismo dos veces, como ocurrió en el caso de las recapturas, se habría sobrestimado a los haplotipos. A su vez, las recapturas entre años y localidades mostraron residencia estacional, el regreso de tiburones al área al siguiente año, así como movimientos. La técnica de foto-identificación es comparable con el empleo de las marcas convencionales. Con ambas técnicas, se puede sobrevaluar la residencia, sedentarismo y movimiento entre distancias cortas, además, en ambas se depende de la recaptura del organismo. No obstante, con la foto-identificación no se corre el riesgo de que la marca se caiga y sobre todo no se lastima al organismo. Otro aspecto importante es el costo ya que una vez contando con las cámaras subacuáticas para realizar el foto-marcado el costo es muy bajo. En ambas técnicas se depende del buen trabajo en campo ya que para la foto-identificación es importante tener buenas fotos del área del cuerpo del animal previamente establecida y por su parte, la colocación de la marca convencional depende de una buena técnica para su apropiada fijación.

Durante la realización del presente trabajo se colaboró con el Dr. Enríquez (UABC) y con el prestador de Servicios Turísticos Abraham Vázquez (Gecko Camp) en BLA, quién informó que la mayoría de los tiburones que llegan a la Bahía permanecen los meses de septiembre y octubre. Las salidas realizadas para el presente trabajo en BLA fueron de una semana, durante la cual se estuvieron recapturando a los mismos tiburones. En BLP, durante noviembre de 2004, se observaron siete tiburones de los cuales dos fueron recapturados en abril de 2005. Ambos datos muestran una residencia estacional, es decir, que los tiburones permanecen en el área durante los meses de avistamientos. Las recapturas obtenidas entre 2003 y 2004 en BLA muestran que son sedentarios anuales; es decir, que año con año los

tiburones regresan al área. Este tipo de observaciones se han realizado en otras partes del mundo como en Australia (Taylor, 1994; Norman, 1999), Belice (Norman, 2004.) y Holbox (J. Pérez, *com pers.*, CONANP, Q. Roo), donde con base a estudios de marcado de ejemplares y de foto-identificación se han recapturado tiburones ballena en la misma estación. Lo anterior muestra la residencia estacional y entre estaciones, y que los tiburones regresan año con año; sin embargo, hay tiburones que no son vistos entre años y después de varios años son recapturados (Taylor, 2005). Por ello, es necesario realizar estas observaciones por un periodo más largo de tiempo.

Las recapturas entre BLP y BLA son evidencia directa de la gran movilidad y de los patrones de migración en el Golfo de California, lo cual apoya la hipótesis de que existe una sola población de tiburones ballena en el Golfo de California sugerida por el análisis de variancia molecular (AMOVA). La primer recaptura muestra un movimiento a mayor distancia en un periodo de tiempo corto. La hembra juvenil fue observada el 20 de octubre de 2004 en BLA y fue recapturada un mes después, el 21 de noviembre del mismo año, en la BLP, indicando un movimiento de aproximadamente 850 km en un mes, previamente no se había registrado que un tiburón ballena viajara de BLA directamente hacia BLP. Eckert y Stewart (2001) marcaron tiburones en BLA; y observaron el movimiento de un tiburón hacia las islas Revillagigedo, el cual durante su trayectoria fue registrado en las inmediaciones de El Bajo de Espíritu Santo (EBES, Anexo II); sin embargo nunca entró a la BLP. El gran movimiento de esta hembra en un periodo de tiempo corto es consistente con otros estudios que han demostrado la gran capacidad de movimiento de la especie (Norman, 2004; Anónimo, 2002a). Mediante el uso de marcas satelitales se han observado migraciones excepcionalmente largas del tiburón ballena: 1) una migración de 12642 km desde BLA hasta en Pacífico Occidental, el cual es el mayor movimiento jamás registrado por un tiburón ballena o cualquier vertebrado marino (Eckert y Stewart, 2001), 2) un viaje de más de 2000 km (CITES) hacia Asia desde la costa Noroccidental del oeste de Australia en 2002 (Norman, 2004), 3) otro de 550 km completado en algunas semanas de un tiburón marcado en Belice (Norman, 2004) y 4) una migración de 4567 km desde el mar de Mindanao en

Filipinas hacia 280 km al sur de Vietnam realizado en dos meses (Eckert *et al.*, 2002). Por su parte, en Holbox (Caribe Mexicano) en 2003 y 2004 se marcaron con marcas convencionales 150 tiburones ballena, de los cuales algunos fueron recapturados en Honduras y Belice (J. Pérez, *com pers.*, CONANP, Q. Roo). Basandose en los grandes movimientos realizados por el tiburón ballena, es posible que estén conformados por una estructura metapoblacional, existiendo flujo entre las subpoblaciones presentes en diferentes países. Por ello, son cruciales las colaboraciones internacionales para obtener más información sobre la biología de la especie con el propósito de garantizar un manejo adecuado y sustentable de la especie.

Las recapturas obtenidas; en BLA, cuatro tiburones recapturados en 2004 del 2003, en BLP dos tiburones recapturados en el 2005 del 2004 y dos recapturados en la BLP de BLA; son indicio de un tamaño poblacional pequeño. Ketchum (2003) estimó para BLP una densidad de ~ 4 TB/Km²; por su parte, Rodríguez *et al.* (2003) durante la temporada 2001 estimaron un tamaño poblacional de 16 ± 7 individuos en BLA. Estas estimaciones de abundancia para las dos áreas más importantes de agregaciones de tiburón ballena hasta ahora conocidas en el Golfo de California son muy bajas comparadas con el tamaño poblacional de tiburones ballena reportadas en Isla Holbox en el Caribe Mexicano en donde mediante censos aéreos se ha estimado un tamaño poblacional para el 2004 y 2005 de 150 tiburones en el área (J. Pérez, *com. pers.*, CONANP, Q. Roo; Rafael de la Parra, *com. pers.*, CONANP, Q. Roo). Asimismo la zona arrecifal de Belice, es considerada una de las zonas con mayor densidad de tiburones (4.1 tiburones/ha en sitios de agregación) (Heyman *et al.*, 2001). Sin embargo, es necesario continuar con esfuerzos dirigidos como censos aéreos en diferentes zonas del Golfo de California para conocer mejor el tamaño poblacional.

9.3 Análisis genético.

En el presente trabajo se pudo comprobar la efectividad de la región control del ADNmt como marcador para estudios poblacionales de tiburón ballena. A su vez, los primers diseñados fueron específicos del área hipervariable encontrada en la región control del ADNmt del tiburón ballena, lo cual permitió distinguir 17 haplotipos diferentes repartidos en 39 individuos. El estudio muestra homogeneidad genética entre los tiburones ballena del Golfo de California.

Mediante el empleo del análisis de variancia molecular (AMOVA) se evaluó la estructura genética molecular, dicho análisis mostró que el tiburón ballena del Golfo de California está conformado por una población. Este análisis realiza cálculos de componentes de varianza estándar y medidas de correlación entre series de haplotipos, referido como F_{ST} , el cual es usado para inferir el nivel de subdivisión de la población. El análisis de los haplotipos de la región control del ADNmt de los tiburones ballena no mostró diferenciación genética significativa entre los tiburones de las tres localidades del Golfo de California (BLA, BLP, BG). Con base en lo anterior, se sugiere que existe una población de tiburón ballena en el Golfo de California. Sin embargo, estos resultados son preliminares, dado que únicamente se analizaron 5 muestras de Banco Gorda; aunque, 3 de ellas pertenecen a hembras grávidas con el haplotipo más frecuente y presente en las tres localidades (haplotipo RC6), una con un haplotipo con un linaje lejano (RC5) y una con un solo haplotipo (RC7), pero evolutivamente cercano a los otros dos haplotipos del clado B.

El hecho de que tanto la red de análisis como el árbol filogenético no hayan mostrado una agrupación de los haplotipos por áreas geográficas, indica una homogeneidad genética entre las tres áreas de estudio, esto se debe a que el haplotipo RC6 fue el más frecuente y se presentó en las tres localidades, encontrándose en ocho individuos, incluyendo tres de cinco hembras grávidas del área de BG. A su vez, cuatro haplotipos se comparten entre BLA y BLP. Con respecto a los diez haplotipos únicos, tres de ellos son muy divergentes del resto

de los haplotipos (RC5, RC12 y RC32), los otros siete se ve claramente en la red de análisis su cercanía con los haplotipos más frecuentes. Esta homogeneidad genética en las tres áreas de estudio es indicio de que los tiburones ballena del Golfo de California conforman una población. Sin embargo, para corroborarlo, es necesario obtener un número mayor de muestras principalmente del área de BG.

De acuerdo con la teoría de coalescencia (Posada y Crandall, 2001) el haplotipo más común (RC6) representa el linaje mitocondrial más viejo. La posición basal del haplotipo RC6 en el clado ancestral A (RC21, RC6, RC15, TB4) en el árbol N-J y la forma de estrella de la red de informática que radia del grupo A soporta fuertemente este punto de vista.

En la parte alta del árbol filogenético (Clado D) se tiene a los haplotipos RC32 y RC12, los cuales conforman un linaje monofilético. De acuerdo con la topografía del árbol este linaje (Clado D) divergió del resto hace mucho tiempo, debido a las grandes diferencias con el resto de haplotipos, lo cual se puede interpretar como que son tiburones que provienen de otra región geográfica.

El haplotipo RC5 está sin resolver o con poca resolución, lo cual lo hace difícil de interpretar; no obstante al comparar dicho haplotipo con la red de análisis, es evidente la gran diferencia que existe con el resto de haplotipos y por ello puede tener una baja resolución ya que en los métodos de distancia como el N-J para construir el árbol filogenético, el programa se basa en un método cuantitativo donde se calculan las distancias evolutivas para todos los pares de haplotipos, siendo los sitios filogenéticamente informativos todos los sitios variables e incluso los invariables; la relación que existe entre estos valores se utiliza para construir el árbol filogenético (Nei y Kumar, 2000), por ello el haplotipo RC5 al ser tan divergente es difícil compararlo y por tanto resolverlo, dando como resultado un valor de bootstrap muy bajo, de tal forma que es factible considerarlo como un único linaje, el cual también debió de divergir hace mucho tiempo, lo cual indica que viene de una región geográfica distinta.

El caso de las secuencias RC33 y RC28 en el árbol tampoco están bien resueltas. Autores como Wynen *et al.* (2001) consideran que estas ramas no resueltas se pueden deber a la radiación rápida de haplotipos, que quizás sea la explicación correcta dado la alta tasa de mutación de esta secuencia; sin embargo, al observarlos en la red de análisis se puede ver como están dentro del grupo C.

Los otros dos linajes maternos evidentes están conformados por el clado B (RC16, TB3, RC24 y RC41) y clado C (RC11, RC13 y RC20), los cuales concuerdan con la red de análisis del presente estudio.

La diversidad haplotípica fue alta ($h=0.92$) debido a la presencia de muchos haplotipos únicos (10). Comparando las tres localidades de estudio, BLA mostró los valores más altos de diversidad haplotípica debido a la presencia de catorce haplotipos, de los cuales siete fueron exclusivos de la localidad. Sin embargo, estos valores deben de considerarse con cautela dado que estos valores altos pueden deberse al tamaño de muestra pequeño en las tres localidades. Esto sugiere que es necesario un mayor esfuerzo para encontrar la frecuencia haplotípica real de las localidades. Los nodos negros de la red de análisis sugieren que existen haplotipos que no se han colectado, quizás por el bajo número de muestras, o bien son haplotipos extintos. La diversidad haplotípica alta encontrada en la región control del ADNmt del tiburón ballena es mucho mayor a la reportada para el tiburón puntas negras *Carcharhinus limbatus* ($h=0.371-0.796$) presente en las costas del Golfo de México (Keeney *et al.*, 2003).

Por su parte, la diversidad nucleotídica fue baja (0.005) debido a la poca divergencia entre los haplotipos, la cual está sugerida en las ramas cortas del árbol filogenético. Aunque el análisis sugiere cuatro linajes, la topología del árbol indica que pueden tener un ancestro en común (monofilético). Por su parte la red de informática, muestra una forma de estrella que radia del grupo A y la mayoría de los haplotipos difieren por un solo evento de sustitución, inserción o delección. Los valores bajos de la diversidad nucleotídica entre un número relativamente pequeño de sitios polimórficos y la forma de estrella de la red de análisis y el árbol, son

consistentes con una expansión poblacional seguida de un cuello de botella (Tajima, 1989; Slatkin y Hudson, 1991; Aris-Brosou y Excoffier, 1996), la cual pudo haber ocurrido hace cientos o miles de años. Esto puede implicar que la población de tiburones ballena del Golfo de California fue fundada por un número pequeño de organismos (los cuales presentaban el haplotipo RC6) y que se expandió rápidamente. En este caso, varios sitios polimórficos pudieron surgir después de la expansión demográfica, la cual probablemente alcanzo tamaños poblacionales moderados, con lo que se explica la presencia de varios haplotipos (17) y linajes (4). A su vez, los valores bajos de la diversidad nucleotídica han sido observado en especies cosmopolitas y altamente migratorias como la ballena jorobada (Barker *et al.*, 1993), esto dado su gran movilidad que permite un alto intercambio genético. La misma situación pudiera presentarse en el tiburón ballena debido a que el tiburón ballena es altamente migratorio (Eckert y Stewart, 2001; Anónimo 2002a; Norman, 2004); sin embargo, no existen evidencias que lo demuestren.

La presencia del haplotipo más común y presente en las tres localidades (RC6) en tres de cinco hembras adultas aparentemente grávidas, sugiere que las hembras de los tiburones ballena del Golfo de California son filópatras, lo cual ha sido observado en tiburones como el *C. carcharias* y el *C. limbatus* (Pardini *et al.*, 2001; Keeney *et al.*, 2003). El número de muestras obtenidas de hembras adultas grávidas fue muy bajo, por ello es necesario corroborar esta hipótesis con un mayor número de muestras.

La presencia de una hembra adulta y aparentemente grávida en BG con un haplotipo lejano (RC5) sugiere que el área no solo es utilizada por hembras del Golfo sino también por hembras que vienen de otros sitios geográficos del Océano Pacífico, ya que la elevada productividad y el hábitat óptimo pueden ser la combinación de factores que atrae a tiburones ballena adultos hacia el Golfo de California (Ketchum, 2003). Esta hipótesis, a su vez, se puede reforzar con los haplotipos RC12 y RC32 que pertenecen a organismos juveniles y que evidentemente pertenecen a linajes maternos diferentes del resto de haplotipos presentes en el Golfo de California, de tal manera que se podría plantear que estos

tiburones pueden ser hijos de madres que vinieron de una región geográfica diferente. Es difícil poder interpretar los resultados con únicamente tres haplotipos lejanos; sin embargo, el análisis de frecuencia de los haplotipos, el árbol filogenético y las redes de análisis muestran una estructura poblacional con una diversidad haplotípica alta pero con una diversidad nucleotídica baja; es decir, las diferencias entre los haplotipos son en su mayoría de una sola base, siendo muy cercanos los haplotipos que conforman la población. Por su parte, los haplotipos RC5, RC12 y RC32 al ser tan diferentes del resto de haplotipos muestra su lejanía con el resto de la población, lo cual se puede interpretar como que pertenecen a tiburones que provienen de otras localidades geográficas.

9.5 Planteamiento de hipótesis

Integrando los resultados del presente trabajo y de Ketchum (2003) y siguiendo el ciclo de vida del tiburón ballena, se plantean las siguientes hipótesis:

- 1) Los tiburones ballena del Golfo de California nacen en aguas profundas de la zona oceánica de BG y BLP (EBES), siendo estas áreas de crianza primaria y cuando tienen una talla adecuada se acercan a las aguas costeras de la BLP en particular el área aledaña al Mogote y Punta Prieta donde encuentran refugio y alimento, siendo estas áreas de crianza secundaria.
- 2) Los organismos juveniles permanecen en el Golfo de California siendo residentes estacionales en las diferentes localidades.
- 3) Cuando los machos alcanzan la madurez sexual, salen del Golfo de California en busca de áreas de reproducción.
- 4) Las hembras adultas tienden a permanecer cerca del Golfo de California y usan las áreas oceánicas de la BLP (EBES) y BG como áreas de crianza primaria.

Existe cierta evidencia directa que apoya estas hipótesis, no obstante, son necesarios más estudios que permitan reforzarlas.

10. Conclusiones

1. La región control del ADNmt es un buen marcador para realizar estudios poblacionales de tiburón ballena.
2. Los primers diseñados fueron específicos para amplificar la región hipervariable de la región control el ADNmt.
3. Este estudio demuestra que existe homogeneidad genética entre los tiburones ballena del Golfo de California y se sugiere que conforman una sola población.
4. La presencia de tres haplotipos lejanos (RC5, RC12 y RC32) sugiere que estos tiburones provienen de regiones geográficas diferentes.
5. La presencia del haplotipo más frecuente (RC6) en tres de cinco hembras adultas y grávidas sugiere que existe filopatría en las hembras de tiburones ballena del Golfo de California.
6. Las recapturas de tiburones ballena juveniles obtenidas entre años y entre BLA y BLP indican que los tiburones ballena juveniles permanecen en el Golfo de California, siendo residentes del Golfo y agregándose estacionalmente en diferentes localidades.
7. Las recapturas entre las diferentes localidades demuestran movimientos a mayor escala en periodos de tiempo cortos y refuerzan que los tiburones ballena del Golfo de California conforman una población.
8. La población de tiburón ballena del Golfo de California se encuentra distribuida a lo largo de toda su extensión por una estructura de tallas aparentemente influida por el tipo de ambientes (costeros u oceánicos) de la región: tiburones juveniles en ambientes costeros (BLA y BLP) y tiburones adultos en ambientes oceánicos (BG).
9. La distribución con base a la estructura de tallas es indicio que los tiburones juveniles realizan diferentes migraciones que los adultos.
10. La falta de machos adultos sugiere que los tiburones adultos machos y hembras realizan diferentes migraciones. Lo cual a su vez sugiere que los machos al

alcanzar la talla de madurez sexual migran fuera del Golfo en busca de la reproducción.

11. La presencia de hembras preñadas en las aguas profundas de Banco Gorda, B.C.S. sugieren que podría ser otra área de crianza primaria

11. Comentarios sobre la conservación de la especie

En los últimos años el tiburón ballena se ha vuelto una especie cada vez más interesante para investigadores, gobiernos y empresas turísticas, esto debido principalmente al gran misterio y reto que representa el contacto con esta carismática especie, por lo cual en numerosos países incluyendo a México ha beneficiado económicamente a la población local, por ello el gobierno ha mostrado interés en conocer más a cerca de la biología de esta especie y ordenar las actividades de observación y nado con estos tiburones con la finalidad de protegerla. Holbox en el Caribe Mexicano es un gran ejemplo en México donde incluso el gobierno, principalmente por la CONANP de Quintana Roo ha mostrado un interés por ordenar las actividades turísticas de observación y nado con la especie y de involucrar principalmente a los pescadores locales para que se beneficien económicamente con esta actividad. Con la intervención del gobierno (CONANP de Quintana Roo, PROFEPA y Capitanía de puerto), las actividades en el área se realizan bajo un ordenamiento donde la comunidad local contribuye al ordenamiento, al establecimiento del marco legal de la actividad e incluso al monitoreo de la especie. Actualmente se esta trabajando sobre extender el área natural protegida (ANP) al sitio de agregación de los tiburones, es algo que incluso la gente de la comunidad lo solicita.

Por su parte, en BLA la comunidad de pescadores y prestadores de servicio locales se han organizado y realizan actividades de observación y nado con tiburón ballena quienes en colaboración de la UABC y de la CONANP (Islas del Golfo, de BC) han desarrollado los códigos de conducta de observación y nado con la especie, los cuales poco a poco se han estado implementando. A su vez, la gente se esta organizando para pedir mas apoyo a la PROFEPA para la vigilancia de las actividades y el establecimiento de los limites de velocidad en el área de agregación, a su vez, se esta trabajando en declarar BLA un ANP como santuario de tiburón ballena.

Hasta ahora, BLP y BG han sido olvidados por el gobierno a pesar de ser hábitats críticos para la especie, de aquí que sea imprescindible que se establezcan lineamientos para la protección del tiburón ballena y de los hábitats críticos.

La problemática en la BLP, se debe principalmente a la falta de un ordenamiento de las actividades de observación y nado con tiburón ballena, así como que a pesar de que desde hace varios años se realiza esta actividad, no ha existido una derrama económica para la gente local. Existen principalmente tres grandes empresas que realizan actividades dirigidas a la observación y nado con el tiburón ballena, el resto lo hacen de manera fortuita; por ejemplo, el área de punta prieta al ser parte de la ruta común de las embarcaciones turísticas que visitan la Isla Espíritu Santo y una zona importante de agregación de tiburón ballena, estas empresas aprovechan de paso, si de da la oportunidad, para que naden los turistas con el tiburón; sin embargo, esta zona al estar fuera de un marco legal, y al ser una ruta común de embarcaciones privadas y turísticas, es un área donde las embarcaciones van a alta velocidad y existe el riesgo de colisión con los tiburones. Por su parte, el área del Mogote esta en vías de desarrollo, con un frente de playa lo cual va aumentar el trafico de embarcaciones y de actividades recreacionales en el área como los jet sky, esta zona los tiburones se ven muy pegados a la costa por lo que el número de colisiones con los tiburones puede aumentar considerablemente. La zona de EBES es aprovechada por empresas de buceo, de pesca deportiva y por pescadores locales, en este año fueron reportados tiburones ballena adultos en junio, 5 tiburones llevaban aproximadamente 2 semanas en la zona, la salida de campo se realizó dos días después de un torneo de pesca con aproximadamente 80 embarcaciones buscando peces a alta velocidad, lo cual fue un riesgo de colisión con los tiburones. Hay empresas que tienen barcos grandes que pueden llevar hasta 20 turistas, si se ve un tiburón todos los turistas se pueden meter al agua sin ningún orden; a su vez, si la embarcación está buscando a los tiburones van a velocidad alta y muchas veces al no existir un limite de distancia con el tiburón la embarcación corre el riesgo de colisión por ello, son varios los tiburones dañados por embarcaciones. Con base en lo anterior, es necesario el ordenar y declarar estas zonas como área de avistamiento de la especie, ya que hasta la fecha no existe

un marco legal en la zona que limite áreas de agregación de tiburón ballena, con un límite de velocidad, número de embarcaciones y de turistas por embarcación, ni del límite de buzos por tiburón.

El periodo de esta actividad se ha modificado dependiendo de las condiciones oceanográficas, el año pasado fue un periodo largo para la observación de tiburón ballena, el cual inició en verano y continuó hasta noviembre. Los costos de esta actividad varían dependiendo de la empresa, si el turista quiere asegurar la observación de TB y se contrata una avioneta por lo que el costo es de USD \$110, si no se paga avioneta el costo va de USA \$60-80, las embarcaciones salen toda la semana en época alta mientras exista la demanda. Por ello, la posibilidad de incluir a los pescadores locales como prestadores de servicio de esta actividad puede ser viable bajo una normatividad adecuada que considere la capacidad de carga.

Por su parte en BG, la problemática va más en sentido hacia la falta de interés de la especie en el área, hace unos años iban al área empresas de buceo de Cabo San Lucas; sin embargo, debido a la gran distancia, el buceo es costoso y por tanto la demanda ha bajado. En los últimos dos años las empresas de buceo casi no visitan el área. Las empresas locales realizan una actividad dirigida principalmente hacia la pesca deportiva, por lo que las embarcaciones en el área van buscando principalmente peces como marlin y dorado, muchas veces a gran velocidad existiendo un alto riesgo de colisión, incluso en el área el número de reportes de embarcaciones colisionadas con la especie es muy alta. Por su parte los pescadores locales interactúan con la especie dado que trae mucho pescado como bonito por ello los pescadores lo buscan para poder obtener pescado. Sin embargo, con un buen manejo este sitio podría ser aprovechado por los pescadores locales para llevar a turistas para observar y nadar con la especie. Al igual que en la BLP en BG es necesario que se declare como sitio de agregación de TB y se establezcan límites de velocidad de las embarcaciones, esto toma mayor importancia al tratarse de uno de los pocos sitios del mundo con agregaciones de hembras

adultas y aparentemente grávidas, más ahora que se esta promoviendo un desarrollo con campos de golf marinas, mega hotel y residencias en el área de punta gorda.

En el presente trabajo se determinó que en el Golfo de California existe una población de tiburones ballena, por ello, es necesario apoyar el esfuerzo realizado en BLA por conservar a la especie y su hábitat protegiéndolo de igual manera en BLP y BG de tal manera que sea de una acción integral considerando todos los hábitats críticos de la especie, para ello es prioritario que los planes y políticas del gobierno del estado de Baja California Sur tomen en cuenta la existencia de estos hábitat críticos para garantizar su preservación y por consiguiente, la de la fauna marina de La Bahía de Paz y Banco Gorda, contribuyendo así con la conservación de la diversidad biológica del Golfo de California.

El hecho que el tiburón ballena requiera de un hábitat con condiciones ambientales específicas asociadas a una gran productividad lo cual genera gran diversidad de organismos que también se alimentan en estas zonas (e.g. sardinas, dorados, lobos marinos, mantas gigantes, tortugas marinas, delfines, ballena piloto, jorobada, tiburón martillo, etc. (Colman, 1997a; James Ketchum y Dení Ramírez, observaciones personales, CICIMAR), muchas de las cuales a su vez se encuentran protegidas en la NOM-059-SEMARNAT-2001, la convierte en una especie ideal para el establecimiento de reservas marinas. De tal manera que con la protección del tiburón ballena se protegen otras especies con prioridad para conservar.

La propuesta de crear reservas marinas con base a la distribución del tiburón ballena se refuerza con la teoría metapoblacional, ya que esta tiene aplicación en el diseño de reservas, dado que muchos de los debates de las reservas se centran en su tamaño, forma y numero (Hanski y Gilpin, 1997). Las reservas algunas veces parecen parches de hábitat en el fondo de una matriz, por lo que la teoría metapoblacional predice soluciones estables para la persistencia de la población ante extinciones locales (Hanski y Gilpin, 1997). Con base en lo anterior, se propone aquí un mosaico de reservas combinadas con áreas de uso humano, donde no sólo es necesario el manejo de las áreas que contienen a las poblaciones de tiburón

ballena, ya que sus movimientos y migraciones van a depender del mantenimiento de sus alrededores (Hanski y Gilpin, 1997). Por otro lado, el tiburón ballena, siendo una especie distribuida en parches en el Golfo de California, es un organismo ideal para el establecimiento de reservas, tomando en cuenta la conectividad de las mismas para que se permita el flujo de los organismos entre los parches dado que los movimientos de los organismos son de gran importancia para la colonización de nuevos parches y el flujo genético que mantiene una variabilidad genética alta. Por ejemplo, Los movimientos de los tiburones de BLA hacia BLP determinados en el presente trabajo toman importancia en el ordenamiento ecológico del mar de Cortés, dado que durante los movimientos existe el riesgo de enmalle en redes de deriva como las tiburoneras de varios km. En el Golfo de California existe un reporte de un tiburón ballena enmallado en un camarero y en un atunero; sin embargo, dado a la falta de información no se puede establecer un impacto hacia la población por pesca incidental, por ello es necesario un ordenamiento entre los sitios de agregación y de un mayor conocimiento de las rutas migratorias para poder establecer un ordenamiento entre las áreas de agregación, para poder garantizar el flujo de los tiburones entre los parches de reservas.

Para poder llevar a cabo eficazmente estos planes y políticas de manejo es imprescindible incluir en ello a la comunidad y en especial a aquella que se ve directamente relacionada con el medio marino. Esto es factible dado que en algunas regiones del mundo, el aprovechamiento del tiburón ballena a través del ecoturismo resulta una actividad económicamente importante. En el Parque Marino Ningaloo, en la costa occidental de Australia, esta actividad genera una derrama económica para la región valuada en \$16 millones de dólares australianos por año. Ya que anualmente alrededor de 8000 turistas visitan la zona para nadar e interactuar con la especie. El éxito de la actividad en Australia se deriva de la rigurosa protección que se da a la especie en este país y al desarrollo de un programa de manejo. Asimismo es el resultado de la exclusividad en el uso del recurso.

Bajo dicha perspectiva el tiburón ballena y su hábitat representan una forma de capital natural importante para el país, donde el ecoturismo enfocado al nado con tiburón ballena cada vez tiene más auge. Lugares como Holbox, Bahía de Los Ángeles y La Bahía de La Paz, año con año son visitados por turistas de todo el mundo para nadar con tiburones ballena. En Holbox y Bahía de Los Ángeles poco a poco el tiburón ballena ha tomado sitio en la economía local; a su vez, se ha estado capacitando a los prestadores de servicios con la finalidad de que estas actividades se lleven a cabo bajo un ordenamiento y siguiendo los códigos de conducta de observación y nado con la especie; sin embargo, en BLP y BG existen empresas que se benefician con esta actividad pero no siguen ningún ordenamiento de la actividad. Por ello es necesario que el gobierno se involucre y se realice junto con los prestadores de servicios, pescadores locales y especialistas en realizar un plan de manejo para las actividades de observación y nado con tiburón ballena, así como para la conservación de sus hábitats críticos.

12. Recomendaciones

12.1 Técnicas

A lo largo del presente trabajo se intentó amplificar el complejo de máxima histocompatibilidad (MHC). A pesar de que se probaron diferentes juegos de primers no se pudo lograr; sin embargo, se cuenta con una serie de recomendaciones para lograr su amplificación:

1. Bajar todas las secuencias que tenga el banco de genes (genbank, [www. ncbi](http://www.ncbi)) del MHC Clase I y II de elasmobranquios.
2. Alinear las secuencias de MHC clase I.
3. Alinear las secuencias de MHC clase II.
4. Determinar mediante la alineación aquellas regiones conservadas y diseñar primers universales para la amplificación de estas moléculas en elasmobranquios.
5. Amplificar mediante PCR y corroborar con secuenciación

El desarrollo de los primers en el presente trabajo fue crítico y por ello uno de los principales objetivos, la experiencia obtenida durante esta etapa, me permite hacer recomendaciones en el sentido de evitar esfuerzos y gastos innecesarios para poder desarrollar nuevos marcadores.

Una parte muy importante es el antes de pedir los primers, analizarlos con un programa utilizando una secuencia de un organismo cercano y tener cuidado durante su análisis, además de que se alinien con la secuencia, es necesario corroborar que estén en una dirección adecuada, dado que unos primers empleados para MHC en el artículo se reportan al revés por lo que aunque se peguen la dirección de la amplificación va en sentido contrario, por lo que nunca se va a poder amplificar el fragmento deseado. Otra estrategia muy buena fue el invertir el primer (R) reportado para el citocromo b, dado esta secuencia esta al lado de la

región control del ADNmt que era mi secuencia objetivo y debido a que este primer ya se había utilizado en tiburón ballena con buenos resultados, tenía la garantía de que si iba a funcionar. El problema fue que el fragmento obtenido fue muy grande, lo que complicó, en el momento de limpiarlo con un kit de purificación, al ser un fragmento tan grande y con poco producto, se perdía mucho producto y no tenía la cantidad necesaria para la secuenciación, de forma equivocada se decidió probar varios kits para esta finalidad y aunque muchas veces si es para fragmentos grandes, se pierde mucho durante el proceso, por ello decidí clonar el fragmento, esta es una muy buena herramienta que se puede utilizar para diferentes finalidades, actualmente con los kits de clonación la metodología es relativamente sencilla y bastante útil.

Otro problema al que me enfrento es a la naturaleza de la región control, al ser un sitio altamente polimórfico, tiene numerosas repeticiones, por ello los primers empleados se pegaban en varios sitios obteniendo varios productos, no se sabía lo que estaba sucediendo hasta que se tuvieron las secuencias, incluso después de la clonación si utilizaba mis primers obtenía varios productos

Otra recomendación es después de la extracción del ADN probarlo con un control positivo, para estar seguro de la calidad del ADN y de alguna manera determinar las condiciones de la PCR, ya que en esta técnica existen varias variables (T° , MgCl, el DNA, primers y DNTP), normalmente las concentraciones de ADN, de DNTP y de los primers no se varían, los factores con los que se puede jugar son la T° y el MgCl, por ello al probar unos primers es recomendable hacer un gradiente de T° y de MgCl, el utilizar una T° baja es importante, ya que facilita que el primer se alinee a la secuencia objetivo, solo que se pueden obtener inespecíficos porque se puede pegar con facilidad a sitios que no sean el objetivo, sin embargo, es importante probarlo para ver si funcionan, de tal manera que si el ADN ya fue probado con un control positivo y no funciona con los primers diseñados a una baja temperatura, muy probablemente no funcionen. Al usarse con T° baja pueden haber inespecíficos, los cuales se puede quitar al aumentar la T° , normalmente el MgCl se usa a 1.5

mM, sin embargo muchas veces para quitar los inespecíficos se usa T° muy alta, por lo que es necesario aumentar la concentración de MgCl, las concentraciones de 2.5 mM o 3mM de MgCl puede disminuir la cantidad de producto obtenido, en estos casos es bueno valorar que es mejor hacer, si tener poco producto o cortar de gel para quitar los inespecíficos.

12.2 Investigación

La información obtenida mediante el análisis de secuencias de la región control del ADNmt es únicamente de los linajes maternos, por ello es recomendable comparar la información obtenida con otros marcadores que muestren intercambio genético como los microsatélites.

En el presente trabajo solo se analizaron muestras de tres localidades del Golfo de California, las cuales mostraron una homogeneidad genética, por lo que se plantea que sea la población del Golfo de California; sin embargo, es necesario obtener muestras de otras áreas de agregación dentro del Golfo; a su vez, debido a que se trata de una especie altamente migratoria, esta población puede extenderse más allá del Golfo, por ello deben de compararse con muestras de otras áreas del Pacífico como Oaxaca, Islas Galápagos, Islas Revillagigedo, Hawaii, entre otros.

Para poder realizar un análisis sobre viabilidad poblacional son necesarios más datos como el tamaño poblacional, por lo que es importante enfocarse a su determinación mediante censos aéreos y la combinación del método de captura-recaptura para la estimación del tamaño poblacional, lo cual puede realizarse con técnicas de foto-identificación y por medio de marcas convencionales. Estos estudios combinados con la determinación del tamaño efectivo poblacional mediante análisis genético permitirán determinar más la viabilidad poblacional.

El presente trabajo es sólo una parte del inicio del conocimiento de la estructura genética poblacional del tiburón ballena en el Golfo de California, gracias a la obtención de datos en campo como talla y sexo y a su combinación con la foto-identificación se pudo obtener

mayor información, sin embargo, es necesario el extender este estudio por un periodo mayor de tiempo y con un número mayor de muestras lo cual permitirá aceptar o refutar las hipótesis planteadas.

13. Bibliografía

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Álvarez, B.S., J.A. Rivera, G. Gaxiola, M.J. Acosta, R. A. Schwartziose. 1978. Nutrientes en el Golfo de California. *Cienc. Mar.* 5:53-71.
- Álvarez, B.S. y R.A. Schwartzlose. 1979. Masas de agua del Golfo de California. *Cienc. Mar.* 6:43-63.
- Álvarez-León y Castro Aguirre. 1983. Notas sobre la captura incidental de dos especies de tiburón en las costas de Mazatlán (Sinaloa) México. *Stud. Neotrop. Fauna E.* 4:201-207.
- Anónimo 2002a. Proposal to include the whale shark (*Rhincodon typus*) on appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES). Philippines and India, 12th Conference of Parties to CITES, Chile, November 2002. (www.cites.org).
- Anónimo. 2002b. Diario oficial de la federación, 6 de marzo de 2002. T (582:4). México, D.F. pp. 1-80.
- Aris-Brosou, S. y L. Excoffier. 1996. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Mol. Biol. Evol.* 13: 494-504.
- Avise, C.J. 1994. *Molecular Markers, Natural History & Evolution*. Chapman & Hall. USA. 511 pp.
- Bandelt, H-J, P. Forster, A. Rol. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48.
- Bartl, S. y I.L. Weissman. 1994. Isolation and characterization of major histocompatibility complex class IIB genes from the nurse shark. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:262-266.
- Clark, E. y D. Nelson. 1997. Young whale shark, *Rhincodon typus*, feeding on a copepod bloom near La Paz, México. *Env. Biol. Fishes* 50: 63-73.
- Colman, J.G. 1997a. A review of the biology and ecology of the whale shark. *J. Fish Biol.* 51: 1219-1234.
- Colman, J.G. 1997b. Whale shark interaction management, with particular reference to Ningaloo marine park. Department of conservation and Land management, Western Australia. 63 pp.

- Compagno, L.J. 1984. FAO species catalogue. Vol 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 1. Hexanchiformes to Lamniformes. FAO fisheries synopsis 125:209-211.
- Eckert, S.A. y B.S. Stewart. 1996. Migration and movements of the whale shark (*Rhincodon typus*) in the Sea of Cortez as determined by satellite telemetry. Hubb-Sea World Research Institute. Technical Report 96-269.
- Eckert, S.A. y B.S. Stewart. 2001. Telemetry and satellite tracking of whale shark, *Rhincodon typus*, in the Sea of Cortez, México, and north Pacific Ocean. *Env. Biol. Fishes* 60: 299-308.
- Eckert, S.A., L. L. Dolar, G. L. Kooyman, W. Perrin, R. A. Rahman. 2002. Movements of whale sharks (*Rhincodon typus*) in South-east Asian waters as determined by satellite telemetry. *J. Zool. Lond.* 257:111-115.
- Excoffier, L., P.E. Smouse, J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- García-García, B.M. 2002. Relación entre la biomasa zoopláctica y los avistamientos de tiburón ballena (*Rhincodon typus*, Smith, 1828) en Bahía de los Ángeles, B.C., México. Tesis de Licenciatura. UABC. Ensenada, México 50 pp.
- Graham., R. T. 2004. Global whale shark tourism [golden goose] of sustainable and lucrative income. *Shark News* 16:8-9.
- Grijalva-Chon, J.M., O. Numachi, J. Sosa-Nishizaki, K. de La Rosa Velez. 1994. Mitochondrial DNA analysis of North Pacific swordfish *Xipbias gladius* population structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 115:15-19
- Grijalva-Chon, J.M., A. Kaichi, K. Numachi. 2003. Baja variabilidad genética en dos muestras de tiburón angelito (*Squatina californica*) del Pacífico. Reporte técnico. 1-17
- Gunn, J.S. y J.D. Stevens. 1999. Observations on the short-term movements and behavior of whale sharks (*Rhincodon typus*) at Ningaloo Reef, Western Australia. *Mar. Biol.* 135:553-559.
- Hacohen, A.D. 2004. Abundancia y riqueza específica de presas preferenciales del tiburón ballena (*Rhincodon typus*, Smith, 1828) en la Bahía de La Paz. Tesis de licenciatura. UABCS. La Paz, México 45 pp.

- Haig, S. M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*.
- Hashimoto, K., T. Nakanishi, Y. Kurosawa. 1992. Identification of shark séquence resembling the major histocompatibility complex class I á 3 domain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89:2209-2212.
- Heist, J. 1999. A review of population genetics in sharks. *Am. Fish. Soc. Symp.* 23:161-168.
- Heist, J., J. E. Graves, J.A. Musick. 1995. Population genetics of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) in the Gulf of México and Mid-Atlantic Bight. *Copeia* 555-562.
- Heist, J., J.A. Musick, J. E. Graves 1996. Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53:583-588.
- Heyman, W.D., R.T. Graham B. Kjerfve, R.E. Johannes. 2001. Whale sharks *Rhincodon typus* aggregate to feed on fish spawn in Belize. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 215: 275-282.
- Hoelzel, A. R. 2001. Shark fishing in fin soup. 2001. *Conserv. Genet.* 2:69-72.
- Iñiguez, H. L. y R. A. Enríquez. 2004. Fichas de fotoidentificación de *Rhincodon typus* en Bahía de Los Ángeles, 2001-2003. UABC, Ensenada, México.
- Joung, S., C.T. Chen, E. Clark, S. Uchida, W. Huang. 1996. The whale shark, *Rhincodon typus*, is a livebearer: 300 embryos found in one 'megamma' supreme. *Env. Biol. Fishes* 46: 219-223.
- Kasahara, M., M. Vázquez, K. Sato, E.C. McKinney, M.F. Flajnik. 1992. Evolution of the major histocompatibility complex: Isolation of class II A cDNA clones from the cartilaginous fish. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89:6688-6692.
- Keeney, D. B., M. Heupel, R.E. Hueter, E. J. Heist. 2003. Genetic heterogeneity among blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, continental nurseries along the U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Mar. Biol.* 143:1039-1046.
- Ketchum, J.T y A.R. Lozano. 2000. Observations on the seasonal occurrences of whale sharks (*Rhincodon typus*) in the southern Gula of California. AES Symposium, Natural history of the whale shark. La Paz, B.C.S. Junio, 2000.
- Ketchum, M. J. 2003. Distribución espacio-temporal y ecología alimentaria del tiburón ballena (*Rhincodon typus*) en la Bahía de la Paz y zonas adyacentes en el suroeste del Golfo de California. Tesis maestría. CICIMAR. La Paz, México. 91 pp.

- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Pavo, F.X. Villablanca, A.C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86:6196-6200.
- Krishna, P. y M. Badrudeen. 1996. Report on a whale shark *Rhincodon typus* (Smith) caught in shore-seine from the Palk Bay. *Mar.Fish. Inf. Serv.* 142: 15-16.
- Kumar, S.K. 1998. On a whale shark landed and a turtle stranded at Digha, Midnapur districts, West Bengal. *Mar.Fish. Inf. Serv.* 156:21.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen, y M. Nei. 2001 MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Bioinformatics.
- Lavin, M.F., E. Beier, A. Badan. 1997. Estructura hidrográfica y circulación del Golfo de California: Escalas estacional e interanual. En: *Contribuciones a la Oceanografía física en México*. Lavin. M.F (Ed). 113-140p.
- Lozano, R.A. 2000. A proposed management program for the whale shark *Rhincodon typus* of la Paz Bay, B.C.S. AES Symposium, Natural history of the whale shark. La Paz, B.C.S. Junio, 2000.
- Llaca S., J.L. Moreno, H. Santoyo, G. Figueroa. 1995. Dinoflagelados del Golfo de California. UABCS. 165 pp.
- Marinote, S.G. y M.F. Lavin. 1997. Mareas y corrientes residuales en el Golfo de California. En: *Contribuciones a la Oceanografía física en México*. Lavin. M.F (Ed). 141-172p.
- Martin, A. P. y S.R. Palumbi. 1993. Protein evolution in different cellular environments: citicrome *b* in sharks and mammals. *Mol. Biol. Evol.* 4:873-891.
- Mittermeier, R.A., P.G. Robles, C.M. Goettsch. 1997. Megadiversidad. Los países biológicamente más ricos del mundo. CEMEX. México. 501 pp.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nieto, A. y J. Llorente. 1997. Caracteres moleculares en los métodos de la sistemática moderna. En: *Taxonomía biológica*. J. Llorente y I. Luna (Eds.). México. 157-201p.
- Nelson, J.D. y S.A. Eckert. 2000. Local habitat distribution and utilization of whale shark (*Rhincodon typus*) within Bahía de los Ángeles, B.C., México. AES Symposium, Natural history of the whale shark. La Paz, B.C.S. Junio, 2000.
- Norman, B.M. 2000. En: *2000 IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. xviii+61 pp.

- Norman, B. 2004. Review of the current conservation concerns for the whale shark (*Rhincodon typus*), a regional perspective. AMCS. 74 pp.
- Otha, Y., K. Okamura, E. C. McKinney, S. Bart, K. Hashimoto, M. F. Flanjnik. 2000. Primitive syntesis of vertebrate major histocompatibility complex class I and Class genes. Proc. Nat. Acad. Sci. 97:4712-4717.
- Pai, M.V., G. Nandakumar, K.Y. Telang. 1983. On a whale shark *Rhincodon typus* (Smith) landed at Karwar, Karnataka. Indian J. Fish. 30(1): 157-160.
- Pardini, A.T., C.S. Jones, L.R. Noble, B. Kreiser, H. Malcolm, B.D. Bruces, J.D. Stevens, G. Cliff, M.C. Scholl, M. Francis, C.A.J. Duffy, A. P. Martin. 2001. Sex-biased dispersal of great white sharks. Nature 412:139-140.
- Parker, P. G. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. Ecology.
- Posada, D. y K.A. Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. Trends Ecol. Evol. 16, 37-45.
- Randi, E. 2000. Mitochondrial DNA. En: Molecular Methods in ecology. A.J. Baker (Ed). Blackwell. Oxford.
- Primark, R. B. 2002. Essentials of Conservation Biology. Sinauer Associates. USA. 698 pp.
- Roden, G.I. y G.W. Groves. 1959. Recent oceanographic investigations in the Gulf of California. J. Mar. Res. 18 (1):10-35.
- Rodríguez, N.D, R. A. Enríquez, N.T., Cárdenas, A.G. Zavala, A. H. Vázquez, C.R. Godínez. 2003. Propuesta de programa de manejo de tiburón ballena (*Rhincodon typus*) con referencia específica a Bahía de Los Ángeles, Baja California. Documento para revisión. México. 61pp.
- Rosel, P. E. y B. A. Block. 1996. Mitochondrial control region variability and global population structure in the swordfish, *Xiphias gladius*. Mar. Biol. 125:11-22.
- Sambrock, L. Fritsch, E.F., T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sandoval-Castillo, J., A. Rocha-Olivares, C. Villavicencio-Garayzar, E. Balart. 2004. Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. Mar. Biol. 145: 983-988.

- Schneider, S., D. Roessli, L. Excoffier. 2000 Arlequin. 2.000: A software of population genetic data análisis. Genetics and Biometry laboratory. University of Geneva, Swizerland.
- Shriram S.M., C.J. Joskutty, J. Hotag. 1994. A note on a whale shark *Rhincodon typus* landed at coperage landing centre, Bombay. Mar. Fish. Inf. Serv. 126: 16.
- Silas, E.G. y M.S. Rajagopalan. 1963. On a recent capture of a whale shark (*Rhincodon typus*, Smith) at tuticorin, with a note on information to be obtained on whale sharks from Indian waters. J. Mar. Biol. Ass. India 1: 153-157.
- Siraimetan, P. 1998. On a whale shark *Rhincodon typus* (Smith) caught off Manapad, Gulf of Mannar. Mar. Fish. Inf. Serv. 154: 17.
- Sivadas, M. 1991. On the landing of whale shark *Rhincodon typus* Smith off Malpe Dakshina Kannada coast. Mar. Fish. Inf. Serv. 110: 10-11.
- Smith, T.B. y R.K. Wayne. 1996. Molecular genetic approaches in conservation. Oxford University Press. USA. 483 pp.
- Swofford, D. L. 1998. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamarin, H.R. 1996. Principios de genética. Reverté. España. 607 pp.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. Genetics 123: 597-601.
- Taylor, J.G. 1994. Whale sharks, the gigants of Ningaloo Reef. Angus & Robertson. Sydney. 176 pp.
- Taylor, J.G. y A.F. Pearce. 1999. Ningaloo Reef currents: implications for coral spawn dispersal, zooplankton and whale shark abundance. J. Royal Soc. West. Aust. 82: 57-66.
- Urbán, R.J. y M. R. Ramírez 1997. La Bahía de La Paz. UABCS. México. 345pp.
- Waples, R.S. 1995. Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species. Act. Am. Fish. Soc. Symp. 17:8-27.
- Wen-Been, C., L. Ming-Yih, F. Lee-Shing. 1997. Embryos of the whale shark, *Rhincodon typus*: Early growth and size distribution. Copeia 2: 444-446.
- Wilson, S.G. y D.R. Newbound. 2001. Two whale shark faecal samples from Ningaloo reef, Western Australia. B. Mar. Sci. 68: 361-362.

- Wilson, S.G., J.G. Taylor, A.F. Pearce. 2001. The seasonal aggregation of whale sharks at Ningaloo Reef, Western Australia: currents, migrations and the El Niño/Southern Oscillation. *Env. Biol. Fishes* 61:1-11.
- Wintner, S.P. 2000. Preliminary study of vertebral growth rings in the whale shark, *Rhincodon typus*, from the east coast of South Africa. *Env. Biol. Fish.* 59:441-451.
- Wolfson, F.H. 1986. Occurrences of the whale shark, *Rhincodon typus*, Smith. Pp. 208-226. En: Indo-Pacific Fish Biology. Uyeno, T., R. Arai, T. Taniuchi, K. Matsuura (Eds.). Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes, Ichthyological Society of Japan, Tokio.
- Wolfson, F.H. 1987. the whale shark, *Rhincodon typus*, Smith 1828, off Baja California, México (Chondrichthyes:Rhincodontidae). *Mem. V Simp. Biol. Mar., UABCS*, 5:103-108.

APÉNDICE A

Hoja de registro



PROYECTO TIBURÓN BALLENA
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

AVISTAMIENTO

FECHA/HORA _____

LOCALIZACIÓN _____

GPS (latitud/longitud) _____

TAMAÑO _____

SEXO _____

BIOPSIA _____

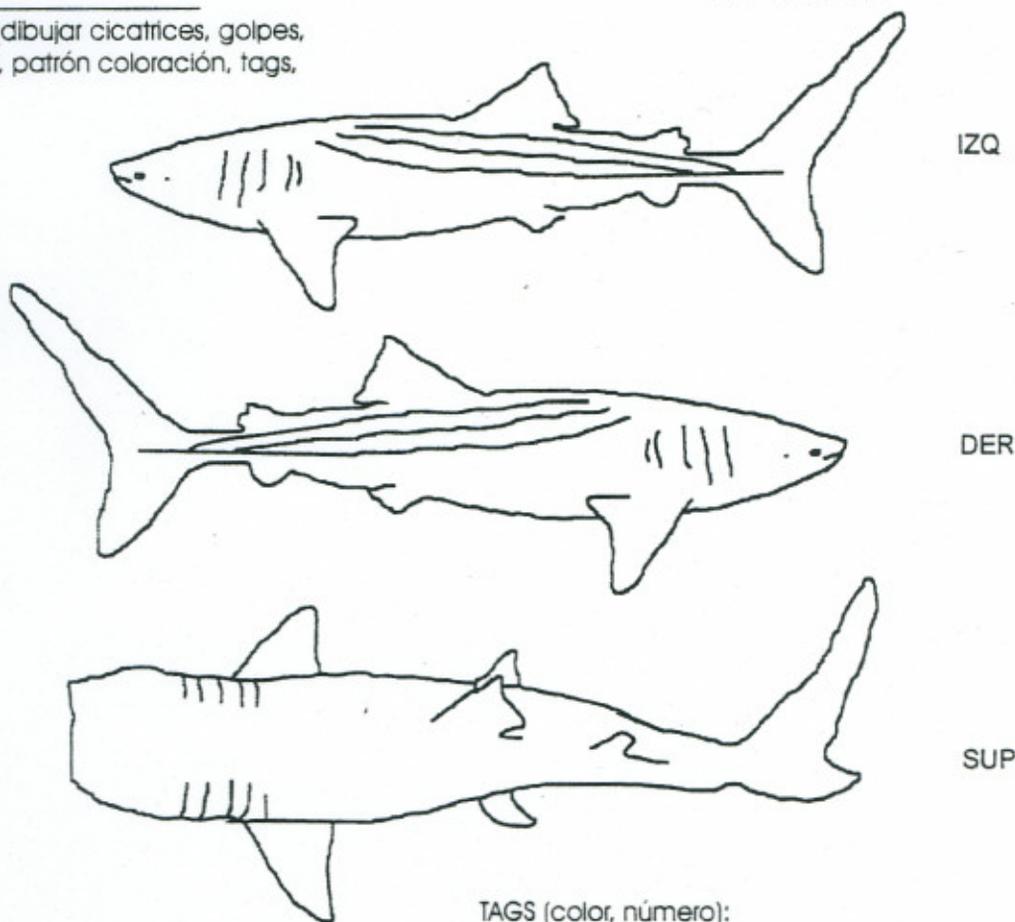
MARCAS (dibujar cicatrices, golpes, mordidas, patrón coloración, tags,

MANDAR FORMA Y/O INFORMACIÓN A:

Proyecto Tiburón Ballena
Apartado Postal 701
La Paz, B.C.S. 23000

o a:

James Ketchum: jketchum@uabcs.mx
Felipe Galván: fgalvan@redipn.ipn.mx
Dení Ramírez Macías: defenilipe@yahoo.com
Tels: (112) 246-35, (112) 538-28, (112) 353-20
Fax: (112) 538-29, (112) 253-22
Radio VHF-canal 73



FOTOGRAFÍAS/VIDEO (si o no):

NOMBRE Y DIRECCION (fotógrafo):

OBSERVACIONES (comportamiento: alimentándose, nadando en superficie o a profundidad, etc.)

NOMBRE Y DIRECCION (observador (es)):

Nota: Llenar sólo una forma por tiburón ballena avistado.

APÉNDICE B

Bahía de la Paz

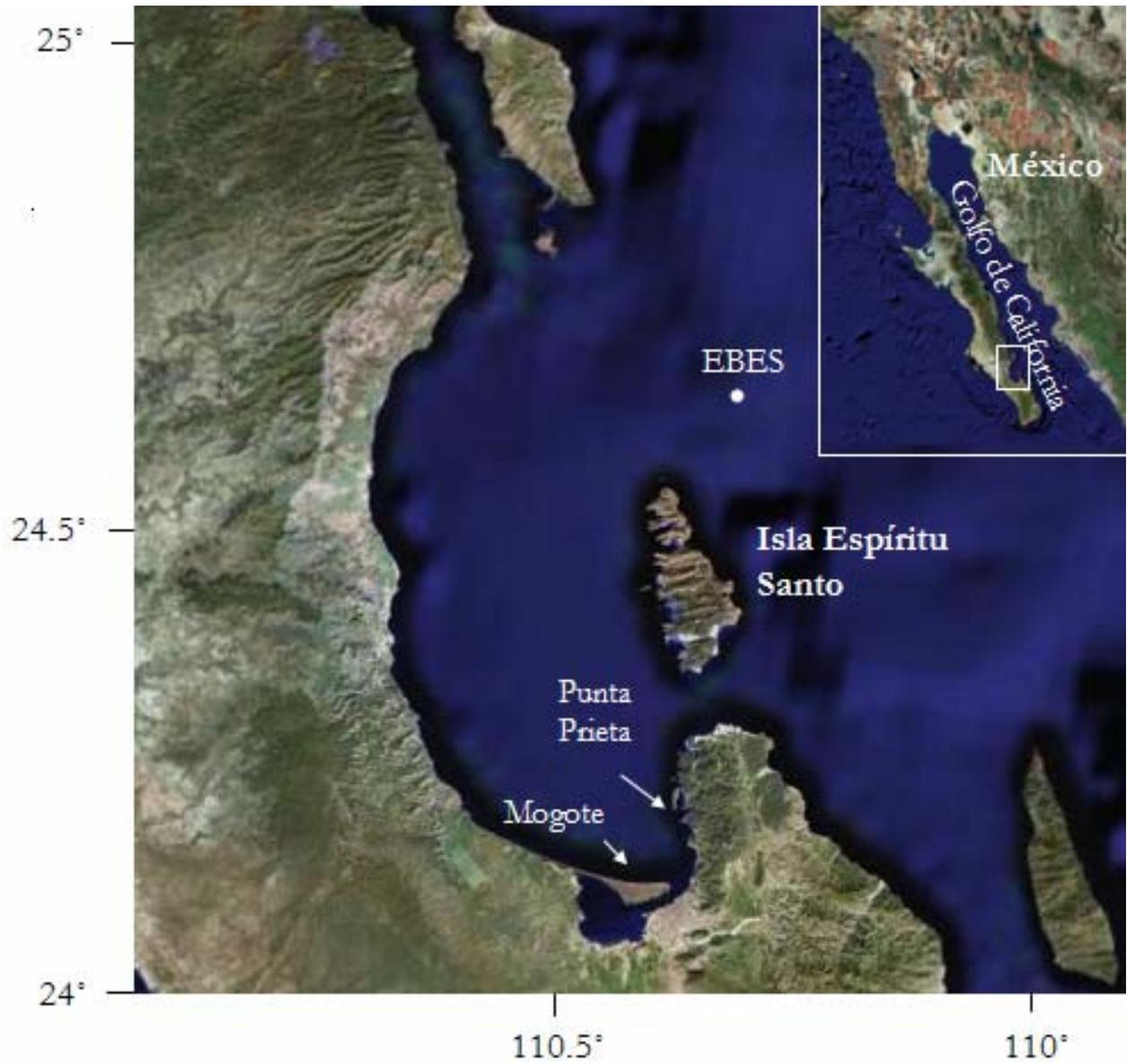


Figura 15. Bahía de La Paz. Muestra la zona del Bajo (EBES) la cual es considerada como área de crianza primaria, El Mogote y Punta Prieta que son consideradas como áreas de crianza secundarias.