



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL  
NOROESTE, S. C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTRUCTURA GENÉTICA Y POBLACIONAL DE  
*Tursiops truncatus* (CETACEA: DELPHINIDAE) EN EL  
GOLFO DE CALIFORNIA: ¿SON LAS FORMAS  
COSTERA Y OCEÁNICA GENETICAMENTE  
DIVERGENTES?**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en: Biotecnología)

p r e s e n t a

**Liliana Carolina Rojo Arreola**

**La Paz, B. C. S. Agosto del 2005**

## Resumen

Para los cetáceos, mamíferos caracterizados por su gran capacidad de desplazamiento, se dificulta explicar cómo se ha dado la restricción del flujo génico que caracteriza la estructura de sus poblaciones, en un medio en donde no existen barreras fisiográficas notables. Se ha sugerido que uno de los más importantes mecanismos de diferenciación genética entre algunas poblaciones simpáticas y parapátricas de cetáceos, son las especializaciones intraespecíficas del uso de recursos. El Pacífico Noreste y el Atlántico Norte se han descrito morfotipos costeros y oceánicos del delfín o tursiÓN *Tursiops truncatus* que presentan una divergencia genética a nivel poblacional. Walker en 1981 reporta la existencia de al menos dos morfotipos oceánico y costero en el Golfo de California, que pueden distinguirse con base a su craneometría, número de dientes, robustez, talla, y la proporción que guardan el rostro y altura del melón; el largo y ancho de las aletas; y el grosor del pedúnculo caudal. Para probar dos hipótesis, una que plantea que en el Golfo de California los tursiones están segregados en dos formas, costera y oceánica; y una hipótesis alternativa que estipula que los grupos de tursiones presentan segregación latitudinal en dicha área, se obtuvieron biopsias de piel de 78 delfines identificados *in situ* como pertenecientes a la forma costera u oceánica por observadores de campo experimentados. Usando técnicas de PCR se amplificaron dos marcadores genéticos, región control del ADN mitocondrial y el intrón de la proteína PLP (proteolipídica), cuyos productos fueron secuenciados automáticamente. Las secuencias de 464 pb pertenecientes a la primera mitad de la región control del ADN mitocondrial revelaron 34 sitios variables los cuales definen a 27 haplotipos entre 58 organismos del Golfo de California analizados. Los análisis de dichas secuencias indicaron un nivel de diferenciación genética moderado pero significativo entre los ecotipos costero y oceánico ( $F_{ST}=0.10128$ ,  $p<0.002$ ;  $\Phi_{ST}= 0.07616$ ,  $p<0.05474$ ). La forma costera mostró menor variabilidad genética (0.8 y 0.011, diversidad haplotípica y nucleotídica respectivamente) que la oceánica (0.9 y 0.014), lo que sugiere la existencia de un cuello de botella poblacional. Adicionalmente se compiló y analizó una base de datos de 78 secuencias de ADN mitocondrial de tursiones de la forma oceánica, las cuales corroboran la existencia de una ligera subdivisión poblacional ( $F_{ST}= 0.06602$ ,  $p< 0.0001$ ;  $\Phi_{st}= 0.12571$ ,  $p< 0.0001$ ), las agrupaciones de la región del Golfo Norte y Sinaloa resultaron mejor diferenciadas. Los análisis de las secuencias intrónicas no mostraron diferenciación genética entre algunos machos de grupos de tursiones muestreados en el Golfo, sugiriendo un flujo génico entre los grupos de tursiones residentes del Golfo dependiente principalmente de los machos, lo cual tiende a homogeneizar la estructura poblacional de estos delfines.

Palabras clave: *Tursiops truncatus*, ADN mitocondrial, genética de poblaciones.

## Abstract

Understanding the process of genetic subdivision in cetaceans is particularly challenging because many species have vast geographic distributions and individuals are highly mobile. In the marine environment, few geographical boundaries exist, yet population differentiate and species evolve. The interaction between habitat characteristics and behavioral, and ecological specializations (e.g. phylopatry to foraging grounds), are the main factors influencing the structure of cetacean populations. After the description of coastal and offshore bottlenose dolphin morphotypes and of their population genetic divergence in the Northeastern Pacific and the North Atlantic, research efforts started in the Gulf of California to prove the existence of both morphotypes. In 1981 Walker compared several cranial characters, number of teeth and length and found primarily modal distinctions between the nearshore and an offshore forms. To test two hypotheses, one that states that bottlenose dolphins are segregated in coastal and offshore forms, and an alternative one that groups of bottlenose dolphins show latitudinal segregation in this study area, we obtained skin biopsies from 78 individuals identified *in situ* as belonging to either the coastal or offshore form, by experienced field observers. Two genetic markers (mtDNA control region and a hypervariable intron of the proteolipid protein) were amplified and automatically sequenced using PCR technology. Amplified mtDNA (480bp), showed nucleotide substitutions at 34 sites, defining 27 haplotypes among 58 analyzed sequences. Analyses of such mtDNA sequences pointed to moderate but significant levels of genetic differentiation between coastal and offshore bottlenose dolphin morphotypes ( $F_{ST}=0.10128$ ,  $p<0.002$ ;  $\Phi_{ST}=0.07616$ ,  $p<0.054$ ), the coastal form showing less genetic variability (gene and nucleotide diversities, respectively: 0.8 and 0.011) than the oceanic (0.9 and 0.014), suggesting the existence of a population bottleneck. Also, a database of 78 bottlenose dolphin mtDNA sequences was compiled and analyzed, and showed genetic differentiation among geographically distant groups, with the groups from the northern part of the Gulf and Sinaloa being the best differentiated ( $F_{ST}= 0.06602$ ,  $p< 0.0001$ ;  $\Phi_{st}= 0.12571$ ,  $p< 0.0001$ ). In addition, intronic DNA data pointed that no genetic differentiation exist between groups of male bottlenose dolphins sampled in the Gulf, suggesting that male dependent gene flow among dolphin groups tend to homogenize the structure of this population of dolphins.

Key words: Bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, mtDNA, population genetics.

# CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>6</b>
2.1. ECOLOGÍA DE <i>TURSIOPS TRUNCATUS</i> .....	6
2.2. ECOLOGÍA TRÓFICA DE LA ESPECIE .....	7
2.3. SISTEMÁTICA Y TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>TURSIOPS</i> .....	8
2.4 <i>TURSIOPS</i> EN EL GOLFO DE CALIFORNIA .....	8
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>18</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>6. MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
6.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	20
- Bahía de La Paz .....	20
- Bahía Concepción.....	21
6.2. MUESTREO ECOLÓGICO Y DE TEJIDOS.....	23
- Delfines Costeros: Bahía de La Paz y Bahía Concepción .....	23
- Delfines Oceánicos: Resto del Golfo de California.....	25
6.3. ANÁLISIS GENÉTICOS.....	26
6.3.1. Rutinas de Laboratorio.....	26
- Extracción y purificación de ADN.....	26
- Determinación de sexo.....	27
- Rutinas de amplificación de marcadores moleculares.....	28
6.3.2. Caracterización genética: Estimación de parámetros genéticos.....	30
- Diferente proporción de sexos en grupos de tursiones costeros y oceánicos.....	30
- Diversidad Genética.....	31
- Estructura Genética .....	32
- Reconstrucción Filogenética .....	34
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
7.1 ESFUERZO DE MUESTREO .....	36
7.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA MUESTRA .....	37
- Bahía de La Paz .....	37
- Bahía Concepción.....	38
- Resto del Golfo de California.....	38
7.3. ANÁLISIS DEL SESGO DE LA PROPORCIÓN DE SEXOS.....	39
7.4 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA .....	40
7.4.1 DIVERSIDAD GENÉTICA .....	40
- ADN mitocondrial.....	40
- Secuencias Intrónicas .....	43
7.4.2. ESTRUCTURA GENÉTICA Y DIVERGENCIA ENTRE POBLACIONES.....	45
- ADN mitocondrial.....	45

<i>Entre los ecotipos costero y oceánico</i> .....	45
<i>Entre Poblaciones del ecotipo oceánico</i> .....	46
- <i>Secuencias Intrónicas</i> .....	48
<i>Entre ecotipos</i> .....	48
<i>Entre poblaciones</i> .....	49
<i>Red Median-Joining</i> .....	49
7.4.3. RELACIONES FILOGENÉTICAS .....	53
- <i>ADN mitocondrial</i> .....	53
<i>Entre Ecotipos</i> .....	53
<i>Entre poblaciones</i> .....	55
- <i>Secuencias Intrónicas de PLP</i> .....	58
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>77</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA CITADA</b> .....	<b>79</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>94</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localización geográfica del área de estudio: La Costa Occidental del Golfo de California, donde se realizaron muestreos intensivos, en las Bahías de La Paz y Concepción y un crucero dentro del Proyecto “Ballenas del Golfo de California” (el vector representa el patrón de travesía) para colectar biopsias de piel de delfines del género *Tursiops*. Se indica la subdivisión regional del Golfo de California. .... 22
- Figura 2. Ejemplo de visualización de algunos de los extractos de ADN de *Tursiops truncatus* en un gel de agarosa, en la primer columna el marcador de peso molecular. .... 26
- Figura 3. Ejemplo de visualización en un gel de agarosa de los productos de PCR para determinar el sexo de algunos delfines *Tursiops truncatus*. .... 27
- Figura 4. Los puntos indican las posiciones geográficas en donde han sido tomadas las biopsias. . 39
- Figura 5. Red Median-Joining que muestra las relaciones entre los haplotipos. El diámetro del círculo es proporcional al número de individuos con ese haplotipo. El numero de mutaciones entre cada haplotipo es proporcional al largo de la línea que los separa. .... 51
- Figura 6. Red Median-Joining que muestra las relaciones entre los haplotipos de los grupos de delfines oceánicos muestreados lo largo del Golfo. El diámetro del círculo es proporcional al número de individuos con ese haplotipo. El numero de mutaciones entre cada haplotipo es proporcional al largo de la línea que los separa. En rojo GN, en verde GI, en amarillo GC, en azul GS, en gris SIN y en rosa un individuo fuera del Golfo (Bahía Magdalena) ..... 52
- Figura 7. Árbol filogenético de N-J de 28 haplotipos. El numero arriba de las ramas indica las proporciones de bootstrap en 1000 replicas. Las figuras rellenas representas animales costeros. Los círculos individuos del Golfo Sur; los cuadros animales del Golfo Centro, los rectángulos del Golfo Norte y las cruces a animales de fuera del Golfo (Bahía Magdalena) ..... 54
- Figura 8. Filogenia N-J de 44 haplotipos de delfines oceánicos en diferentes localidades del Golfo. 57
- Figura 9. Dendograma N-J de los 5 haplotipos del intron PLP. El numero arriba de las ramas indica las proporciones de bootstrap en 1000 replicas. Las figuras rellenas representas animales costeros. Los círculos individuos del Golfo Sur; los cuadros animales del Golfo Centro, los rectángulos del Golfo Norte y las cruces a animales de fuera del Golfo (Bahía Magdalena). ..... 58

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Proporción de sexos de las muestras analizadas .....	40
Tabla II. Sitios variables entre los 27 haplotipos de ADNmt encontrados en las muestras de tejido de <i>Tursiops</i> colectadas el Golfo de California.....	41
Tabla III. Frecuencia y distribución de haplotipos por ecotipo .....	42
Tabla IV. Diversidad genética del ADNmt de cada uno de los ecotipos y total.....	43
Tabla V. Sitios variables entre los 5 haplotipos encontrados en las secuencias intrónicas PLP de <i>T. truncatus</i> machos en el Golfo de California. ....	43
Tabla VI. Frecuencia y distribución de haplotipos del intrón PLP por ecotipo.....	44
Tabla VII. Diversidad genética del intrón PLP en cada uno de los ecotipos y total.....	45
Tabla VIII. Análisis de Varianza genética ( $F_{st}$ ) entre ecotipos.....	46
Tabla IX. Análisis de Varianza molecular ( $\Phi_{st}$ ) entre ecotipos.....	46
Tabla X. Comparaciones pareadas, de valores $F_{ST}$ (diagonal inferior) y $\Phi_{ST}$ (diagonal superior) calculados para grupos de tursiones oceánicos muestreados en distintas áreas del Golfo. En negrita los valores que resultaron significativos.....	47
Tabla XI. Comparaciones pareadas de los valores de $N_m$ entre regiones calculados con base en los valores de $F_{ST}$ (diagonal inferior) y $\Phi_{ST}$ (diagonal superior) calculados para grupos de tursiones oceánicos. Los valores con índices de fijación significativos se marcan en negritas .....	48
Tabla XII. Relaciones pareadas entre regiones. Debajo de la diagonal se muestran los valores de $F_{ST}$ y arriba los de $\Phi_{ST}$ resultantes de los análisis de secuencias intrónicas. Ningún valor resultó ser significativo.....	49
Tabla XIII. Frecuencia y distribución de haplotipos por ecotipo. Las filas sombreadas indican los haplotipos compartidos entre el ecotipo costero y oceánico. Los valores en negrita indican aquellos haplotipos que también fueron registrados en este trabajo, contribuyendo a la frecuencia de los mismos (modificado de Segura 2004).....	67

## 1. INTRODUCCIÓN

El delfín comúnmente denominado tursiión *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), es la especie de cetáceo mas conocida y estudiada, tiene un amplio rango de distribución y los individuos de esta especie forman grupos con una compleja estructura social. Existen variaciones geográficas en los morfotipos de la especie, y en diferentes localidades, p. ej. en el Atlántico Noroeste, en el Pacifico Noreste y en el mar de China (Ross, 1977, Walker 1981, Duffield *et al.* 1983, Ross y Cockcroft 1990, VanWaerebeek *et al.* 1990, Mead y Potter 1995), e incluso en el Golfo de California, donde se informa que coinciden una forma costera y otra oceánica de esta especie (e.g. Walker, 1981).

Hoelzel (1998) sugiere que uno de los más importantes mecanismos de diferenciación genética entre algunas poblaciones simpáticas y parapátricas de cetáceos, son las especializaciones intraespecíficas del uso de recursos. Es decir, que para los cetáceos, un orden taxonómico de mamíferos caracterizado por su gran capacidad de desplazamiento, se dificulta explicar cómo se ha dado la restricción del flujo génico que caracteriza la estructura de sus poblaciones y finalmente la génesis de sus especies, en un medio en donde no existen barreras fisiográficas notables (p. ej. montañas, desfiladeros, cordilleras, hondonadas). Así, hasta ahora se acepta que ambos procesos, obedecen a una especialización trófica paulatina (Gaskin 1983), la que en el caso de las poblaciones y especies de se ve reflejada tanto a nivel de la divergencia de su morfometría craneal (Gaskin 1983, Walker 1981), como en diferencias sutiles en sus capacidades de buceo (Hersh y Duffield 1990), y adaptaciones convergentes de coloración (e.g. Wang *et al.* 1999), las que se relacionan a gradientes ambientales que van cambiando paulatinamente (Gaskin 1983). La evidencia sobre la divergencia de distintos taxa al especializarse a lo largo de gradientes



ambientales ha aumentado en años recientes, específicamente en las conocidas como poblaciones parapátricas, y a menudo se originan a partir de comportamientos divergentes (West-Eberhard 1989, Metcalfe 1993).

En los cetáceos, los casos de divergencia morfológica, genética y de caracteres de vida en simpatria o parapatria son pocos pero, las orcas residentes y transeúntes que coexisten en aguas de la Columbia Británica simpatria son un buen ejemplo. Éstas difieren en morfología, especializaciones alimenticias, tamaños y estabilidad de los grupos y constitución genética (Bigg 1982, Baird y Stacey 1988, Hoelzel y Dover 1991, Baird y Dill 1995, 1996). Ya que las orcas tienen una vida social muy compleja y una alta capacidad de aprendizaje, se ha sugerido que esta fuente de especialización puede haberse dado por herencia de tradiciones sociales (Hoelzel 1998, Whitehead 1998). Una predicción de dicha hipótesis es que las diferencias genéticas entre los grupos sociales están correlacionadas con diferencias en el comportamiento alimenticio, tamaño y estabilidad de los grupos más que por las distancias geográficas.

Por otra parte, a nivel mundial, distintos estudios sobre delfínidos, elaborados considerando la meso (cientos de km.) y mega (miles de km.) escala geográfica indican que no existe un patrón claro de correlación directa entre la distancia geográfica y la divergencia en morfología, de comportamiento alimenticio, estructura social e incluso genética.

Por ejemplo, a micro escala (escalas geográficas menores a los 100 km.) los ecotipos residente y transeúnte de orcas, con sus distintos patrones de coloración de la "silla", presas y estrategia alimenticia, estructura social y divergencia génica correspondiente, son simpátricos en aguas de Columbia Británica (Ford *et al.* 1998), al igual que las formas de rostro largo y corto del delfín común en Bahía de Monterrey EUA (Rosel *et al.* 1994) y las formas *T. truncatus* y *T. aduncus* difieren en su

morfometría y hábitos alimenticios en el mar de China (Wang *et al.* 1999). Comparativamente, las formas costera y oceánica de *Tursiops* en Bahamas, que difieren poco en su morfometría, patrones de coloración, y estructura social, muestran preferencia por distintos hábitats donde localizan a sus presas, y distintas estrategias de depredación, manteniéndose siempre en ambientes distintos, separados por tan solo 27 km de distancia que separan la costa del mar abierto (Rossbach y Herzing 1999).

En el Golfo de California, se reporta la existencia de al menos dos morfotipos oceánico y costero que pueden distinguirse con base a su craneometría, número de dientes, robustez, talla (Walker 1981), y la proporción que guardan el rostro y altura del melón; el largo y ancho de las aletas; y el grosor del pedúnculo caudal (Díaz-Gamboa 2003), resaltando que incluso se haya propuesto la existencia de un número mayor de morfotipos de acuerdo a las diferencias craneométricas a partir del análisis de una muestra muy reducida de individuos (Vidal-Hernández 1993).

Más específicamente, Walker (1981) comparó varios caracteres craneales y encontró distinciones modales entre la forma costera (referida como *T. gilli*) y la oceánica (referida como *T. nuuanu*) para el Pacífico Nororiental. En el Golfo de California el ecotipo costero es comparativamente más grande, robusto y de color más claro que la forma oceánica, también tiene un rostro más corto (Walker 1981, Díaz-Gamboa 2003), se alimenta principalmente de especies de peces costeros de la familia Scianidae y Embiotocidae (Walker 1981) y forma unidades sociales más pequeñas y cohesivas (~20 animales) (Salinas-Zacarías 2005). En contraste, la forma oceánica tiene el rostro más alargado (Walker 1981, Díaz-Gamboa 2003) y se pueden observar un gran número de cicatrices en el pedúnculo caudal de los adultos, se alimenta principalmente de peces

epipelágicos y cefalópodos (Walker 1981), forman grupos mas grandes (>100) con unidades sociales mas dinámicas (Walker 1981, Rojo-Arreola 2002, Salinas-Zacarias 2005).

Finalmente en un trabajo reciente, Segura (2004) intentó reconocer la divergencia genética entre biopsias de 100 tursiones muestreados en el Golfo de California, que segregó como provenientes de tursiones costeros u oceánicos, acorde a la distancia a la costa y profundidad de colecta. En total encontró 32 haplotipos de ADNmt, cuya distribución y frecuencia sugiere una ligera diferenciación genotípica entre los ecotipos, lo que se interpreta como resultado de su divergencia reciente. Regionalmente, los análisis también sugieren la existencia de diferenciación entre el Norte y Sur del Golfo y Sinaloa. Posiblemente la falta de contundencia del análisis mencionado se deba a la asignación errónea de individuos al morfotipo costero u oceánico en el momento del muestreo, pues Rojo-Arreola *et al.* (2001) indican que ambos morfotipos llegan a ser simpátricos en distintas áreas del Golfo.

Con base a lo descrito, en este trabajo y en contraste con el de Segura (2004), se determinó por una parte muestrear a tursiones, identificados por observadores experimentados (Díaz-Gamboa, Rojo-Arreola y Salinas-Zacarias) como pertenecientes a la forma costera u oceánica y se condujo un análisis análogo al Segura (2004), para resolver si a las diferencias morfológicas entre las formas costera y oceánica o entre tursiones pertenecientes a distintos grupos localizados a lo largo del Golfo de California, se relacionan a una divergencia genética significativa, definiendo una estructura subpoblacional entre los ecotipos costero y oceánico descritos previamente (e.g. Díaz-Gamboa 2003) y/o entre distintos grupos de *Tursiops* distribuidos a lo largo del Golfo de California (e.g. Walker 1981).

Para validar estas hipótesis se analizaron marcadores moleculares indicativos del sexo de los animales, para reconocer si la proporción de sexos de grupos de tursiones identificados como costeros u oceánicos era diferente, y con ello reforzar la noción de que existen al menos dos ecotipos en distintas áreas del Golfo de California. Además, se analizaron marcadores mitocondriales (región control) y nucleares (intrón de los genes codificantes de la proteína proteolipídica de mielina PLP y Biglicano BGN), adoptando así el enfoque ampliamente utilizado para comprobar la divergencia entre ecotipos de cetáceos y grandes mamíferos en general y de *Tursiops* en particular (Hoelzel *et al.* 1998, Wang *et al.* 1999, Roca *et al.* 2001, Natoli *et al.* 2004). Así se evaluó si el grado de aislamiento reproductivo es suficiente como para considerar a ambas formas como poblaciones o incluso especies distintas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Ecología de *Tursiops truncatus*

El delfín *Tursiops truncatus*, pertenece al Orden Cetacea y Familia Delphinidae, es una especie cosmopolita que se encuentra en casi todos los océanos excepto en latitudes muy altas. El límite de distribución de la especie parece relacionarse con la temperatura del mar y directa o indirectamente con la distribución de sus presas principales (Wells y Scott 1999). En el Pacífico, la especie se distribuye desde las aguas templadas del Norte de Japón y California, hacia el Sur, hasta alcanzar las aguas de Australia y Chile (Leatherwood y Reeves 1983).

En el ámbito de distribución de la especie, existen regiones donde se han descrito dos morfotipos, uno costero y uno oceánico que pueden llegar a ser simpátricos (Van Waerebeek *et al.* 1990). La forma costera habita generalmente zonas protegidas y someras cercanas a la costa, mientras que la forma oceánica se encuentra en aguas pelágicas cuya profundidad va de los 200 a los 5,000 metros o más (Kenney 1990).

Algunos estudios han indicado que la forma costera tiene ámbitos hogareños restringidos (Scott *et al.* 1990). En contraste, el ecotipo oceánico, presenta ámbitos hogareños menos restringidos y desplazamientos más amplios (Leatherwood y Reeves 1983).

Además de su ecología distintiva, ambas formas difieren en su estructura social, cuya flexibilidad indica, al igual que para otros mamíferos (Andreassen *et al.* 1998; Berteaux y Boutin 2000), la flexibilidad de esta especie para adaptarse a los cambios ambientales. La estructura social de los tursiones se ha analizado respecto a la forma en que los individuos de la especie se relacionan y organizan dentro de los grupos (Wells *et al.* 1980; Ballance 1990; Shane 1990), encontrándose diferencias básicas en la organización social de los grupos de delfines costeros y

oceánicos. Por ejemplo, los tursiones de aguas costeras tienden a formar grupos pequeños, mientras los delfines oceánicos forman grupos más grandes y cohesivos (Shane *et al.* 1986, Connor *et al.* 2001). Además, la amplitud de movimientos de los delfines costeros se relaciona con el género de los individuos. Las hembras usan de manera preferencial áreas confinadas mientras que los machos se dispersan más (Wells *et al.* 1987, Scott *et al.* 1990, Connor *et al.* 2001).

Aunque, la distribución espacial y hábitats preferidos por cada uno de estos ecotipos requieren definirse con mayor precisión, existen evidencias del aislamiento reproductivo entre ambos dadas sus diferencias en morfología general y craneal, su hematología, fauna parasitaria y patrones de asociación (e. g. Hersh y Duffield 1990; van Waerebeek *et al.*, 1990; Roosbach y Herzing 1999).

## **2.2. Ecología Trófica de la Especie**

Los tursiones son considerados depredadores oportunistas pues se alimentan de una enorme variedad de peces e invertebrados. Sus presas principales son distintas en diferentes localidades, y también en relación a su abundancia (Barros y Odell 1990). Debido a que los delfines de la forma costera se pueden encontrar cerca de la costa, a menudo interactúan con las actividades pesqueras, lo que ha facilitado la descripción de su dieta en varios trabajos (e.g. Mead y Potter 1995).

Con base a lo anterior, también se han encontrado diferencias en la composición de la dieta de los ecotipos costero y oceánico. En el Atlántico Noroeste, los delfines costeros capturan especies de peces costeros especialmente de la familia Scianide y una especie costera de cefalópodos (*Loligo sp.*), mientras que los delfines oceánicos capturan especies de calamares y peces pelágicos, especialmente de la familia Myctophidae (Mead y Potter 1995).

### **2.3. Sistemática y Taxonomía del Género *Tursiops***

La sistemática y taxonomía de *Tursiops truncatus*, aún no es clara habiéndose llegado a describir hasta 20 especies del mismo (Mead y Potter 1990). Sin embargo, a la fecha existe gran controversia respecto a la validez de dichas especies, ya que los estudios sistemáticos se han llevado a cabo en áreas geográficas muy restringidas y con tamaños de muestra pequeños (Mead y Potter 1990, Ross y Cockcroft 1990, Rice 1998). De tal suerte, hasta el momento, solo se reconoce una especie del género (Klinowska 1991): *Tursiops truncatus* de distribución cosmopolita, que presenta poblaciones y ecotipos en distintas cuencas, con distintos grados de divergencia genética, que van desde el poblacional (Hoelzel *et al.* 1998, Natoli *et al.* 2004) hasta el específico (Wang *et al.* 1999, LeDuc *et al.* 1999).

### **2.4 *Tursiops* en el Golfo de California**

En relación a lo descrito, la posición geográfica, y características oceanográficas y batimétricas del Golfo de California, determinan la presencia de distintos ambientes marinos en espacio y tiempo. Esto ha dado como resultado la presencia de una alta diversidad biológica en este mar semicerrado, la que incluye a los mamíferos marinos, resaltando entre otras áreas la Bahía de La Paz, en la que la disponibilidad de alimento, favorece la presencia de numerosas especies de cetáceos (Urbán *et al.* 1997).

En esta área, *Tursiops* es el cetáceo más frecuentemente registrado (Flores *et al.* 1996), y como ya se mencionó Walker (1981) propuso la existencia de al menos tres ecotipos de *Tursiops* para el Pacífico Nororiental, los cuales distingue con base en el análisis de las diferencias en su morfología externa y craneal, tamaño en que alcanzan la madurez sexual, carga parasitaria y hábitos alimenticios. El primer ecotipo, denominado forma oceánica del Océano Pacífico templado,

se distribuye en el norte de California. El segundo ecotipo es la forma oceánica del Pacífico Oriental tropical y se localiza desde fuera de la costa oeste de Baja California hasta la región sur del Golfo de California. El tercer ecotipo es la forma costera del sur de California y México y se distribuye a lo largo de la costa del sur de California, Baja California, dentro del Golfo de California y en la costa del continente hasta San Blas, Nayarit, México. De esta forma, Walker (1981) es el primero en documentar la presencia de dos formas de *Tursiops* en el Golfo de California una costera y otra oceánica.

Posteriormente Díaz-Gamboa (2003), llevó a cabo un análisis morfométrico de tursiones fotografiados y describe proporciones características que permiten la identificación de ambos ecotipos en el campo, e indica que en el Golfo de California, la forma costera, en comparación con la forma oceánica, es más grande, de color más claro dorsal y lateralmente, con un rostro más corto y ancho, y aletas pectorales relativamente más cortas. En el mismo estudio Díaz-Gamboa (2003) argumenta con base a una muestra muy reducida que la variación en la composición de isótopos estables de  $^{13}\text{C}$  puede ser útil para distinguir las dos formas de esta especie en el Golfo de California.

En el 2000 Rojo-Arreola *et al.* (2001) adoptan el criterio de segregación de Díaz-Gamboa (2003) e informan que ambas formas en ocasiones pueden encontrarse de manera simpátrica en Bahía de La Paz. Además, señala junto con Salinas-Zacarías (2005), que al igual que en otras localidades (Shane *et al.*, 1986; Wells *et al.*, 1987), en el Golfo de California, ambas formas difieren en su estructura social, encontrándose diferencias básicas en su organización. Por ejemplo, los tursiones de aguas costeras tienden a formar grupos pequeños (13.5 +/- 11.9 animales), mientras los delfines oceánicos forman grupos más grandes y cohesivos (115.7 +/- 83.4). Además, en Bahía



de La Paz Rojo-Arreola (2002), observó que la tasa de reproducción (porcentaje de crías respecto al total de los individuos fotoidentificados) calculada para tursiones identificados como costeros fue mayor que la calculada para aquellos identificados como oceánicos (20.3 vs 7.2, respectivamente), lo que sugiere que existe una mayor proporción de hembras en los grupos de tursiones costeros tal y como se había reportado en otras localidades (Shane *et al.* 1986, Wells *et al.* 1987). Tales diferencias en la estructura social de *Tursiops* podrían relacionarse a diferencias en los patrones de alimentación de hembras y machos y por lo tanto de las presas que consumen. Por ejemplo, los machos de la forma costera al presentar desplazamientos más extensos (Scott *et al.* 1990), podrían enfrentar condiciones ambientales y alimenticias distintas a las de las hembras, pues acceden a una gama más amplia de presas. Comparativamente, las presas que consumen los machos y las hembras de la forma oceánica deben ser muy parecidas pues sus grupos son más cohesivos. El dimorfismo sexual a nivel trófico, sugiere en general que las hembras, crías y juveniles costeros forman grupos numerosos y filopátricos que comparten cierto parentesco, mientras que los machos adultos forman grupos pequeños y móviles. Lo que sería menos evidente en la forma oceánica ya que los machos y las hembras forman grupos más cohesivos (Shane *et al.*, 1986; Connor *et al.* 2001). Al respecto resalta el que la alimentación diferencial de machos y hembras de un mismo grupo de cetáceos ha sido reportada ya para las orcas de Columbia Británica donde los machos de orcas residentes suelen alimentarse en aguas más profundas que las hembras (Baird 2000).

Finalmente en el trabajo más reciente, Segura (2004) intentó reconocer la divergencia genética entre biopsias de tursiones obtenidas en cruceros de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), y a las que segregó como pertenecientes a tursiones costeros u oceánicos acorde a la distancia a la costa y profundidad de colecta; complementó el muestreo con biopsias

donadas por Díaz-Gamboa que incluían dos biopsias de delfines identificados como costeros, y ocho biopsias adicionales de animales de fenotipo incierto que colectó en aguas someras. En total se genotipificó a 100 tursiones provenientes de cinco regiones del Golfo de California, encontrando 32 haplotipos de ADNmt, cuya distribución y frecuencia solo sugiere la diferenciación genotípica de los ecotipos y su baja diversidad nucleotídica (1.13- 1.35 %) sugiere que los linajes mitocondriales de ambos ecotipos divergieron recientemente. A escala regional, los análisis sugieren la existencia de diferenciación entre el Norte y Sur del Golfo Norte y Sinaloa, con flujo genético restringido por distancia. En opinión de Segura (2004), sus análisis no son contundentes principalmente debido a la incertidumbre implícita en el reconocimiento de individuos con morfotipo costero u oceánico en el momento del muestreo, especialmente al considerar que Rojo-Arreola *et al.* (2001) indican que ambos morfotipos llegan a ser simpátricos en distintas áreas del Golfo.

Resumiendo, en el Golfo de California es muy probable que se encuentren al menos dos ecotipos de tursiones acorde a su craneometría modal, los descritos como la forma oceánica del Pacífico Oriental tropical y la forma costera del sur de California y México (Walker 1981), lo que coincide con análisis posteriores respecto a las proporciones corporales y posición trófica (Díaz-Gamboa 2003), tasas de reproducción y estructura de grupos (Rojo-Arreola 2002, Salinas-Zacarías 2005) y aparente divergencia genética (Segura 2004).

En consecuencia, en este trabajo y a diferencia del de Segura (2004) se tuvo el cuidado de muestrear solo a tursiones, identificados previamente como pertenecientes a la forma costera u oceánica por observadores experimentados (Díaz-Gamboa, Rojo-Arreola y Salinas-Zacarías), para después conducir un análisis análogo al Segura (2004), complementando su base de datos, para validar dos marcos hipotéticos alternativos: El primero plantea que, si bien existen diferencias

morfológicas entre las formas costera y oceánica entre tursiones pertenecientes a distintos grupos localizados a lo largo del Golfo de California, éstas no están relacionadas con su divergencia genética. En contraste, el segundo plantea la existencia de ecotipos de tursiones en el Golfo de California, divergentes morfológica y genéticamente, determinando que se presente una estructura subpoblacional entre los ecotipos costero y oceánico descritos (e.g. Díaz-Gamboa 2003) y/o entre distintos grupos de *Tursiops* distribuidos a lo largo del Golfo de California (e.g. Walker 1981).

Previo a este trabajo, distintos investigadores han utilizado marcadores moleculares para analizar la estructura poblacional y relaciones filogenéticas entre grupos de tursiones que son divergentes en morfología o que se encuentran distribuidos en distintas áreas. Ello, con la finalidad de verificar si los ecotipos descritos corresponden a un mismo número de poblaciones o incluso de especies (e.g. Hoelzel *et al.* 1998, Wang *et al.* 1999, Natoli *et al.* 2004).

Al igual que los trabajos descritos, las preguntas planteadas por este estudio pueden ser resueltas analizando la filogenia (relaciones evolutivas) y divergencia genética espacial de marcadores genéticos que presenten tasas de mutación altas, las que proveen poder de resolución al marcador, pues permiten estimar el tiempo que las unidades taxonómicas (e. g. ambos ecotipos) han estado divergiendo, en relación al número de mutaciones que las hacen diferentes (Cruickshank 2002). Por ello, se considera que las secuencias genéticas no codificantes (neutras) suelen ser buenos marcadores en la construcción de filogenia de especies relacionadas pues al encontrarse bajo poca presión selectiva, tienden a divergir al acumular sustituciones rápidamente. Entre estas se encuentran: la región control del ADN mitocondrial, las repeticiones en tandem variables o microsátelites, los intrones de genes nucleares y las regiones espaciadoras internas transcritas de genes ribosomales (Cruickshank 2002).

En el presente trabajo se seleccionó a la Región Control DNA mitocondrial (D-loop) como uno de los marcadores a analizar, principalmente por que numerosos estudios en vertebrados indican que en estas secuencias la divergencia por mutación se acumula más rápidamente que en el ADN nuclear (Brown 1985, Hartl y Clark 1997). Esto ha sido atribuido a la elevada tasa de mutación del ADNmt, debida a la carencia de mecanismos de reparación durante su replicación (Wilson *et al.*, 1985) y debido a su menor población efectiva debida a la estricta herencia materna del genoma mitocondrial (Birky *et al.* 1989). A excepción de la región D-loop (aproximadamente 1- kb), donde se inicia la replicación, prácticamente toda la molécula del ADNmt se transcribe. En general, el D-loop exhibe niveles elevados de variación en comparación con las secuencias codificantes como el gen del citocromo b (Brown *et al.* 1993), debido a que su cambio no se encuentra restringido por restricciones funcionales ni presión de selección. En el medio marino los análisis de marcadores mitocondriales han sido ampliamente utilizados para evaluar la estructura de poblaciones en gran variedad de peces como las anguilas (Awise *et al.* 1986), el pez azul (bluefish Graves *et al.* 1992), pargos (Chow *et al.* 1993), y tiburones (Heist y Gold 1999).

Por otra parte, este marcador se eligió con fines comparativos, puesto que la gran mayoría de los trabajos realizados hasta ahora para definir la estructura poblacional del género *Tursiops* han sido llevados a cabo analizando la divergencia de este marcador (*e.g.* Curry 1997, Hoelzel *et al.* 1991 y 1998, Wang *et al.* 1999, Torres *et al.* 2003, Natoli *et al.* 2004, Segura 2004). Otras ventajas implícitas en el análisis de la variación y divergencia de la región control mitocondrial son: a) que la molécula es relativamente pequeña y fácil de aislar, b) está presente en múltiples copias por célula, por lo que muestras antiguas o mal preservadas siguen siendo útiles y c) como se ha mencionado el

genoma mitocondrial no recombina y evoluciona rápidamente (Hartl y Clark, 1997). Por lo anterior, se amplificó y secuenció parcialmente la región control de ADNmt, de cada individuo.

Finalmente, debido a su herencia no mendeliana, el ADNmt debe considerarse como un solo locus (Awise 1994) y debido su herencia materna, las filogenias y estructuras poblacionales derivadas a partir de su análisis, en ocasiones no coinciden con las obtenidas a partir del análisis de genes nucleares, debido a los sesgos migratorios debidos al genero (Birky *et al.* 1989) o introgresion (Chow y Kishino 1995).

Por lo anterior, y debido a que no se contó con presupuesto para analizar un panel adecuado de secuencias microsatelitales como en otros trabajos (e.g. Hoelzel *et al.* 1998, Natoli *et al.* 2004), en este trabajo se decidió analizar la divergencia de los intrones de los genes nucleares PLP (proteína proteolipídica de mielina) y BGN (biglicano), para discriminar filogenéticamente tursiones del ecotipo costero y oceánico así como de distintos grupos latitudinales, dado el poder de los análisis de estos genes para discriminar filogenéticamente dos especies de elefantes africanos (Roca *et al.* 2001) y especialmente, porque los análisis paralelos de secuencias control del ADNmt y nucleares neutras permiten observar la separación de los componentes maternos y biparentales de la estructura poblacional (Palumbi y Baker 1994), además de que las secuencias intrónicas proveen de filogenias alelicas de alta resolución, comparables a las obtenidas con estudios de ADN mitocondrial (Palumbi y Baker 1994), pues se ha observado que evolucionan a tasas comparables a las de los pseudogenes y sitios sinónimos en secuencias codificantes, donde las fuerzas selectivas son muy bajas o ausentes (Li 1997).

Suposiciones acerca de la naturaleza de los intrones basados en dichas generalizaciones han motivado que se incremente del uso de la variación de secuencias de intrones para análisis

evolutivos con el fin de solucionar preguntas respecto a la estructuración de poblaciones, especiación y tiempos de divergencia en grandes mamíferos (Palumbi y Baker 1994, Friesen 2000, Roca *et al.* 2001, Roca *et al.* 2004).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La sistemática de *Tursiops* encaminada a reconocer poblaciones e incluso especies del género es complicada. En distintas regiones se han documentado diferencias, que se argumenta, segregan al menos dos grupos (costero y oceánico del género). Los criterios para segregar a estos grupos van desde los morfológicos hasta los moleculares, de índole neutral (p. ej. región control mitocondrial) o selectiva (diferencias en los niveles de expresión de hemoglobina). Y, resalta el hecho de que estos criterios se han aplicado en poblaciones distintas y solo un trabajo ha demostrado la consistencia de criterios para una sola población de tursiones: la del Atlántico Noroeste. Como ya se vio, en el Pacífico Mexicano y concretamente en el Golfo de California es aparente la existencia de al menos dos formas. Sin embargo esta diferenciación no ha sido investigada con base a un muestreo extensivo y dirigido específicamente a reconocer la divergencia genética entre las formas costera y oceánica. Lo planteado justifica el esfuerzo por aclarar las dudas acerca de la taxonomía del género y/o respecto a la estructura genética y delimitación (estructura poblacional) sus unidades de manejo.

El esfuerzo desarrollado en este trabajo tiene una justificación práctica fuerte: Los programas para la conservación de especies amenazadas en el mundo (*e.g.*, IUCN [International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources]) buscan identificar y proteger poblaciones, subespecies y especies amenazadas. Estas categorías pueden ser controvertidas desde una

perspectiva evolutiva, pero pueden hacer la diferencia entre la sobrevivencia o extinción o recuperación de especies o grupos, por que la asignación de recursos para su recuperación se prioriza con base en su estatus taxonómico, es decir su diferenciación como taxa independientes (e.g., Ryder 1986, O'Brien y Mayr 1991, Ball y Avise 1992). Comparativamente, el reconocer que lo que antes era una población subespecie, o especie, no es un taxón diferente de otros no amenazados, permite optimizar el uso de recursos para programas de conservación críticos. Por otra parte una vez que se conoce la información genética que caracteriza a un taxon amenazado, o bajo protección especial, como es el caso de estos cetáceos, esta será útil para la identificación de material forense. Por ejemplo, Baker *et al.* (1996) analizaron secuencias de ADNmt en un laboratorio portátil para identificar especies de ballenas y delfines a partir de tejidos colectados en mercados y restaurantes de Corea y Japón. Finalmente, los análisis filogenéticos son útiles para comparar los niveles de diversidad génica entre taxa distintos para medir la contribución de cada especie a la diversidad génica del clado al que pertenece. Por ejemplo Krajewski (1994), concluye que este tipo de resultados deben de tomarse en cuenta, al priorizar que especies deben ser protegidas.

En tal contexto, es necesario continuar recopilando y analizando evidencias sobre estatus taxonómico de las formas costera y oceánica de *Tursiops* en el Golfo de California, para evaluar el impacto que tienen las actividades humanas sobre las agregaciones de *Tursiops* en el área, y en consecuencia implementar medidas de conservación.

Así, las preguntas que se busco clarificar con este estudio fueron: ¿Es el flujo genético entre los fenotipos costero y oceánico de *Tursiops*, lo suficientemente restringido como para considerar a ambas formas poblaciones distintas?, o es nulo e indicativo del aislamiento reproductivo entre ambos ecotipos, y de ser así ¿Es suficiente la divergencia evolutiva entre los ecotipos costero y

oceánico, como para confirmar que son especies distintas? De manera análoga: ¿Es suficiente la divergencia genética entre delfines muestreados a distinta latitud en el Golfo de California como para considerar a los grupos de delfines de extremos geográficos poblaciones distintas?.

Una unidad evolutiva significativa se define como una población (o grupo de poblaciones) que presentan suficiente (aunque no necesariamente absoluto) aislamiento reproductivo con otras unidades poblacionales co-específicas y que representan un componente importante en el legado evolutivo de la especie (Young 2001).

En resumen, probablemente existan al menos dos unidades evolutivas significativas del género *Tursiops* en el Golfo de California (costero y oceánico), que precisan ser confirmadas, para conservarlas y manejarlas de manera sustentable. Esta información es requerida por la autoridad ambiental mexicana para crear, implementar y reforzar las normas oficiales que regulan la protección y captura de delfines en México.



De lo expuesto se desprenden las siguientes hipótesis:

#### **4. HIPÓTESIS**

- 4.1. A lo largo de la costa oriental de Baja California Sur se encuentran grupos de tursiones con fenotipo y proporción de sexos que corresponden a los ecotipos costero y oceánico, descritos para el Golfo de California por Walker (1981) y Díaz - Gamboa (2003).
- 4.2. Así, los delfines del ecotipo costero (p. ej. aquellos registrados en Ensenada de La Paz y Bahía Concepción), presentarán una proporción de sexos sesgada hacia las hembras, pues estas son más filopátricas que los machos, y los delfines oceánicos presentarán una proporción de sexos cercana a 1:1, pues los machos y hembras de este ecotipo tenderán a permanecer en el mismo grupo.
- 4.3. Existen diferencias genóticas importantes entre los grupos de tursiones costero y oceánico, definiendo al menos al menos dos unidades evolutivas significativas en el Golfo de California.
- 4.4. También existen diferencias genóticas importantes entre los grupos de tursiones oceánicos distribuidos latitudinalmente en el Golfo de California, lo que determinaría que en este se encuentren más de dos unidades evolutivas significativas.

Para corroborar las hipótesis planteadas se cubrieron los objetivos siguientes:

## 5. OBJETIVOS

### Principal

Contribuir a precisar la taxonomía del género *Tursiops* en el Golfo de California, al reafirmar que existen al menos dos ecotipos de *Tursiops* en el área de estudio y confirmar que entre estos y posiblemente, entre sus agregaciones latitudinales, existen diferencias genéticas importantes.

El objetivo principal se logrará mediante la consecución de los siguientes objetivos particulares:

- 5.1. Reafirmar que existen al menos dos ecotipos de *Tursiops* en el área de estudio, acorde al registro de los tursiones con fenotipo correspondiente a los ecotipos costero ú oceánico, utilizando los criterios de Díaz-Gamboa (2003), y comprobando con base a análisis genéticos, que en las agrupaciones de cada uno de estos, la proporción de sexos es distinta y sesgada hacia las hembras en los grupos de tursiones costeros.
- 5.2. Evaluar, que tan divergentes son genéticamente los ecotipos de *Tursiops* identificados acorde al criterio de Díaz-Gamboa (2003), y a su distribución latitudinal, con base a análisis de genética poblacional y filogenia de secuencias mitocondriales y nucleares (intrónicas), para confirmar la existencia de distintas unidades evolutivas significativas del género en el Golfo de California.

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Área de Estudio.

El Golfo de California se localiza en el Noroeste de México entre los 18°N y los 35°N de latitud y los 115°W y 116°W. Tiene una longitud de 1400 km. y un ancho de 200 km. aproximadamente. Es uno de los mares mas dinámicos y productivos de México debido a que cuenta con tres mecanismos principales de fertilización: las surgencias inducidas por el viento, mezcla por marea y circulación termohalina (Álvarez-Borrego, 1991). El Golfo de California también se caracteriza por la heterogeneidad de las condiciones oceanográficas propias de cada una de sus diferentes regiones debido a su orientación y su posición longitudinal. Se ha sugerido la subdivisión del Golfo de California en cuatro regiones con base en la estructura vertical de la termohalina (Roden y Emilsson, 1979). Dichas regiones son: Golfo Norte, Región de las Grandes Islas, Golfo Central y Boca del Golfo (Figura 1). El muestreo para obtener muestras de tejido de delfines del género *Tursiops* en esta área se concentró en Bahía de La Paz y Bahía Concepción ya que en dichas localidades se han identificado grupos residentes de delfines costeros. Para coleccionar biopsias de piel de delfines oceánicos se participó en un crucero dentro del Proyecto "Ballenas del Golfo de California", el cual siguió un transecto lineal a lo largo del Golfo.

#### - Bahía de La Paz:

Ubicada en la porción suroeste de la Península de Baja California a 200 Km. de su extremo austral. Su longitud es de 90 km. y su ancho es de 60 km., definiendo un área de aproximadamente 4500 km<sup>2</sup> (Jiménez, *et al.*, 1997). Tiene forma semielíptica con su eje mayor orientado en dirección

normoroeste-sursureste. Está limitada hacia el oeste y sur por tierra firme, hacia el norte y oriente por las aguas del Golfo de California y las Islas Espíritu Santo y Partida. Se comunica libremente con las aguas del Golfo de California a través de una boca principal ubicada entre la Punta Cabeza Mechuda y el extremo norte de Isla Partida. Al sureste también se comunica con el Golfo de California a través de una boca secundaria (Canal de San Lorenzo) ubicada entre el extremo sur de Isla Espíritu Santo y Punta las Pilitas (Álvarez *et al.*, 1997) (Figura 1).

El ciclo anual de la temperatura superficial de mar en la cuenca de La Paz presenta dos estaciones bien definidas con respecto al patrón estacional de vientos. Durante invierno-primavera, los menores niveles de insolación junto con la influencia de los vientos del noroeste, son los causantes del enfriamiento de las aguas superficiales hasta alcanzar sus mínimos anuales (21-24° C) mientras que las temperaturas superficiales del mar más elevadas (27-31° C) se registran durante verano-otoño cuando la insolación es mayor y vientos más débiles del suroeste, acarrear por advección aguas cálidas del trópico hacia el golfo (Bernal, *et al.*, 2001).

#### - Bahía Concepción

Bahía Concepción se localiza en la costa occidental del Golfo de California; entre los 26°33' y 26°53' latitud N y 111°42' y 112°56' longitud O. Mide aproximadamente 45 km. de largo por 10 km. en su parte mas ancha y tiene una extensión de 27,500 ha, con una profundidad máxima de 30 m en el canal central. El sedimento predominante es arenoso y fango-arenoso y la vegetación circundante esta constituida principalmente por manglar (Martínez-López y Garate-Lizarraga, 1994). La temperatura superficial media anual es de 24.9°C, con una media mínima de 17.5°C en Enero y una

media máxima de 32.1°C en Septiembre (Martínez-López y Garate-Lizarraga, 1994; Santamaría *et al.*, 1999).

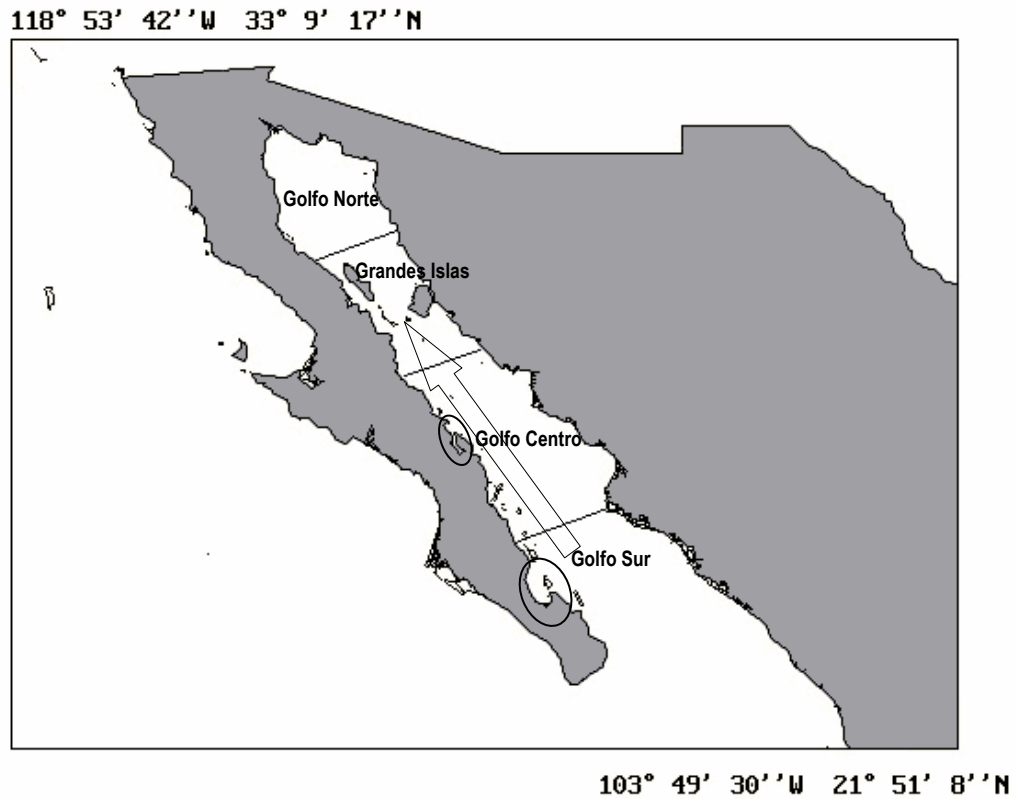


Figura 1. Localización geográfica del área de estudio: La Costa Occidental del Golfo de California, donde se realizaron muestreos intensivos, en las Bahías de La Paz y Concepción y un crucero dentro del Proyecto “Ballenas del Golfo de California” (el vector representa el patrón de travesía) para coleccionar biopsias de piel de delfines del género *Tursiops*. Se indica la subdivisión regional del Golfo de California.

## 6.2. Muestreo Ecológico y de Tejidos.

### -Delfines Costeros: Bahía de La Paz y Bahía Concepción

Debido que en Bahía de La Paz y Bahía Concepción se han identificado grupos residentes de delfines costeros, ambas bahías se seleccionaron para conducir el muestreo de estos, llevándose a cabo observaciones en períodos de 2 a 5 días desde botes tipo panga (7 m de eslora) propulsados con motores fuera de borda. Las observaciones se iniciaron a las siete de la mañana y concluyeron al atardecer, o hasta que el estado de oleaje superaba el nivel 3 de la escala de Beaufort.

Durante las observaciones se anotó la fecha y cada hora, la posición geográfica del bote y de los delfines avistados (determinada con un Posicionador Geográfico Global (GPS) y el estado del mar (escala Beaufort) en bitácoras previamente diseñadas.

Al momento de avistarse delfines del género *Tursiops*, se estimó y anotó el tamaño del grupo, el cual se definió como el conjunto de animales que presentan un comportamiento parecido y entre los que no hay una distancia mayor a los 100 m (Wells, *et al.*, 1987). El bote se acercó a los animales del grupo, siguiéndolos, procurando navegar de manera paralela a los delfines, sin hacer cambios repentinos de velocidad, pretendiendo no afectar la estructura de los grupos de animales. Simultáneamente, se anotaron los datos específicos del avistamiento: señalando si la morfología de los delfines correspondía al ecotipo costero u oceánico (los ecotipos fueron reconocidos con base en las características descritas por Díaz-Gamboa (2003) por observadores que cuentan con 5 años de experiencia), la localización geográfica del avistamiento, el número total de individuos del grupo, su conducta general y dirección de desplazamiento. Simultáneamente, se foto - marcaron a tantos individuos como fue posible con base a la forma y marcas en la aleta dorsal, utilizando cámaras fotográficas Reflex y lentes zoom 100 – 300 y rollos blanco y negro 400 ASA.

Una vez terminada la fotoidentificación de individuos se procedió a obtener biopsias de piel de distintos individuos adultos, con el fin obtener información complementaria de índole genético - poblacional que es prácticamente imposible de obtener por medio de métodos no invasivos. Ejemplos de esta información es el parentesco de los individuos y su relación con la organización social, sistema reproductivo, identificación individual y de género, filopatría y patrones de desplazamiento geográfico a largo plazo, tamaño efectivo poblacional, y estructura de las poblaciones (e.g. Haig, 1998; Hoelzel et al. 1998; Natoli, 2004). Por otra parte, la porción de grasa de las muestras puede ser utilizada para determinar niveles de contaminantes y para pruebas toxicológicas en tejidos celulares, así como para la obtención de información de la ecología trófica y condición nutricional a través de la determinación de isótopos estables, ácidos grasos y contenido lípidico en la grasa (Bearzy, 2001).

Así, para obtener biopsias de piel delfines *Tursiops* se utilizaron dos distintos medios: una ballesta de 30 lb. de empuje y dardos con puntas modificadas (Lambersteen, 1987) o una fisga (hawaiana) de pesca deportiva submarina, con punta modificada. Las puntas referidas, comprenden un cilindro hueco de 1.5 cm. y 0.25 cm. de diámetro. Uno de sus extremos posee una cuerda para atornillarlo a un tope de 2.5 cm. de diámetro del dardo o fisga, mismo que impide que la punta penetre más de 1.5 cm. en la piel del animal. El borde del otro extremo de la punta es afilado y en su interior sostiene tres púas pequeñas que rasgan y retienen un pequeño fragmento de piel del individuo una vez que el dardo lo golpea. Se ha probado este método, cuando es usado con el cuidado y precaución adecuados, no produce alteraciones a largo plazo en la conducta de los delfines, tampoco se han observado complicaciones fisiológicas en el proceso de cicatrización de la herida, que se estima tarda 23 días. (Weller *et al.* 1997, Krutzen *et al.* 2002).

Los dardos se emplearon para muestrear aquellos individuos localizados a un máximo de 12 m del bote mientras que la fisga se empleó para muestrear a aquellos individuos que se acercaban para nadar a los lados de la falca del bote. Las biopsias fueron preservadas en una solución de DMSO al 20% o Etanol al 70% hasta su transporte al laboratorio, donde además fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . (Duffield y Wells 1991, Weller *et al.* 1997).

#### -Delfines Oceánicos: Resto del Golfo de California

Para complementar el muestreo, ampliando el número de muestras de delfines de tipo oceánico, en el verano de 2004 se participó en un crucero de investigación dentro del proyecto Grandes Ballenas del Golfo de California (Responsable: Dr. Jorge Urbán-Ramírez) a bordo del R. V “Amigo”. Se navegó durante 15 días a lo largo del Golfo de California (Figura 1) en los cuales el esfuerzo de búsqueda y obtención de datos fueron sistemáticos, registrándose la información referida en la sección anterior cada media hora. Así, cuando se realizaba un avistamiento de grandes cetáceos o de *Tursiops*, se anotaban los datos específicos de dicho avistamiento y la tripulación abordaba una embarcación mas pequeña (panga) para facilitar el acercamiento a los cetáceos y obtener fotografías de su aleta dorsal y biopsias de la manera que ya se describió.



### 6.3. Análisis Genéticos.

#### 6.3.1. Rutinas de Laboratorio.

##### - Extracción y purificación de ADN

Las muestras de tejido obtenidas fueron digeridas con Proteinasa K (100 µg/ml) en buffer STE (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, ph 8.0) y 0.1% de SDS a 55°C por 12 horas. El ADN total fue purificado con la técnica estándar de extracción con fenol-cloroformo y precipitación con alcohol (Sambrook *et al.*, 2001). La calidad y cantidad de ADN genómico se evaluó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% (Figura 2).

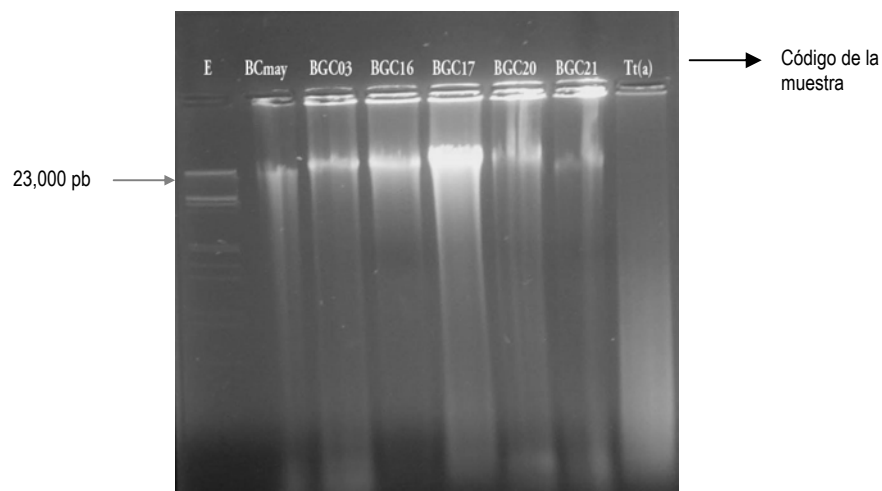


Figura 2. Ejemplo de visualización de algunos de los extractos de ADN de *Tursiops truncatus* en un gel de agarosa, en la primer columna el marcador de peso molecular.

### - Determinación de sexo

Reconocer a simple vista el sexo de delfines salvajes es prácticamente imposible, por lo que actualmente se utilizan técnicas moleculares, que implican la amplificación de secuencias específicas de los cromosomas sexuales, facilitando la asignación de sexo a los animales a partir de biopsias piel (Mann, 2000).

Así, el sexo de los animales muestreados en cada grupo de tursiones se determinó usando PCR y primers diseñados para amplificar las secuencias de dos genes (ZFY, el gen de una proteína zinc finger y SRY, la región que determina el sexo en el cromosoma Y) encontrados en los cromosomas Y y X y que están altamente conservadas en muchas especies de mamíferos; para la región del gen ZFY se utilizaron los primers ZFX0582F y ZFX0923R y para la región del gen SRY se utilizaron los primers TtSRYR, y PMSRY (Rosel, 2003), los cuales amplifican productos de 382 y 339 pares de bases (pb) respectivamente. Por lo tanto en un análisis electroforético en gel de agarosa se visualiza una banda de tratarse de una hembra y dos cuando el individuo resulta ser un macho (Berubé y Palsbøll, 1996) (Fig.3).

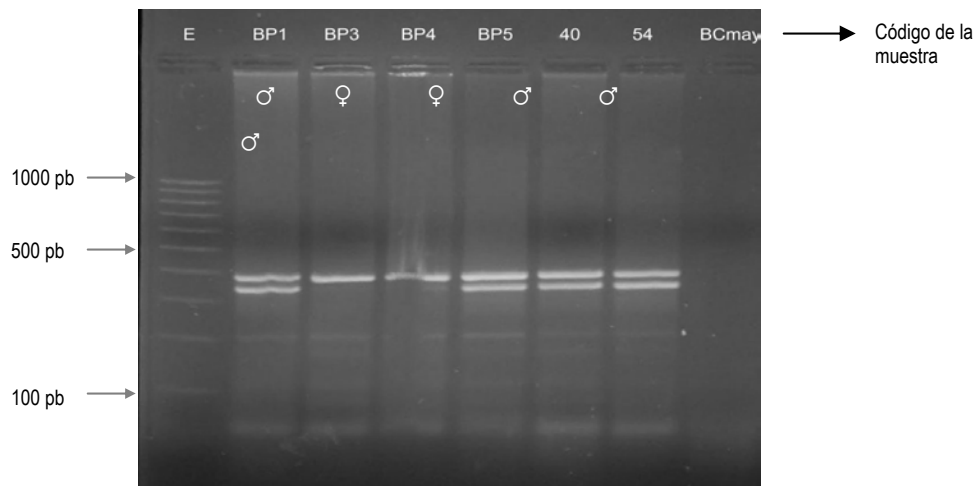


Figura 3. Ejemplo de visualización en un gel de agarosa de los productos de PCR para determinar el sexo de algunos delfines *Tursiops truncatus*..

## - Rutinas de amplificación de marcadores moleculares

### *Región Control del ADNmt*

Se amplificó y secuenció parcialmente la región control de ADNmt, de cada individuo utilizando los extractos de ADN total obtenidos de cada biopsia y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se amplificaron aproximadamente 531 pares de bases (pb) de la primera mitad de la región control del genoma mitocondrial para 58 individuos, utilizando los primers L15926 (5'-ACA CCA GTC TTG TAA ACC -3') y H16498 (5'-CCT GAA GTA AGA ACC AGA TG- 3') (Eggert 1998). Para ello se realizaron PCRs de 25  $\mu$ L con las siguientes condiciones de PCR: 16.3 $\mu$ L de mQH<sub>2</sub>O, Buffer (Tris 10mM, KCl 50mM y 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>), dNTPs (0.4 mM), primers (0.25mM) cada uno, 1 U de Taq y 1  $\mu$ L de extracto ADN geonómico. Con el siguiente perfil de termociclado: 3 min. a 95°C, 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 50°C y 2 min. a 72°C, seguidos por 7 min. a 72 °C.

La amplificación exitosa de la región control se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los productos de PCR se purificaron mediante columnas QIAquick (de acuerdo a las instrucciones del fabricante).

Los productos se secuenciaron automáticamente en ambas direcciones (F y R) en una secuenciación en ciclo usando las condiciones del método BigDye™ y detectados en un secuenciador Automatic Sequencer 3730xl (Macrogene, Seúl, Corea) y su naturaleza se verificó con base a un análisis de homología, utilizando el software BLAST (Altschul *et al.* 1990), residente en el National Center for Biotechnology Information, mismo que permite comparar la secuencia obtenida con todas aquellas secuencias residentes en Genbank.

### *Secuencias Intrónicas*

Se analizaron paralelamente, los intrones del gen PLP (proteína proteolipídica de mielina) y BGN (biglicano) con el fin de conocer la estructura de los grupos de delfines costeros y oceánicos presentes en nuestra área de estudio, llevando a cabo así una comparación de su diversidad genética.

Con base a la PCR, se amplificaron y analizaron 900 pares de bases (pb) del intron del gen PLP en 25 tursiones machos, estas amplificaciones seleccionadas se realizaron con el único fin de evitar amplificar dos copias del mismo intron en los heterocigotos de el cromosoma X de las hembras. Buscando de esta forma, obtener correspondencia en el análisis de secuencias haplotípicas (ADNmt y secuencia intrónica PLP asociada al cromosoma sexual X en machos). Para ello, se utilizaron los primers PLP-F (5'-GGCCACTGGATTGTGTTTCT-3') y PLP-R (5'-TAGTCGCCAAAGATCTGCCT-3') (Murphy *et al.* 1999) en reacciones de PCR de 25  $\mu$ L, bajo las siguientes condiciones de PCR: 17 $\mu$ L de mQH<sub>2</sub>O, Buffer (Tris 10mM, KCl 50mM y 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>), dNTPs (0.8 mM), primers (0.2 mM) cada uno, 2 U de Taq y 1  $\mu$ L de ADN geonómico. Con el siguiente perfil de termociclado: 9.75 min a 95°C, después 40 ciclos de 15 s a 95°C para la desnaturalización, 30 s de alineamiento a 60°C (ciclos 1 y 2) 58°C (ciclos 3 al 8), 56°C (ciclos 9 al 14), 54°C (ciclos 15 al 20), o 52°C (ciclos 21 al 40), y 1 min 25 segundos de extensión a 72°C, con una extensión final a 72°C por 5 min.

La amplificación exitosa de la región intrónica se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los productos de PCR se purificaron mediante columnas QIAquick (de acuerdo a las instrucciones del fabricante).

Los productos se secuenciaron automáticamente en ambas direcciones (F y R) en una secuenciación en ciclo usando las condiciones del método BigDye™ y detectados en un secuenciador Automatic Sequencer 3730xl (Macrogen, Seúl, Corea) y su naturaleza se verificó con base a un análisis de homología, utilizando el software BLAST (Altschul et al. 1990), residente en el National Center for Biotechnology Information, mismo que permite comparar la secuencia obtenida con todas aquellas secuencias residentes en Genbank.

#### - Alineamiento de secuencias

Las secuencias nucleotídicas F y R obtenidas de la secuenciación automática se alinearon en contiguos, usando el software Chromas Pro 1.22 (Technelysium Pty Ltd), verificando la complementariedad de las hebras sencillas y obteniendo la secuencia consenso del haplotipo de cada muestra. Se excluyeron las secuencias de los primers (extremos), y se después se alinearon todas las secuencias consenso usando del programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1994).

#### 6.3.2. Caracterización genética: Estimación de parámetros genéticos.

##### - Diferente proporción de sexos en grupos de tursiones costeros y oceánicos.

Para demostrar que los tursiones costeros presentan una proporción de sexos sesgada hacia las hembras, mientras que los oceánicos presentan una proporción de sexos cercana a 1:1, se utilizaron los datos derivados de la determinación molecular de género de cada uno de los delfines muestreados en grupos de delfines costeros y oceánicos, asumiendo que la probabilidad de muestrear hembras y machos será la misma (0.5) en un grupo de delfines con una proporción de

sexos 1:1. Así la desviación estadísticamente significativa de esta probabilidad indicaría la predominancia de animales de determinado género en los grupos de delfines costeros y oceánicos. Así, se efectuaron pruebas de contingencia de  $X^2$  para determinar la desviación entre la proporción de sexos esperada (1:1) y la observada molecularmente.

### **- Diversidad Genética**

La subdivisión entre poblaciones es frecuentemente resultado de eventos de fundador, que implican una reducción en la diversidad genética de la fracción de la población que funda una nueva subpoblación. En consecuencia, para evaluar la existencia de eventos de fundador, se estimó la diversidad genética. Así, la cantidad y naturaleza del polimorfismo de las secuencias fue determinado por medio de la estimación de la diversidad haplotípica y nucleotídica (Nei, 1987).

-Diversidad Haplotípica. Se define como la probabilidad de que al elegir dos haplotipos al azar de una muestra o población, éstos sean diferentes. Es una medida equivalente a la heterocigocidad esperada para datos diploides. El índice de diversidad haplotípica ( $h$ ) así como su varianza se estimaron según el modelo Tamura-Nei (Tamura-Nei, 1993) usando el software ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 1999).

-Diversidad Nucleotídica ( $\pi$ ). Se define como la probabilidad de que al elegir dos nucleótidos homólogos al azar de una secuencia, éstos sean diferentes. La estimación de éste índice y su varianza se realizó bajo el modelo de Tamura-Nei (Tamura-Nei, 1993) usando el software ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 1999).

## - Estructura Genética

Con el fin de detectar si existe algún patrón de subdivisión poblacional entre los ecotipos o entre grupos filopátricos de delfines oceánicos encontrados a lo largo del Golfo se calcularon los índices de fijación  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  para conducir su análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) para medir el grado de diferenciación genética entre los ecotipos, usando el software ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 1999).

### - Diferencias genéticas entre las formas costera y oceánica de *Tursiops* o entre sus grupos filopátricos latitudinales en el Golfo de California.

Adicionalmente, se obtuvieron secuencias de la región control del ADN mitocondrial de otras 78 muestras de delfines oceánicos del Golfo (Segura, 2004). Dichas secuencias se utilizaron para completar un análisis de la estructura genética de los grupos de delfines oceánicos encontrados en cuatro regiones del golfo: Golfo Norte, Grandes Islas, Golfo Central y Golfo Sur, según la subdivisión oceanográfica del Golfo descrita por Roden (1964). Además se incluyó un grupo de secuencias homologas de 11 delfines de la Bahía de Topolobampo, Sinaloa (Islas 2005).

### El Índice de Fijación

$F_{ST}$ . Compara el nivel de variación genética entre dos o más sub-poblaciones en relación a todas las sub-poblaciones combinadas (es decir, la población total). Si el apareamiento en la población total es completamente al azar, entonces las subpoblaciones y la población total tendrán el mismo valor de variación genética, por lo que  $F_{ST}$  será igual a cero. Sin embargo, si el apareamiento entre las

subpoblaciones no es al azar (es decir, que al menos están parcialmente aisladas reproductivamente), la variación genética en cada población será menor que la variación genética de la población total, y  $F_{ST}$  incrementará a un valor máximo de 1, es decir habrá una completa diferenciación entre las subpoblaciones (Page y Holmes, 2000). En este caso el índice considera únicamente la frecuencia de los haplotipos.

#### Análisis de Varianza Molecular (AMOVA $\Phi_{ST}$ ).

$\Phi_{ST}$  Produce componentes de varianza análogos a la  $F_{ST}$ .  $\Phi_{ST}$  incorpora información el grado de diferenciación molecular entre las secuencias, así como la frecuencia de los haplotipos en cada población (Excoffier *et al.* 1992). El análisis de AMOVA fue llevado a cabo usando el modelo de distancia genética de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) con una corrección gamma de  $\delta=0.47$ , según lo estimado para el segmento hipervariable 5' de la región control mitocondrial en humanos (Wakeley, 1993).

La significancia de los valores de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  estimados fue probada permutando los haplotipos entre las poblaciones 1000 veces usando los procedimientos de permutación no paramétricos establecidos por el software ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 1999).

Asumiendo un modelo de isla (Wright, 1969) el número promedio de inmigrantes por generación,  $Nm$  está dado por  $Nm=(1/2)(1/F_{ST} - 1)$ , donde  $N$  es el número efectivo de hembras y  $m$  es la fracción de la población reemplazada por cada generación de inmigrantes (Slatkin, 1989). Para evaluar el grado de aislamiento entre poblaciones se calculó el flujo genético (número de inmigrantes por generación) entre las localidades ( $Nm$ ) el cual fue estimado a partir de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  y



usando el método de alelos privados descrito por Slatkin (1995), con el software ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 1999).

### Red Median-joining

Además, como un método alternativo para inferir las relaciones de estructura poblacional entre los haplotipos de las muestras analizadas se generó una red Median-Joining en donde se incluyó a los delfines costeros y oceánicos, y otra en donde se analizó a los grupos de delfines oceánicos encontrados a lo largo del Golfo, usando el programa Network 2.0 (Bandelt *et al.*, 1999; <http://www.fluxus-engineering.com>).

## **- Reconstrucción Filogenética**

### Dendograma Neighbor-Joining

Los haplotipos encontrados fueron comparados filogenéticamente usando el método Neighbor-Joining (N-J). Una ventaja de este método sobre otros análisis es que no supone que los linajes involucrados evolucionan a la misma tasa. Este método identifica los pares de unidades taxonómicas, en este caso los haplotipos mitocondriales más cercanamente emparentados con base en una matriz de distancia, de manera que se reduzca la longitud total del árbol (Swofford *et al.*, 1996). Las distancias entre los pares de haplotipos se calcularon como la proporción de diferencias con relación a la longitud de las secuencias, p-distance, con base en el método de Tamura-Nei. La reconstrucción de la filogenia se realizó con el programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2000), incluyendo una secuencia homóloga de un delfín común (*Delphinus capensis*) como grupo externo. Se realizó la técnica de remuestreo (Bootstrap) no paramétrico para calcular la confianza de la reconstrucción N-

J. El valor de bootstrap se muestra a lo largo de las ramas internas como el porcentaje de ocasiones que la topología del árbol es encontrada en la reconstrucción filogenética de las réplicas (Kumar *et al.*, 2000). La interpretación correcta de las proporciones de bootstrap es aun incierta. Tentativamente, se considera en este trabajo valores de bootstrap  $\geq 90$  como altamente significativas,  $\geq 70 \leq 90$  como marginalmente significativas y los valores de bootstrap  $\leq 70$  constituirían limitada evidencia de monofilia (Shafer *et al.* 1997).

De la misma manera, las distancias entre los pares de haplotipos de intrones de PLP se calcularon como la proporción de diferencias con relación a la longitud de las secuencias, p-distance, con base en el método de Kimura-2 parámetros (Roca, *et al.*, 2001). La reconstrucción de la filogenia se realizó con el programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2000), incluyendo la única secuencia homóloga de un cetáceo disponible en Genbank, la ballena franca austral (*Eubalaena glacialis*), como grupo externo. Se realizó un remuestreo (Bootstrap) no paramétrico para calcular la confianza de la reconstrucción N-J.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Esfuerzo de Muestreo

En la Bahía de La Paz, el trabajo de campo comenzó a llevarse a cabo a partir de Abril de 2003 y concluyeron en Febrero de 2004, se realizaron un total de 27 salidas de campo con frecuencia quincenal, en las cuales se desarrollaron aproximadamente 148 horas de esfuerzo de búsqueda y avistamientos, durante las cuales se navegó aproximadamente 683 millas náuticas (1269.9 km.).

Durante los meses de Marzo a Junio de 2004 se realizaron cuatro salidas de campo en el área de Bahía Concepción los muestreos fueron de frecuencia mensual con duración de 3 días cada una. En dicha área se desarrollaron 40 horas de esfuerzo en las cuales se navegaron 180 millas náuticas (333 km).

#### - Avistamientos

En la Bahía de La Paz, se realizaron un total de 21 avistamientos de *T. truncatus* de los cuales 3 pertenecieron a individuos de la forma oceánica y en cuyas observaciones se obtuvo un tamaño de grupo promedio de 78 ( $\pm 34.5$ ) individuos que estaban compuestos en un 18.9% por hembras con cría.

Los restantes 18 avistamientos pertenecieron a delfines de la forma costera los cuales presentaron un tamaño de grupo promedio de 22 ( $\pm 15.8$ ) delfines por avistamiento y estaban compuestos en un 28.9% de hembras con cría.

Se encontraron y foto identificaron dos de los tres grupos de tursiones costeros reportados para la Bahía de La Paz, que se distribuyen principalmente cerca de la Ensenada de La Paz y Los Islotes (Figura 4).

En Bahía Concepción se realizaron un total de 7 avistamientos de tursiones, todos pertenecen a la forma costera y presentaron un tamaño de grupo promedio de 22 ( $\pm 18.1$ ) animales por avistamiento.

## **7.2. Distribución geográfica de la muestra**

### **- Bahía de La Paz**

Durante las salidas de campo en la Bahía de La Paz se obtuvieron cuatro biopsias, tres de las cuales pertenecen a delfines de la forma costera y una de la forma oceánica. Además el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) proporcionó 23 biopsias más, de las cuáles 6 pertenecen a tursiones de la forma costera y 17 a tursiones de la forma oceánica (Anexo 2).

También, se obtuvieron 2 biopsias más del ecotipo costero, pertenecientes a animales varados en la Ensenada de La Paz.

El laboratorio de Mamíferos Marinos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur proporcionó 5 biopsias más pertenecientes delfines del ecotipo oceánico muestreados en la Bahía de La Paz.

#### - Bahía Concepción

En Bahía Concepción se obtuvieron 3 biopsias pertenecientes al ecotipo costero. Y una más de un delfín varado que se presume pertenece al ecotipo costero (Anexo 2).

#### - Resto del Golfo de California

Durante el crucero Ballenas del Golfo de California (BGC) se lograron obtener 3 biopsias de delfines costeros y 37 del ecotipo oceánico. En la figura 4 y el Anexo 2, se muestra la localidad a que pertenecen las biopsias.

En total se reunieron 78 muestras de tejido de delfines pertenecientes a diferentes agrupaciones encontradas a lo largo del Golfo de California, 15 muestras pertenecen a tursiones costeros y 63 de origen oceánico. Además se incluyó en el análisis 4 muestras de piel pertenecientes a delfines del Pacífico (Bahía Magdalena). La mayoría son biopsias de piel y 4 pertenecen a organismos varados. En este análisis se incluyeron 71 muestras debido a que no todas contenían ADN de buena calidad.

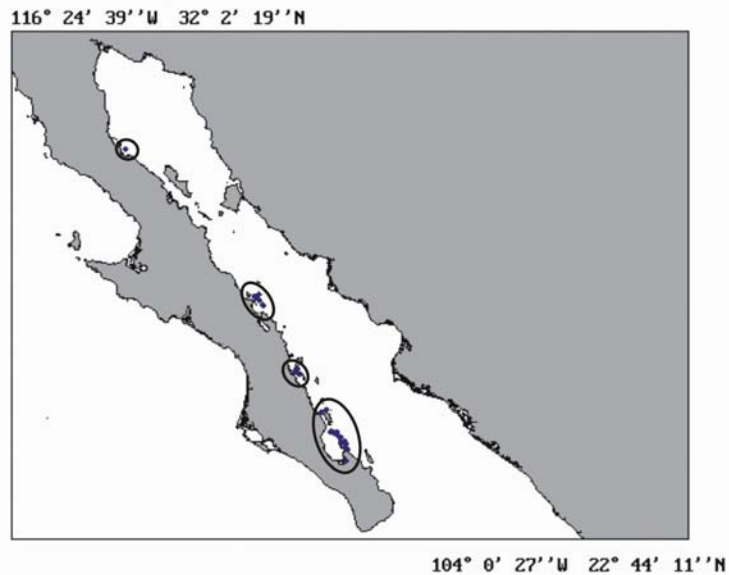


Figura 4. Los puntos indican las posiciones geográficas en donde han sido tomadas las biopsias.

### 7.3. Análisis del sesgo de la proporción de sexos.

Se logró determinar el sexo de 71 delfines, 10 del ecotipo costero y el resto del ecotipo oceánico. La proporción general de sexos es muy cercana a 1:1 con 34 machos y 37 hembras.

En cuanto a los delfines oceánicos, la proporción de sexos resultó ser de 1.08 hembras:1 macho con 26 hembras y 24 machos lo cual no resultó ser estadísticamente diferente a la proporción esperada, 1:1 ( $\chi^2$  (1 g.l.)=0.08,  $p>0.05$ ,  $n=50$ ). Para los delfines costeros la proporción de sexos tampoco fue significativamente diferente a 1:1 ( $\chi^2$  (1 g. l.)=0.4,  $p>0.05$ ,  $n=10$ ), como se muestra en la Tabla I, Anexo 2.

Tabla I. Proporción de sexos de las muestras analizadas

	<b>costeros</b>	<b>oceánicos</b>	<b>Total</b>
<b>Hembras</b>	0.6 (n=6)	0.52 (n=26)	0.47 (n=37)
<b>Machos</b>	0.4 (n=4)	0.48 (n=24)	0.52 (n=34)

## 7.4 Caracterización genética

### 7.4.1 Diversidad Genética

#### - ADN mitocondrial

Solo de 58 muestras se logro obtener resultados óptimos para el análisis molecular de ADNmt. Los análisis de la secuencia de 464 pb pertenecientes a la primera mitad de la región control del ADN mitocondrial revelaron 34 sitios variables los cuales definen a 27 haplotipos entre los 58 organismos del Golfo de California analizados; de las mutaciones observadas se identificaron 29 transiciones, tres trasversiones y tres inserciones (Tabla II).

Tabla II. Sitios variables entre los 27 haplotipos de ADNmt encontrados en las muestras de tejido de *Tursiops* colectadas el Golfo de California.

Sitios Polimorficos				
111111 1122222333 3333333334 44444				
245333444 4804558000 1122334690 12333				
558579126 9894354348 4812232869 29012				
Haplotipo				
TT12	A-GTTT--A	CCTCTACCCC	GTCCTTATCC	TATCT
TT13	.-.....--.	.....T..	.....	.....
TT11	.-.....--.	.....T.T	.....	.....
TT16	.-.....--.	T.....T..	A.....	.....
TT15	.-.....--.	T.....T..	A....C....	.....
TT14	.-.....--.	T.....T..	A...C.....	.....
TTVAR	.-.....TA.	T.....T..	A.....C..	.....
TT17	.-.....--.	T.....T..	A.....C..	.....
TT09	.-..C.--.	T...C..TTT	A...C..C..	C....
TT10	.-..C.--.	T.....TT.	A...C..CT.	C....
TT19	.-..CC--.	T.....TT.	A...CC.C..	.....
TT20	.A..C.--.	T.A...TT.	A...CC.C.T	.....
TT21	.-..C.--.	T.....TT.	A..TCCGC.T	.....
TT27	.-..CC--.	T.....TT.	A..TCCGC.T	.....
TT23	.-..C.--.	T.....TT.	A.TTCCGC.T	.....
TT24	.-ACC.--G	TT.....TA.	ACTT.CG.C.T	.....
TT22	.-..C.--.	T.....TT.	A..TC.GC.T	.....
TT01	.-..C.--.	T..T.GTTT.	A.TTC..C..	.GCTC
TT07	.-..C.--.	T..T...TT.	A.T..C..C..	.GC..
TT02	.-..C.--.	T..T...TTT.	A.T..C..C..	.GC..
TT04	.-..C.--.	T..T...TT.	A.T..C..C..	.GC..
TT06	.-..C.--.	T..T...TT.	A.T...C..	.GC..
TT03	.-..CC--.	T..T...TT.	A.T...C.T	.GC..
TT05	.-..CC--.	T..T...TT.	A.T...C..	.GC..
TT26	C-..C.--.	T..T...TT.	A.T...C..	.GC..
TT08	.-..C.--.	T..T...TT.	A.T...C..	.C..
TT18	.-..C.--.	T.....T..	A.....C.T	.....
TT25	.-.....--.	T.....T..	A.T.....	.C..

Trece secuencias pertenecen a delfines del ecotipo costero, cuarenta y tres al ecotipo oceánico. Además se analizaron dos secuencias más pertenecientes a tursiones de Bahía Magdalena que se incluyeron como grupo comparativo, una de ellas presentó un haplotipo único y otra compartió el haplotipo con un delfín oceánico.

Los haplotipos compartidos entre ecotipos y la frecuencia relativa de cada haplotipo en cada ecotipo (TT06 y TT15) se muestran en la tabla III; dos de los 27 haplotipos se comparten entre



delfines costeros y oceánicos. Los grupos de delfines costeros se caracterizaron por la alta presencia de haplotipos únicos, es decir, se encontraron sólo en una muestra.

Tabla III. Frecuencia y distribución de haplotipos por ecotipo

Haplotipo	No. Individuos costeros	Frecuencia Relativa costero	No. Individuos Oceánicos	Frecuencia Relativa Oceánicos
TT01			1	0.02
TT02			1	0.02
TT03			2	0.04
TT04			3	0.06
TT05			4	0.09
TT06	5	0.41	4	0.09
TT07			3	0.06
TT08	3	0.25		
TT09	1	0.08		
TT10			1	0.02
TT11			1	0.02
TT12	1	0.08		
TT13			1	0.02
TT14				
TT15	1	0.08	3	0.06
TT16			3	0.06
TT17			6	0.13
TT18			2	0.04
TT19			3	0.06
TT20			1	0.2
TT21			2	0.06
TT22	1 + 1?	0.08, 0.16?		
TT23			1	0.02
TT24			1	0.02
TT25			1	0.02
TT26			1	0.02
TOTAL	12, 13?		43	

Se encontraron diferencias en la diversidad haplotípica entre ecotipos. Los valores de diversidad genética por ecotipo y sus respectivas desviaciones estándar se muestran en la tabla IV.

En general las diversidades haplotípicas y nucleotídicas resultaron ser relativamente altas tanto para el ecotipo costero (0.8 y 0.011, diversidad haplotípica y nucleotídica respectivamente) como para el oceánico (0.9 y 0.014). Este bajo nivel de diversidad nucleotídica entre las formas sugiere la divergencia reciente de los linajes mitocondriales en ambos ecotipos.

Tabla IV. Diversidad genética del ADNmt de cada uno de los ecotipos y total.

Ecotipo	N	No. de Haplotipos	No. de sitios polimorfos (excluyendo gaps)	Diversidad haplotípica	Diversidad Nucleotídica	Promedio de Diferencias pareadas
Costero	12	6	18	0.8030 +/- 0.0959	0.011444 +/- 0.006696	5.275602 +/- 2.741588
Oceánico	43	22	30	0.9568 +/- 0.0139	0.014222 +/- 0.007610	6.570459 +/- 3.165997
General	58	26	32	0.9498 +/- 0.0136	0.013758 +/- 0.007338	

#### - Secuencias Intrónicas

En el análisis de la secuencia de 658 pb pertenecientes al intrón de la proteína proteolipídica se encontraron 13 sitios variables los cuales definen a 5 haplotipos entre 25 organismos machos analizados (Tabla V).

Tabla V. Sitios variables entre los 5 haplotipos encontrados en las secuencias intrónicas PLP de *T. truncatus* machos en el Golfo de California.

Sitios polimórficos	
	15555 566666
	2457926678 801234
Haplotipo	2824595862 722086
A	-----GG--G GAGG-A
B	-----A.--. ....-
C	-----.A--. ....-
D	-A---..--. ..A.-.
E	---A-..ATT TT.ACT

Cuatro secuencias pertenecen a delfines del ecotipo costero, diecisiete al ecotipo oceánico. Además se analizaron dos secuencias más pertenecientes a tursiones de Bahía Magdalena y tres secuencias de delfines del Alto Golfo que se tomaron como costeros en función de la localidad geográfica en donde fueron tomadas (Segura, 2004). Todos excepto un haplotipo (B), se comparten entre los dos ecotipos. asimismo solo obtuvimos un haplotipo único perteneciente a un individuo costero de la Bahía de San Luís Gonzaga (Noroeste del Golfo de California) (Tabla VI).

Tabla VI. Frecuencia y distribución de haplotipos del intrón PLP por ecotipo.

Haplotipo	No. Individuos costeros	Frecuencia Relativa costero	No. Individuos Oceánicos	Frecuencia Relativa Oceánicos
A	4	0.57	10	0.58
B			5	0.29
C	1	0.14	1	0.05
D	1	0.14	1	0.05
E	1	0.14		
TOTAL	7		17	

La diversidad genética total que muestran las secuencias intrónicas tiene un valor de 0.6246 +/- 0.0866 el cual es menor que la encontrada en el ADNmt (0.9498 +/- 0.0136). Se observó la misma tendencia en el cálculo de la diversidad genética por ecotipos, en donde las diversidades haplotípicas y nucleotídicas resultaron ser relativamente bajas. El sesgo observado muy probablemente corresponde a que solamente se analizaron tursiones machos con este marcador, presentándose entonces un efecto por tamaño de muestra (Tabla VII).

Tabla VII. Diversidad genética del intrón PLP en cada uno de los ecotipos y total.

Ecotipo	N	No. de Haplotipos	No. de sitios polimorfos (excluyendo gaps)	Diversidad haplotípica	Diversidad Nucleotídica	Promedio de Diferencias pareadas
Costero	7	4	12	0.7143 +/- 0.1809	0.003134 +/- 0.002279	2.028142 +/- 1.290555
Oceánico	16	4	4	0.6167 +/- 0.0963	0.001104 +/- 0.000975	0.679028 +/- 0.544286
General	25	5	13	0.6246 +/- 0.0866	0.002297 +/- 0.001592	

#### 7.4.2. Estructura Genética y Divergencia entre Poblaciones

##### - ADN mitocondrial

##### Entre los ecotipos costero y oceánico

Los resultados de subdivisión poblacional, obtenidos del análisis de los haplotipos y sus frecuencias, de delfines oceánicos y costeros, mostraron diferencias significativas entre estos ecotipos ( $F_{st}=0.10128$ ,  $p<0.002$ ); con una porción de  $N_m= 4.43$  hembras migrantes por generación. De manera consistente, el análisis de varianza de la diversidad molecular entre haplotipos de tursiones costeros y oceánicos mostró un valor marginalmente significativo, sugiriendo un aislamiento incipiente entre estos ecotipos ( $\Phi_{ST}= 0.07616$ ,  $p<0.05474$ ) (Tabla VIII y IX). Además, el análisis de AMOVA reveló que el 7.62% de la variación genética se encuentra entre los ecotipos y el 92.88% dentro de ellos (Tabla IX).

Tabla VIII. Análisis de Varianza genética ( $F_{st}$ ) entre ecotipos.

Fuente de Variación	g.l.	componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre Poblaciones	1	0.05147	10.13
Dentro de las Poblaciones	51	0.45673	89.87
Total	52	0.50819	

**Índice de Fijación  $F_{st}=0.10128$ ,  $p<0.00293$**

Tabla IX. Análisis de Varianza molecular ( $\Phi_{st}$ ) entre ecotipos.

Fuente de Variación	g.l.	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre Poblaciones	1	0.25066	7.62
Dentro de las Poblaciones	51	3.04034	92.38
Total	52	3.29099	

**Índice de Fijación  $\Phi_{st}=0.07616$ ,  $p<0.05474$**

*Entre Poblaciones del ecotipo oceánico*

El patrón de distribución y la frecuencia de los haplotipos en las poblaciones putativas de tursiones oceánicos a lo largo del Golfo de California (Golfo Norte -GN-, Grandes Islas -GI-, Golfo Centro -GC-, Golfo Sur -GS- y Sinaloa -SIN-) corroboran la existencia de una ligera subdivisión

poblacional ya que dichos análisis generaron valores significativos totales de  $F_{ST} = 0.06602$ ,  $p < 0.0001$ ;  $\Phi_{ST} = 0.12571$ ,  $p < 0.0001$  (Tabla X).

Los índices de fijación pareados indican cuáles grupos de delfines presentan mayor divergencia, dichos valores se muestran en la tabla X. Por ejemplo, los valores resultantes del grupo de Sinaloa (SIN) sugieren un grado significativo de diferenciación genética de esta población respecto a las demás. El grupo más diferenciado fue GN que resultó significativamente diferente de todos los grupos en ambos índices, excepto con GC en  $\Phi_{ST}$ .

Tabla X. Comparaciones pareadas, de valores  $F_{ST}$  (diagonal inferior) y  $\Phi_{ST}$  (diagonal superior) calculados para grupos de tursiones oceánicos muestreados en distintas áreas del Golfo. En negrita los valores que resultaron significativos.

	GN	GI	GC	GS	SIN
GN	0	<b>0.17183</b>	0.02614	<b>0.10987</b>	<b>0.47961</b>
GI	<b>0.09797</b>	0	<b>0.10524</b>	<b>0.14924</b>	<b>0.35629</b>
GC	<b>0.07202</b>	<b>0.06122</b>	0	0.01877	<b>0.30247</b>
GS	<b>0.09419</b>	0.03990	0.00487	0	<b>0.17576</b>
SIN	<b>0.18322</b>	<b>0.15206</b>	<b>0.07942</b>	<b>0.09335</b>	0

Los valores pareados de  $Nm$  variaron de acuerdo al método con que fueron calculados (Tabla XI). Después de todo, los valores de  $Nm$  calculados a partir de  $F_{ST}$  o  $\Phi_{ST}$  parecen tener el mismo orden de magnitud. Además, en algunos casos existe consistencia con los resultados planteados anteriormente. Por ejemplo, las localidades cercanas geográficamente, GC y GS tienen valores de  $Nm$  mas altos, lo que indica que hay una mayor tasa de migración entre ellas.

Tabla XI. Comparaciones pareadas de los valores de  $N_m$  entre regiones calculados con base en los valores de  $F_{ST}$  (diagonal inferior) y  $\Phi_{ST}$  (diagonal superior) calculados para grupos de tursiones oceánicos. Los valores con índices de fijación significativos se marcan en negritas.

	GN	GI	GC	GS	SIN
GN	0	<b>2.40989</b>	18.62487	<b>4.05063</b>	<b>0.54252</b>
GI	<b>4.60361</b>	0	<b>4.25102</b>	<b>2.85039</b>	<b>0.90334</b>
GC	<b>6.44221</b>	<b>7.66709</b>	0	26.13875	<b>1.15305</b>
GS	<b>4.80844</b>	12.03166	102.16051	0	<b>2.34484</b>
SIN	<b>2.22897</b>	<b>2.78814</b>	<b>5.79563</b>	<b>4.85610</b>	0

- *Secuencias Intrónicas*

Entre ecotipos

Para las secuencias intrónicas PLP de tursiones machos, los análisis de AMOVA sugieren que no existe estructura génica alguna entre ambos ecotipos. Con base tanto en las frecuencias haplotípicas como en la distancia molecular ( $F_{ST}=-0.00426$ ,  $p < 0.40860$ ;  $\Phi_{ST}=0.08651$ ,  $p < 0.0811$ ). En consecuencia el valor de la proporción de tursiones machos migrantes por generación  $N_m$  resultó ser infinito. Quizá el limitado número de muestras analizadas para este marcador nos impida llegar a conclusiones acertadas, sin embargo la distribución de sus frecuencias sería consistente con la capacidad de movimiento de machos entre grupos de delfines costeros y oceánicos y su reproducción exitosa, manteniendo en estadio incipiente la divergencia entre ambos ecotipos.

### Entre poblaciones

Actualmente, no se cuenta con secuencias intrónicas de muestras de delfines tomadas en el área de las Grandes Islas ni en Sinaloa, por lo que dichas áreas se excluyeron del análisis. La comparación entre los haplotipos y las secuencias intrónicas de las muestras de delfines tomadas a lo largo del golfo arrojaron valores muy pequeños de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  que no fueron significativamente diferentes de cero (Tabla XII).

De igual forma, la proporción de tursiones machos migrantes por generación  $N_m$  resultó ser infinito, reforzando la idea de que los tursiones machos tienen una gran capacidad de movimiento en el Golfo de California.

Tabla XII. Relaciones pareadas entre regiones. Debajo de la diagonal se muestran los valores de  $F_{ST}$  y arriba los de  $\Phi_{ST}$  resultantes de los análisis de secuencias intrónicas. Ningún valor resultó ser significativo.

	GN	GC	GS
GN	0	0.15529	0.14716
GC	-0.02886	0	0.01609
GS	0.02457	0.02157	0

### **Red Median-Joining**

La red Median-Joining refleja los diversos genotipos encontrados entre individuos costeros y oceánicos en el área de muestreo, Golfo de California (Figura 4). En el análisis de red Median-Joining se obtuvieron dos clados predominantes separados por cuatro mutaciones. Uno de ellos contiene al haplotipo más común (TT06, compartido entre los dos ecotipos) a partir del cual radian múltiples haplotipos más raros (Figura 5).



Los colores indican la región geográfica y el ecotipo al que pertenece cada individuo. En azul cielo se representa a los animales oceánicos del Bajo Golfo, en amarillo a los individuos oceánicos del Golfo Central, en azul turquesa a los animales costeros de Bahía de La Paz, en rojo a los costeros de Bahía Concepción, en verde a los del Alto Golfo y en rosa a los del Pacífico (Bahía Magdalena), los círculos negros indican haplotipos hipotéticos.

En el clado A se agrupan todos los individuos costeros pertenecientes a la Bahía de La Paz, los cuales a su vez comparten en su mayoría al haplotipo más común (TT06) y tienen solo un nucleótido de diferencia con el haplotipo que agrupa al resto de los animales costeros de Bahía de La Paz (TT08).

La red Median-Joining que contiene a los haplotipos de delfines oceánicos muestreados a lo largo del Golfo (Figura 6) es consistente con el dendograma resultante del análisis filogenético (Figura 8), es decir, en ambas representaciones podemos observar que los haplotipos se separan en dos clados principales, uno que contiene a todos los animales de Sinaloa (clado A) y otro que contiene a la mayoría de los animales del Golfo Norte (clado B)

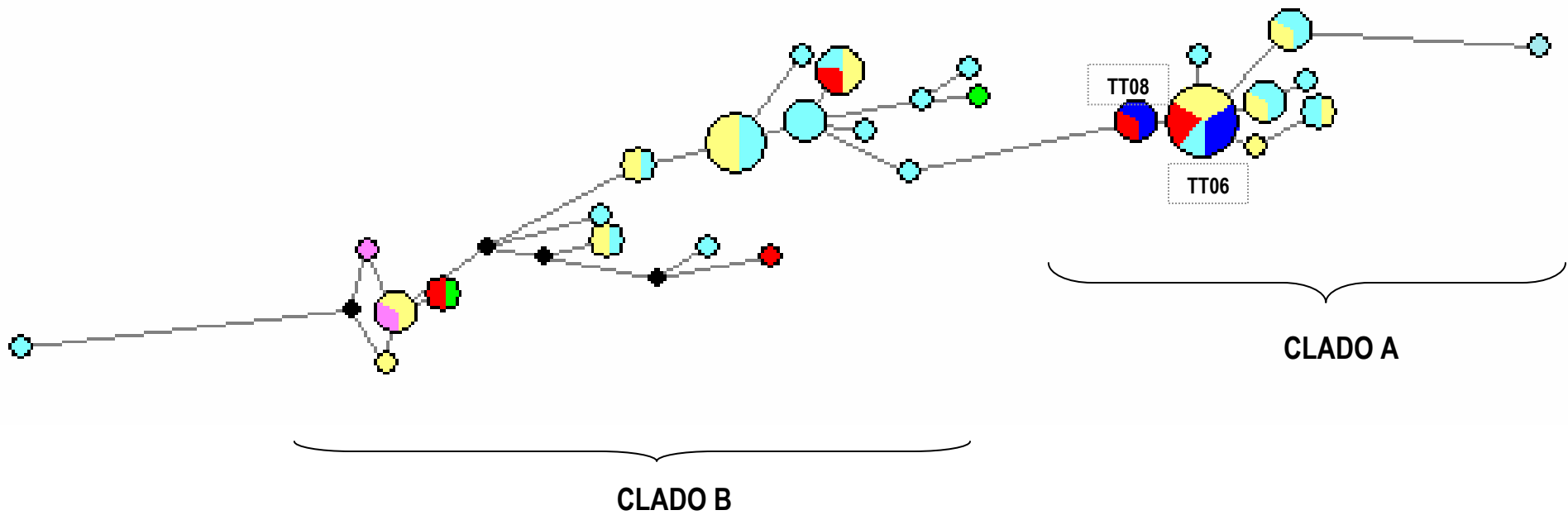


Figura 5. Red Median-Joining que muestra las relaciones entre los haplotipos. El diámetro del círculo es proporcional al número de individuos con ese haplotipo. El número de mutaciones entre cada haplotipo es proporcional al largo de la línea que los separa.

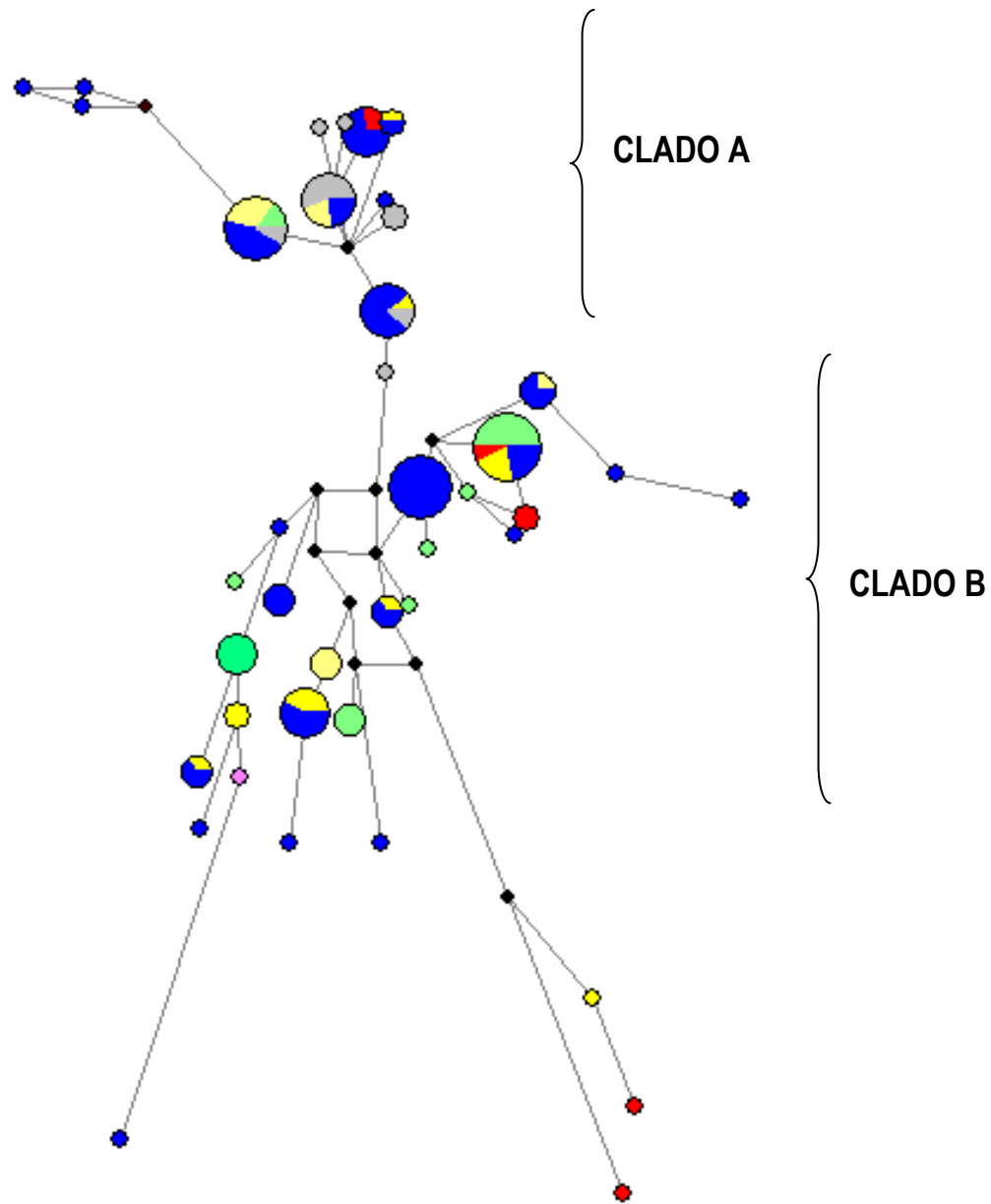


Figura 6. Red Median-Joining que muestra las relaciones entre los haplotipos de los grupos de delfines oceánicos muestreados lo largo del Golfo. El diámetro del círculo es proporcional al número de individuos con ese haplotipo. El número de mutaciones entre cada haplotipo es proporcional al largo de la línea que los separa. En rojo GN, en verde GI, en amarillo GC, en azul GS, en gris SIN y en rosa un individuo fuera del Golfo (Bahía Magdalena)

### 7.4.3. Relaciones Filogenéticas

#### - ADN mitocondrial

##### Entre Ecotipos

En un dendograma de Neighbor-Joining, se obtuvieron dos ramas bien diferenciadas con altos valores de remuestreo (Figura 7; nodo A: Valor de Bootstrap=88%). El clado A agrupa al 88% de los individuos, mientras que el clado B solo al 12%. El haplotipo TT24 que está representado por un animal oceánico muestreado en la Bahía de La Paz, resultó más relacionado con *D. capensis* que con el resto de los haplotipos. No se puede describir de manera confiable ninguna otra relación entre los haplotipos ya que muchas ramas presentan valores de remuestreo muy bajos (<50%). Sin embargo, es interesante notar que todos los individuos costeros pertenecientes a la Bahía de La Paz y la mayoría de los costeros de Bahía Concepción se encuentran agrupados dentro del subclado A1; este clado comprende al 61.5% de los animales costeros. En general, el análisis no revela algún otro patrón que separe a los individuos ecotípicamente ya que los animales oceánicos y costeros de otras localidades diferentes a la Bahía de La Paz se encuentran distribuidos a lo largo del árbol.

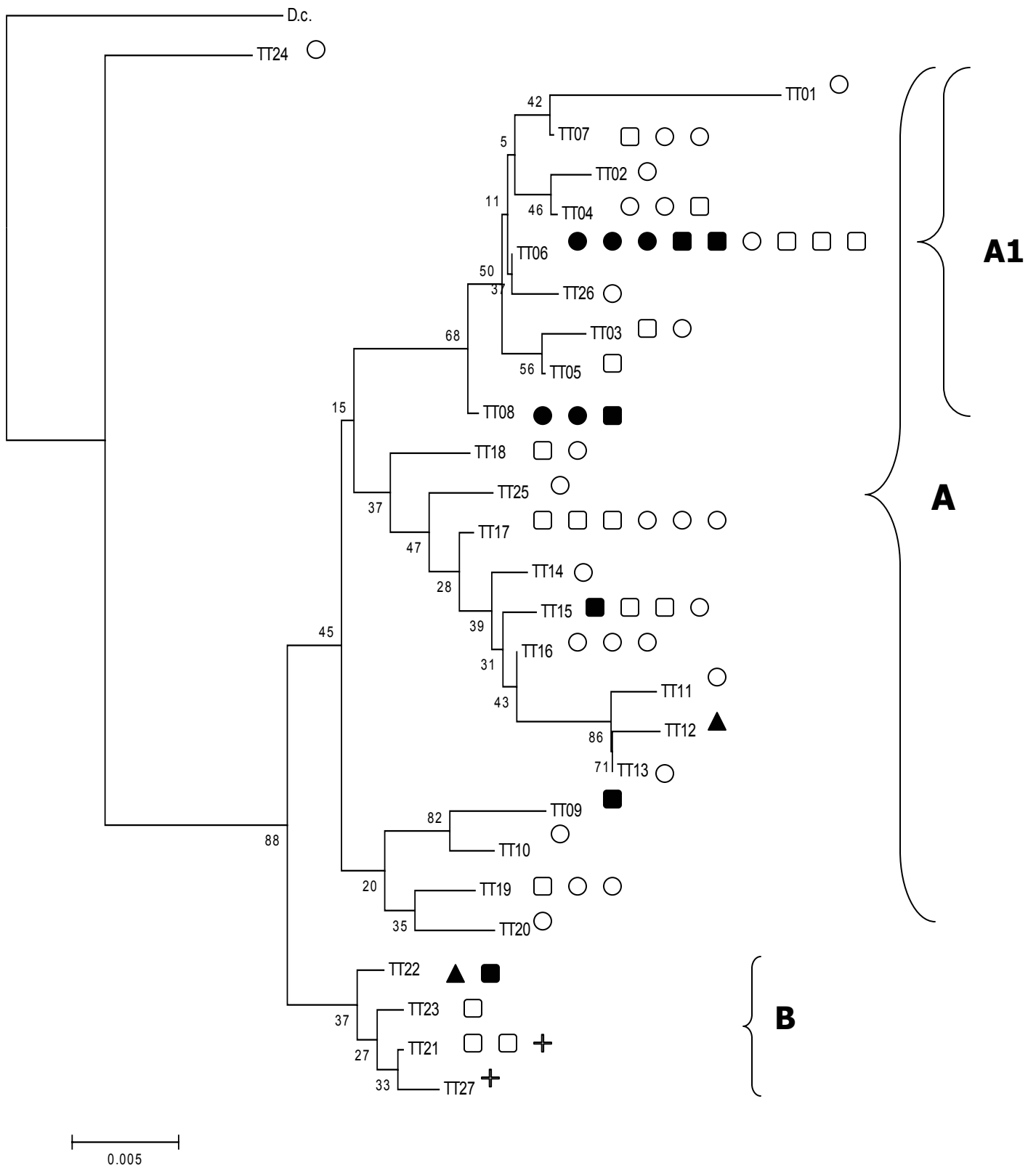


Figura 7. Árbol filogenético de N-J de 28 haplotipos. El número arriba de las ramas indica las proporciones de bootstrap en 1000 replicas. Las figuras rellenas representan animales costeros. Los círculos individuos del Golfo Sur; los cuadros animales del Golfo Centro, los rectángulos del Golfo Norte y las cruces a animales de fuera del Golfo (Bahía Magdalena)

### Entre poblaciones

En la genealogía estimada por el método Neighbor-Joining a partir de los 44 haplotipos encontrados en los grupos de delfines oceánicos muestreados a lo largo del Golfo de California se observa la formación de tres clados principales (Figura 8) con un alto valor de remuestreo (51 y 72%). El clado A agrupa al 57.23% de los individuos, el clado B al 40.7% y el C al 2% restante. La mayoría de los individuos pertenecientes a la región del Golfo Norte se agrupan dentro del clado A. Todos los individuos de Sinaloa se agrupan dentro del clado B; y el resto de los individuos pertenecientes a las poblaciones del resto del Golfo no muestran tendencia alguna a agruparse en algún clado específico.

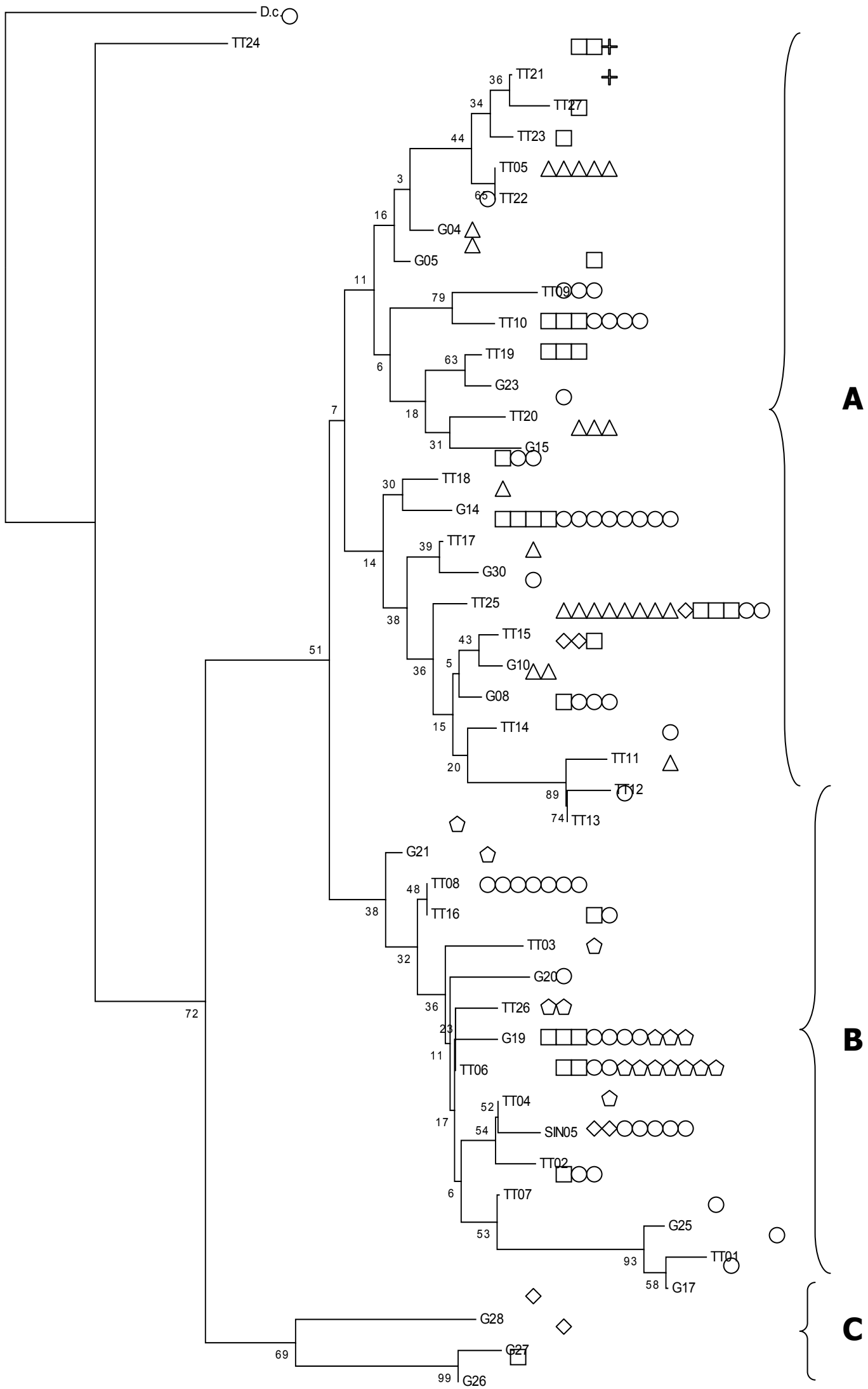


Figura 8. Filogenia N-J de 44 haplotipos de delfines oceánicos en diferentes localidades del Golfo.

- △ GN
- ◇ GI
- GC
- GS
- ◊ SIN
- + Bahía Magdalena



### - Secuencias Intrónicas de PLP

De nuevo, los resultados obtenidos usando las secuencias del intron PLP no muestran algún patrón de diferenciación genética entre las agrupaciones de tursiones en el Golfo de California. El árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del intron PLP no muestra una distinción clara entre los ecotipos ni entre las localidades, ya que los animales costeros y oceánicos de distintas localidades se distribuyen a lo largo del árbol (Figura 9).

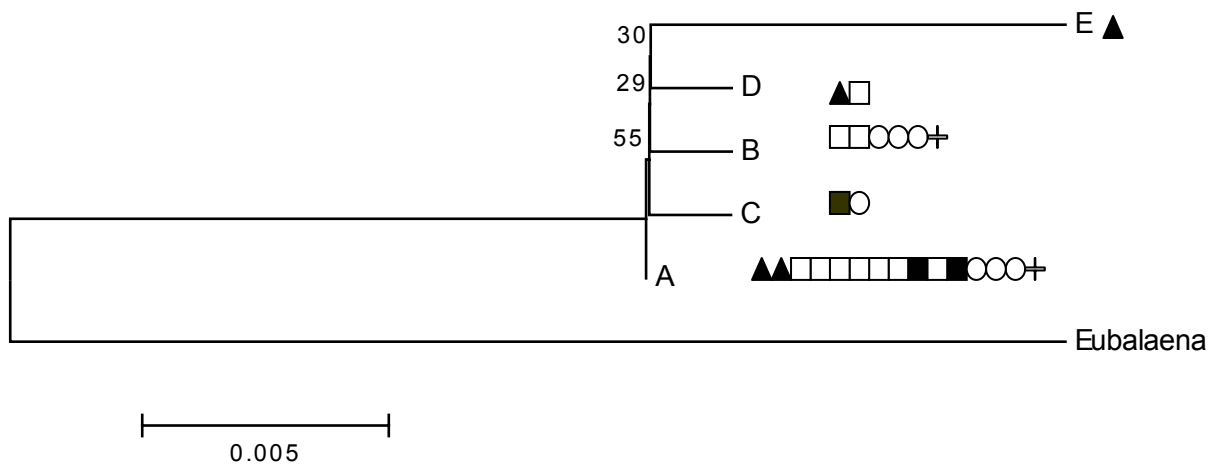


Figura 9. Dendrograma N-J de los 5 haplotipos del intron PLP. El numero arriba de las ramas indica las proporciones de bootstrap en 1000 replicas. Las figuras rellenas representas animales costeros. Los círculos individuos del Golfo Sur; los cuadros animales del Golfo Centro, los rectángulos del Golfo Norte y las cruces a animales de fuera del Golfo (Bahía Magdalena).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Estado de la Validación Morfométrica de los Ecotipos Costero y Oceánico de *Tursiops* en el Golfo de California.

Históricamente, de manera anecdótica y analítica, se ha hecho referencia o se ha documentado la existencia de poblaciones costeras y oceánicas de tursiones, en regiones que por su representatividad abarcan prácticamente el ámbito de distribución mundial del género. En distintos casos estas formas muestran una divergencia morfológica distintiva, que dieron como resultado que los primeros trabajos de la sistemática del género, describieran hasta 20 especies distintas (e.g. Hershkovitz 1966), siendo criticable el que éstas se describieran con tamaños de muestra muy limitados.

Los estudios sobre la morfología sistemática del género en el Pacífico Noreste indican la división del género en una forma oceánica pequeña denominada *T. nuuanu* (Andrews 1911) y una forma costera mas grande, denominda *T. gilli*.

Para fines de esta discusión es fundamental primero considerar los resultados obtenidos por estudios taxonómicos, que utilizan parámetros morfológicos similares para validar comparativamente a poblaciones costeras y oceánicas de *Tursiops* en el Pacífico Noreste (PNE) y Atlántico Noroeste (ANW), y los trabajos realizados sobre las formas costera y oceánica de *Tursiops* del Golfo de California, inspirados en estos:

En el primero, Walker (1981) comparó distintos caracteres craneales y encontró distintos valores modales, entre la forma costera (*T. gilli*) y oceánica (*T. nuuanu*) del PNE. Es importante subrayar que el autor encontró que para la mayor parte de los caracteres analizados la población costera fue relativamente mayor.

Nótese que los criterios más sólidos de diferenciación lo constituyeron la carga parasitaria y dieta. Los delfines costeros se alimentan principalmente de peces costeros (Sciaenidae y Embiotocidae), mientras que los oceánicos se alimentan principalmente de peces epipelágicos y cefalópodos (Walker 1981).

Posteriormente, Mead y Potter (1995) encuentran diferencias morfológicas entre las formas costera y oceánica de los tursiones del ANW, sólo que en este caso, estas poblaciones no habían sido descritas previamente como especies o subespecies distintas. Las medidas de los delfines (Longitud Total y Longitud del Cráneo) también mostraron diferencias modales y en contraste con los tursiones del ENP, en el ANW la forma oceánica resultó ser de mayor talla que la costera.

Aquí es de suma importancia considerar lo que implica el término “modal” y su interpretación por los autores (Walker, 1981; Mead y Potter, 1995). Lo que el término implica es que se observa una tendencia hacia la diferenciación morfológica pero en general todas las medidas “mostraron sobrelapamiento extensivo” (*sensu*: Walker 1981; Mead y Potter 1995).

Ahora bien, mientras que los ecotipos costero y oceánico fueron descritos por Walker (1981) acorde a diferencias craneométricas modales, usando muestras consistentes (pues provenían en mayoría de individuos varados en la costa o muertos en la pesquería del atún, respectivamente), Díaz-Gamboa (2003), emplea un criterio que comprende la comparación fotográfica de las siguientes medidas proporcionales: 1) Punta del rostro a punta de la aleta dorsal; 2) Punta del rostro

a espiráculo; 3) Punta del rostro al centro del ojo; 4) Punta del rostro al ápice del melón; 5) Punta del rostro a aletas pectorales; 6) Longitud de posterior de aletas pectorales; 7) Ancho máximo de aletas pectorales; 8) Longitud anterior de aletas pectorales. Utilizando estadística paramétrica, el autor encuentra que existe diferencia significativa en cada una de estas medidas y la ausencia total de traslape en las mismas, concluyendo que:

“Con base en los datos de avistamientos y las comparaciones entre proporciones corporales relativas de fotografías de tursiones, los ecotipos costero y oceánico se diferencian de forma general como sigue:

- Forma costera: En comparación con la forma oceánica, es más grande y robusta, de color más claro dorsalmente, con una capa dorsal relativamente más oscura que las capas lateral y ventral. Presenta un rostro más corto, aletas pectorales relativamente más cortas y amplias, y región ventral de color blanco. Generalmente, se encuentra en grupos pequeños (< 20 individuos).
- Forma oceánica: En comparación con la forma costera, es más pequeña, de color más oscuro dorsalmente, sin diferencias evidentes en la coloración de la capa dorsal y lateral. Presenta un rostro más largo, aletas pectorales relativamente más largas y más angostas, y región ventral de color gris claro. Generalmente, se encuentra en grupos más grandes (>200 individuos)” (*sensu*: Díaz-Gamboa 2003).

Es importante notar que este criterio de clasificación es el que ha sido utilizado, para trabajos posteriores sobre las formas costera y oceánica de *Tursiops* en el Golfo de California.

Así, Segura (2004), en un análisis encaminado a reconocer la divergencia poblacional de las formas costera y oceánica de *Tursiops* en el Golfo de California, emplea el criterio mencionado, dado que utiliza gran parte de las biopsias de *Tursiops* colectadas, analizadas y referidas como de tursiones oceánicos (n= 41) en el trabajo de Díaz-Gamboa (2003) y lo complementa considerando dos parámetros importantes en la diferenciación del hábitat de los tursiones: 1) la profundidad y 2) la distancia más cercana a la costa a la cual cada individuo fue muestreado. Lo que le permitió inferir la naturaleza costera u oceánica de muestras donadas por el Southwest Fisheries Science Center, La Jolla, Ca (n=37).

Siguiendo el criterio de Díaz-Gamboa (2003), fue posible percatarse que los Tursiones costeros y oceánicos llegan a ser simpátricos en la Bahía de La Paz (Rojo-Arreola, 2002) y posteriormente en Bahía Concepción (obs. pers.). Lo que sugiere que el criterio de segregación costero – oceánico, basado en la distancia a la costa y batimetría podría determinar identificaciones confusas. En otras palabras, tursiones oceánicos serían catalogados como costeros al internarse en aguas protegidas como las de la Bahía de La Paz, las que de hecho visitan (e.g. Salinas-Zacarías y Auriolos-Gamboa 2002; Rojo-Arreola 2002).

Independientemente de tal posible fuente de error, Segura (2004) encontró una divergencia moderada entre poblaciones putativas de tursiones costeros y oceánicos en el Golfo de California. Esto constituyó un indicio alentador para continuar los estudios encaminados a verificar y cuantificar de manera cada vez más precisa el grado de divergencia entre ambos ecotipos de Tursiones.

De los trabajos mencionados deriva este segundo esfuerzo, que a diferencia con el trabajo de Segura (2004) se sustenta por las observaciones de Díaz-Gamboa, Salinas- Zacarías y Rojo-Arreola, quienes en promedio tienen una experiencia de 7 años discriminando los morfotipos costero

y oceánico de tursiones en vida libre. A ello se le suma la ventaja de haberse colectado muestras de animales pertenecientes a grupos de delfines reconocidos como residentes en 2 áreas importantes de distribución de la especie en el Golfo de California: Bahía de La Paz y Bahía Concepción. Otra ventaja adicional es que los análisis también contemplaron la diferencia de las proporciones de sexo como un componente determinante de la estructuración, además de intentar por primera vez el análisis de dos marcadores moleculares (ADNmt e intrón nuclear PLP), para evaluar la divergencia entre ambos ecotipos de tursiones en el área de estudio.

8.2. La segregación de sexos, como criterio para diferenciar grupos de tursiones costeros y oceánicos en el Golfo de California, no es concluyente.

Además de su ecología distintiva, se ha señalado que la estructura social de los tursiones costeros y oceánicos es también distintiva, dada la flexibilidad del género para adaptarse a distintas condiciones ambientales. La estructura social de los tursiones se ha analizado respecto a la forma en que los individuos de la especie se relacionan y organizan dentro de los grupos (Wells *et al.* 1980; Ballance 1990; Shane 1990), encontrándose diferencias básicas en la organización social de los grupos de delfines costeros y oceánicos. Así, de manera general, en algunas áreas los tursiones costeros tienden a formar grupos pequeños, mientras los delfines oceánicos forman grupos más grandes (Shane *et al.* 1986; Connor *et al.* 2001, pero véase a Rossbach y Herzing 1999).

Para el Golfo de California, Díaz-Gamboa (2003) indica que acorde a su criterio de discriminación de ecotipos, se presentan diferencias entre tursiones costeros y oceánicos, respecto al tamaño de sus grupos, lo que también ha sido observado por otros investigadores que utilizan el

mismo criterio de discriminación (Salinas-Zacarías y Auriolles Gamboa 2002). Por otro lado, al igual que se ha observado en otros cetartiodáctilos (Jarman 1974; Tershy 1992; Brown *et al.* 1995, Goerlitz *et al.* 2003), la amplitud de movimientos de los delfines costeros y oceánicos podría estar fuertemente relacionada al sexo de los animales que la efectúan y los requerimientos ecológicos de cada sexo, especialmente al considerarse la fidelidad que muestran las hembras del ecotipo costero a áreas de aguas protegidas, someras y con alta productividad (e.g. Wells *et al.* 1987; Bristow y Rees 2001; Connor *et al.* 2001; Cassens *et al.* 2005).

Con base a estudios de fotoidentificación, Rojo-Arreola (2002), encuentra que en el Golfo de California y específicamente en la Bahía de La Paz, las hembras con cría del ecotipo costero son aparentemente muy fieles al área, lo que asociado a la mayor capacidad de movimiento de los machos, sustenta la hipótesis de que los grupos de tursiones oceánicos forman grupos más grandes, cohesivos y sin sesgo de sexos.

El análisis de contingencia para demostrar el sesgo en la proporción de sexos en grupos de tursiones costeros respecto a grupos de tursiones oceánicos (Tabla 1), careció de significancia estadística indicando que no existe tal sesgo en la proporción de sexos y por lo tanto que esta característica no puede utilizarse para discriminar a los ecotipos de tursiones del Golfo de California. Este resultado es consistente con estudios recientes sobre la estructura social de distintas especies de cetáceos, la que ha demostrado ser muy flexible y relacionada a las condiciones del ambiente, especialmente de qué tan predecibles y disponibles son las fuentes de alimento (e.g. Christal *et al.* 1998, Coakes y Whitehead 2004), como se había observado en otros grandes cetáceos del Golfo de California (Tershy 1992) y ungulados (Jarman 1974), el clado ancestral de los cetáceos (Milinkovitch *et al.* 1993). Concluyendo, en comparación con los criterios de discriminación morfológica, es aún

más difícil validar la segregación de sexo como criterio sólido para reconocer a los ecotipos costero y oceánico de tursiones en el Golfo de California.

8.3. Los Ecotipos Costero y Oceánico y las poblaciones latitudinales putativas de *Tursiops* en el Golfo de California, presentan divergencia, acorde al análisis de la Diversidad Haplotípica y Nucleotídica de ADNmt.

Como se ha visto, una consideración fundamental para distinguir los ecotipos costero y oceánico de *Tursiops* en el Golfo de California son las características morfológicas y hábitats en que se distribuyen. Desde el trabajo de Walker (1981), se ha evidenciado que entre ambos ecotipos existe un gran solapamiento en las medidas craneométricas y corporales, lo que como se discute más adelante, supone controversias respecto a si la identificación de los animales en vida libre fue o no efectiva.

Similarmente, salta a la vista que las áreas donde se ha demostrado morfológica, ecológica y genéticamente la existencia de ecotipos para el género *Tursiops*, son áreas sustancialmente distantes, o cercanas entre si, pero que exhiben hábitats fuertemente contrastantes (Walker 1981; Duffield *et al.* 1983; Hersh y Duffield 1990; Hoelzel *et al.* 1998; Rosel *et al.* 2003; Torres *et al.* 2003).

No obstante, la escasez de trabajos de marcado-recaptura de tursiones en el Golfo de California, aunado a que el criterio más robusto de diferenciación entre tursiones costeros y oceánicos es difícil de evaluar (hábitos tróficos), ha determinado que no se conozca con precisión la delimitación geográfica de las poblaciones costeras y oceánicas de tursiones. Trabajos muy recientes como el de Torres *et al.* (2003) constituyen la excepción.



A diferencia del trabajo de Segura (2004), que se desarrolló en su mayoría con base en muestras donadas por diferentes instituciones, este trabajo se condujo por observadores experimentados, que realizaron observaciones directas de los delfines en vida libre en campo, mismas que incluyeron la identificación de los ecotipos oceánico y costero de acuerdo a criterios morfológicos establecidos (Díaz-Gamboa 2003). El análisis de los datos genéticos aporta evidencias que sugieren que, independientemente de la diferencia de criterios, existe una ligera, aunque marginalmente significativa, diferenciación genética entre los tursiones costeros y oceánicos. Por ejemplo, en la Tabla XIII se presentan los haplotipos de ADNmt registrados por Segura (2004), complementados con los encontrados en este trabajo, así como el cálculo de su frecuencia. Se observa que a pesar de que el número de haplotipos aumentó con este trabajo, se presentan haplotipos privados entre Tursiones de ambas formas, lo que junto con las frecuencias relativas de distintos haplotipos no privados, sugieren la diferenciación genética de los ecotipos.

Tabla XIII. Frecuencia y distribución de haplotipos por ecotipo. Las filas sombreadas indican los haplotipos compartidos entre el ecotipo costero y oceánico. Los valores en negrita indican aquellos haplotipos que también fueron registrados en este trabajo, contribuyendo a la frecuencia de los mismos (modificado de Segura 2004).

Haplotipo	Costero	Costero	Oceánico	Oceánico
	# individuos	Frecuencia relativa	# individuos	Frecuencia relativa
<b>TTGC 07</b>	<b>10</b>	<b>0.21</b>	<b>7</b>	<b>0.073</b>
<b>TTGC 02</b>	<b>9</b>	<b>0.19</b>	<b>7</b>	<b>0.073</b>
TTGC 10	1	0.021	2	0.021
TTGC 01	1	0.021	1	0.01
TTGC 08	2	0.043		
<b>TTGC 09</b>	<b>1</b>	<b>0.021</b>	<b>3</b>	<b>0.031</b>
TTGC 04	1	0.021	1	0.01
TTGC 05	1	0.021		
TTGC 14	1	0.021		
TTGC 15	6	0.13		
<b>TTGC 18</b>	<b>4</b>	<b>0.086</b>		
TTGC 30	1	0.021		
<b>TTGC 31</b>	<b>6</b>	<b>0.13</b>		
TTGC 11			8	0.084
TTGC 12			5	0.052
TTGC 13			13	0.13
TTGC 22			3	0.03
TTGC 06			7	0.073
TTGC 23			3	0.03
TTGC 03			3	0.03
TTGC 17			1	0.01
TTGC 24			4	0.04
TTGC 25			1	0.01
TTGC 26			1	0.01
TTGC 27			1	0.01
TTGC 28			1	0.01
TTGC 29			2	0.02
TTGC 32			7	0.07
<u>NUEVOS</u>				
TTGC101			1	0.01
TTGC104			2	0.02
TTGC108			3	0.03
TTGC110	1	0.021		
TTGC112			1	0.01
TTGC113	1	0.021		
TTGC114			1	0.01
TTGC122			1	0.1
TTGC123			2	0.02
TTGC125			1	0.01
TTGC126			Bah Mag	0.01
TTGC128			1	0.01
TTGC129			1	0.01
Total	46		95	1.067

Por otra parte, considérese que una diversidad haplotípica  $h=1$  implica que todos los haplotipos de la muestra son diferentes. La diversidad genética de los 27 haplotipos mitocondriales muestreados en el presente trabajo es alta y similar a la encontrada en otros estudios de *T. truncatus* alrededor del mundo (Wang *et al.* 1999; Islas 2005) lo cual sugiere que un gran número de linajes de ADN mitocondrial han tenido el tiempo suficiente de evolucionar y diferenciarse para conllevar a una alta proporción de haplotipos únicos que difieren en solo unas pocas bases (Escorza-Treviño y Dizon 2000).

Se sabe que la heterocigosidad promedio tiene una correlación positiva con el tamaño efectivo poblacional y que a su vez se ve afectada por eventos de cuellos de botella (Nei 1983); un patrón de altos niveles de variación en la diversidad haplotípica (total 0.9498) y una moderada diversidad nucleotídica (total 0.013) como las registradas en este trabajo (Tabla IV) son comúnmente observadas en poblaciones de odontocetos en las que se esperaría presenten un tamaño poblacional relativamente alto y estable (e.g. *Delphinis delphis*, Rosel *et al.* 1994; *Lagenorhynchus obliquidens*, Lux *et al.* 1997; *Stenella coeruleoalba*, Archer 1996; y *Phocoena phocoena*, Rosel *et al.* 1995).

Se sabe que el número poblacional de algunas agrupaciones de *Tursiops* en el Golfo de California se mantiene estable a lo largo del año (Breese y Tershy 1993; Ballance 1990). En consecuencia los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica, sugieren la existencia de una población estable y residente de tursiones en el Golfo de California,

Por otro lado, la baja diversidad haplotípica ( $h= 0.6246$ ) encontrada en los individuos machos analizados sugiere que estos mantienen el flujo genético dentro de las poblaciones de delfines en el Golfo, lo que ya ha sido observado en distintas especies de cetáceos (Baker *et al.* 1998 a,b; Cassens *et al.* 2005).

En otras poblaciones de delfínidos se ha logrado discernir distintas poblaciones con base en las diferencias de diversidad nucleotídica; por ejemplo, Hayano *et al.* (2004) encuentran que la diversidad nucleotídica del ecotipo oceánico de *Lagenorhynchus obliquidens* es un grado de magnitud mayor que la del ecotipo costero de la misma especie ( $\pi= 2.04$  y  $\pi= 1.02$ , respectivamente). El autor sugiere que las poblaciones de delfines de costas blancas costeros y oceánicos del Pacífico Norte han experimentado un proceso de deriva génica, con fuertes barreras de flujo génico. De la misma manera, Natoli y colaboradores (2004) logran diferenciar poblaciones de tursiones costeros y oceánicos en el Atlántico Norte en donde, de nuevo, la diversidad haplotípica es un orden de magnitud mayor entre una población de delfines costeros y oceánicos ( $h=0.43$  y  $0.88$ , respectivamente).

En el presente trabajo se encontró un patrón similar pero con mucha menor magnitud, siendo el ecotipo costero menos diverso que el oceánico ( $h= 0.8030$ ,  $h= 0.9659$ ;  $\pi=0.011$ ,  $\pi=0.014$  respectivamente), pero no lo suficiente como para aseverar una diferenciación poblacional con base en este resultado.

La falta de divergencia de los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica, entre poblaciones de tursiones costeros y oceánicos, parece obedecer a la falta del sesgo en la proporción de sexos encontrada. En una población en la cual las hembras son altamente filopátricas y los machos más propensos a dispersarse, se esperaría identificar diferencias significativas en las

secuencias de ADN de un marcador matrilineal como el ADN mitocondrial. O'Corry-Crowe *et al* (1997) sugieren que los resultados de los análisis de ADN mitocondrial pueden ser usados para inferir acerca de la migración diferencial entre los sexos: debido a que los machos no contribuyen a su progenie con la información derivada del ADN mitocondrial, el haplotipo que lleva un macho esta solo disponible para su estudio durante el periodo de vida del animal y solamente para la localidad en que esta presente al momento del muestreo. Si el animal migra a diferentes poblaciones, su haplotipo también.

Por otro lado, las hembras pueden heredar sus haplotipos a la siguiente generación. Por lo tanto, si una hembra migra puede dejar copias de su haplotipo en las diferentes poblaciones a que migró y su progenie puede migrar también a otras poblaciones. Así, las hembras tienen mayor potencial de homogenizar las poblaciones.

Nuestros resultados muestran evidencia de que las hembras de *Tursiops* son mas móviles de lo que se especulaba, ya que la relativa homogeneidad en el ADN mitocondrial encontrada en los grupos de delfines en el Golfo esta dada principalmente por los machos aunque las hembras contribuyen de manera importante.

8.4. Los Ecotipos Costero y Oceánico y poblaciones latitudinales putativas de *Tursiops* en el Golfo de California, presentan divergencia, acorde al cálculo de índices de estructuración poblacional.

Las especies de mamíferos marinos son altamente movibles y capaces de mantener un alto rango de dispersión (ver revisión de Stevick *et al.* 2002). En los mamíferos marinos, generalmente

una estructura poblacional es más evidente en marcadores mitocondriales que nucleares (Hoelzel *et al.* 2002) y en algunos casos es debido al mayor rango de dispersión de los machos. Aunque se ha encontrado que para algunas poblaciones de *Tursiops truncatus* el flujo genético parece estar reducido entre las poblaciones por ambos sexos. Por ejemplo, en el Atlántico Norte, Natoli y colaboradores (2004) reportan que a pesar de que los grupos sociales de *Tursiops truncatus* son relativamente fluidos, encuentran evidencia de que ni las hembras ni los machos se dispersan de sus grupos natales. Lo anterior relacionado a altos valores de  $F_{ST}$  pareados en las poblaciones que ellos muestrean, incluso en poblaciones parapátricas que comparten la misma área ( $F_{ST}=0.39$ ), lo que indica un alto grado de estructura genética.

En tal contexto, se discuten los resultados de estructuración poblacional acorde a los índices  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$

#### Entre ecotipos Costero y Oceánico

Los análisis genéticos de las secuencias del ADN mitocondrial indican que no existe una distinción clara entre los morfotipos de delfines costeros y oceánicos en Golfo de California. En este estudio, el análisis de la distribución de la varianza genética de las muestras de *Tursiops* costeros y oceánicos en el golfo de California no provee de evidencia suficiente de la existencia de una estructuración ecotípica ni geográfica de los grupos de delfines encontrados en el área.

En el Atlántico Norte, Hoelzel y colaboradores (1998) llevaron a cabo un estudio genético en donde comparan poblaciones putativas de *Tursiops truncatus* costeros y oceánicos utilizando marcadores nucleares y mitocondriales. Las comparaciones de las secuencias de la región control

del ADN mitocondrial indicaron que una alta proporción de la variación podía ser explicada por diferencias entre las poblaciones ( $\Phi_{ST}=0.6$ ). Comparativamente, los resultados de subdivisión poblacional ( $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$ ) de delfines oceánicos y costeros del Golfo de California, mostraron diferencias significativas pero modestas entre estos ecotipos ( $F_{ST}=0.10128$ ,  $p<0.00293$ ;  $\Phi_{ST}=0.07616$   $p<0.05474$ ).

Nuestros resultados pueden indicar que ésta incipiente separación entre los delfines costeros y oceánicos en el Golfo de California podría ser relativamente reciente, o que existe un continuo flujo genético entre los ecotipos (Hoelzel *et al.* 1998). La probable falta de aislamiento reproductivo entre los ecotipos puede deberse a que los grupos de delfines costeros y oceánicos del Golfo de California tienen un rango de distribución extenso y flexible, por lo cual podrían tener una alta probabilidad de encontrarse y reproducirse, como se ha reportado que ocurre en las costas de Sudáfrica y el Pacífico Oriental Tropical (Hoelzel *et al.* 1998; Curry *et al.* 1994).

El traslape de hábitat para grupos de delfines oceánicos y el grupo de delfines costeros de la Ensenada de La Paz ya ha sido reportado anteriormente (Rojo-Arreola *et al.* 2001)

Por otro lado, se esperaría que el nivel de dispersión entre los grupos de delfines oceánicos sea mayor que entre los relativamente aislados grupos de delfines costeros. Sin embargo, nuestros datos revelan que hay cierto nivel de entrecruzamiento entre delfines costeros de las dos localidades muestreadas (Bahía de La Paz y Bahía Concepción), por ejemplo los haplotipos TT06 y TT08 se encuentran compartidos entre animales costeros y oceánicos de ambas localidades. Un estudio acerca del comportamiento migratorio y dispersión de esas agrupaciones ayudaría a aclarar el panorama.

### Grupos oceánicos a lo largo del Golfo

El análisis de varianza molecular de la región control dentro y entre los cinco estratos poblacionales identificó niveles substanciales de diferenciación genética. En general el 12% de la varianza molecular total fue resultado de la variación entre los cinco estratos.

En la tabla X se observa que en general los valores de  $F_{ST}$  tienden a ser menores que los valores de  $\Phi_{ST}$ , resultado de la baja diversidad nucleotídica total ( $\pi = 0.015117$ ) ya que los valores estadísticamente significativos de  $F_{ST}$  están basados únicamente en las frecuencias haplotípicas, mientras que  $\Phi_{ST}$  toma en consideración tanto las frecuencias haplotípicas como la distancia genética entre esos haplotipos, por lo que  $\Phi_{ST}$  es más eficiente para detectar estructura cuando ha pasado el tiempo suficiente para que la señal de divergencia se manifieste (Escorza-Treviño y Dizon 2000)

Se encontraron mayores niveles de diferencias significativas entre las áreas geográficas de Sinaloa y Golfo Norte respecto a las otras regiones, es decir, dichas áreas tienen un mayor nivel de aislamiento genético, lo cual indica que al menos estos dos grupos se han mantenido aislados reproductivamente por un espacio de tiempo suficiente como para detectar su divergencia.

Los resultados de los análisis de los delfines pertenecientes al grupo de Sinaloa, mostraron que este grupo es el mejor diferenciado, ya que los resultados del AMOVA indican la existencia de estructura genética en éste grupo, lo cual puede ser un potencial indicador de la existencia de una población bien definida en esa localidad.

Sin embargo, los análisis de los datos de frecuencias haplotípicas sugieren que hay un flujo genético considerable entre las poblaciones del Golfo Centro y Golfo Sur, como lo indica el



estadístico pareado de  $F_{ST}$  (Tabla X), resultado tanto del número de haplotipos privados como de las diferentes frecuencias haplotípicas encontradas en cada región. Se observa que la mayoría de los haplotipos están distribuidos equilibradamente entre las poblaciones putativas (Figura 5), una gran cantidad de los haplotipos compartidos se encuentran entre las poblaciones del Golfo Centro y Golfo Sur. Por ejemplo, las variaciones en las secuencias sugiere que el grupo del Golfo Norte es genéticamente más similar a el grupo del Golfo Sur (10% de diferencia) que al de Golfo Islas (17% de diferencia), su vecino más cercano geográficamente.

Finalmente, algunos autores argumentan que una poca diferenciación genética, como la encontrada en el presente estudio, entre las poblaciones putativas de delfines oceánicos muestreados latitudinalmente en el Golfo de California, puede no ser resultado de una homogenización genética debida al flujo genético, sino que puede ser el reflejo de un alto nivel de polimorfismo en población ancestral común, la cual subsecuentemente experimentó una rápida divergencia (Hayano, *et al.* 2003).

8.5. El análisis filogenético de secuencias control mitocondriales, indica que los ecotipos costero y oceánico de *Tursiops*, han tenido una historia divergente en el Golfo de California.

En el árbol N-J (Fig. 7), destaca la presencia de dos clados: A y B, soportados por remuestreo. En general, los valores de remuestreo en las ramas internas fueron bajos, aunque se observaron ciertos nodos con mayor resolución filogenética. El nodo que divide el clado A en A1 tiene un valor de remuestreo bajo, no obstante, parece haber diferencias en la conformación de los dos clados que integran el Clado A. El clado A1 está conformado por la mayoría de delfines

costeros. Mientras que el clado B presenta una topología distintiva, caracterizada por un número escaso de delfines costeros. Los haplotipos exclusivos de los delfines oceánicos fueron los más divergentes con respecto al resto de las secuencias, lo cual se indica por la longitud de sus clados internos, lo que sugiere que el ecotipo oceánico es más divergente en comparación con el ecotipo costero, como era evidente esperar dada la mayor divergencia nucleotídica que caracterizó al ADNmt de los delfines oceánicos.

Al respecto, la cercana relación entre numerosos haplotipos del clado mayor A del árbol N-J (Fig. 7), no contradice por fuerza la hipótesis de divergencia entre ecotipos. Otra manera de interpretar esta relación cercana es, que no ha pasado suficiente tiempo desde que estas poblaciones se separaron para que se detecte una señal de arreglo de linajes. En la familia Delphinidae, es común encontrar patrones de divergencia relativamente someros, incluso a un nivel interespecífico (por ejemplo, entre *Tursiops-Stenella-Delphinus*, LeDuc 2004). El mismo patrón podría explicarse de acuerdo a que los ecotipos costero y oceánico hayan sido originados a partir de una sola población de tursiones que colonizó el Golfo de California y debido a ello, los haplotipos, incluso privados, de cada población mantengan relaciones filogenéticas estrechas.

Esta última explicación, es asimismo la que explica de manera más parsimoniosa la distribución de clados de la reconstrucción filogenética, para evaluar una escasa divergencia entre poblaciones latitudinales putativas de *Tursiops* en el Golfo de California.

Esta reconstrucción filogenética (Fig. 8) sugiere la presencia de grupos divergentes de tursiones, mismos que permiten plantear una hipótesis de diferenciación mediada por los factores ecológicos de cada provincia del Golfo. Considérense por ejemplo la estabilidad de los clados que incluyen a los Tursiones muestreados en Sinaloa y la Provincia del Golfo Norte, dos áreas que

exhiben características oceanográficas contrastantes, que bien pueden explicar una divergencia por especialización ecológica. Si se mantiene el grado de aislamiento genético observado, por un tiempo considerablemente largo, es probable que los linajes lleguen a dividirse en especies distintas.

La especiación ecológica es dirigida por la selección natural divergente sobre caracteres asociados a características de un hábitat. Inclusive, después del apareamiento entre las formas divergentes, la selección natural actúa a favor del aislamiento reproductivo, seleccionando en contra a los híbridos, quienes presentan fenotipos intermedios (Futuyma 2002). Es clara la importancia de estandarizar los criterios que se emplean para diferenciar los ecotipos costero y oceánico. Quizá, proverbialmente sea importante retornar a lo básico. Es decir, a reconocer a ambas formas con base a su dieta como lo propuso desde el inicio Walker (1981), criterio consistente con la teoría de la divergencia y especiación por especialización trófica (Gaskin 1982) y no sería raro que constituyera una fuerza ecológica que favorezca la divergencia de ambos ecotipos de tursiones en el Golfo de California.

Es necesario continuar la investigación acerca de los ecotipos de *Tursiops* dentro del GC, es importante coleccionar datos biológicos y ecológicos que ayuden a clasificar las biopsias recolectadas, tamaños de grupo, comportamiento, fauna asociada incluyendo otros cetáceos, además de un tamaño mayor de muestra y otros marcadores moleculares (*v.gr.* nucleares) que nos permitan, en su caso, diferenciar genéticamente entre ecotipos con mayor certeza, además de entender otros aspectos de la historia de vida de esta especie.

## 9. CONCLUSIONES

- Opuesto a lo esperado, la evidencia molecular indica que no existen diferencias en cuanto a la estructura social de los delfines costeros y oceánicos, respecto a la proporción de los sexos de los delfines que integran un grupo dado.
- De acuerdo a un muestreo específico y dirigido a validar la divergencia morfológica y genotípica de los ecotipos de *Tursiops* en el Golfo de California, se verificó la correlación en la divergencia morfológica y molecular de los ecotipos costero y oceánico del género.
- Es notable que a nivel regional también exista divergencia molecular incipiente, que probablemente corresponda a la fidelidad que ciertos grupos de tursiones muestran por ciertos ambientes al especializarse para explotar sus nichos (e.g. la divergencia entre Golfo Norte y Sinaloa).
- Es aparente acorde a la diversidad haplotípica y nucleotídica que la diferenciación entre los ecotipos costero y oceánico y grupos de regiones específicas, corresponde a eventos de cuello de botella o de fundador recientes.
- Se verificó una incipiente diferenciación genotípica poblacional ( $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$ ) correspondiente entre los ecotipos oceánico y costero y entre ciertos grupos regionales de *Tursiops* en el Golfo de California.
- Al momento, la gran capacidad de movimientos de delfines machos explica la homogeneidad genética encontrada entre ecotipos y su estado incipiente de diferenciación genotípica.
- Dichas diferencias apuntan hacia la existencia de grupos de delfines con cierto nivel de filopatría pero que mantienen un flujo genético, provocado principalmente por los machos y en menor intensidad por las hembras; por lo tanto, y hasta que no se analicen otros marcadores genéticos

con mayor resolución, se concluye que los grupos de *T. truncatus* que habitan el Golfo de California pueden ser considerados una sola población.

## 10. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. y Lipman D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Álvarez A.A., Rojas H. y Prieto J.J.. 1997. **Geología de la Bahía de La Paz y áreas adyacentes**. *In*: La Bahía de La Paz, investigación y conservación, eds. Urbán R. y Ramírez M. UABCS. México, 13-30 p.
- Alvarez-Borrego S. y Lara-Lara J. R. 1991. The physical environment and primary productivity of the Gulf of California. *Amer. Assoc. Petrol. Geol. Mem.* **47**: 555-567.
- Andreassen H. P., Ims R. A. y Hertzberg K. 1998: Space-use responses to habitat fragmentation and connectivity in the root vole *Microtus oeconomus*. *Ecology*. **4**: 1223–1235.
- Avise J.C., 1994. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. Chapman and Hall, New York, NY. 511 p.
- Avise J.C., Helfman G.S., Saunders N.C. y Hales L.S. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4350–4354.
- Baird R. W. 2000. **The Killer Whale: Foraging specializations and group hunting**. *In*: Mann J., Connor R., Tyack P. L. y Whitehead H. (eds.) 2000. Cetacean Societies. University of Chicago Press. USA. 127-153 p.
- Baird, R. W. and Dill, L. M. 1995. Occurrence and behaviour of transient killer whales: seasonal and pod-specific variability, foraging behaviour, and prey handling. *Can. J. Zool.* **73**: 1300-1311.

- Baird, R. W. and Dill, L. M. 1996. Ecological and social determinants of group size in transient killer whales. *Behav. Ecol.* **7**: 408-416.
- Baird, R. W. and Stacey, P. J. 1988. Variation in saddle patch pigmentation in populations of killer whales (*Orcinus orca*) from British Columbia, Alaska and Washington State. *Can. J. Zool.* **66**: 2582-2585.
- Baker C.S., Medrano-Gonzalez L., Calambokidis J., Perry A., Pichler F.B., Rosenbaum H., Straley J.M., Urban-Ramirez J., Yamaguchi M. y Ziegesar O.von. 1998a. 'Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among humpback whales in the North Pacific'. *Molecular Ecology.* **7**, 695-708.
- Baker C.S., Flórez-González L., Abernethy B., Rosenbaum H.C., Slade R.W., Capella J., Bannister J.L., 1998b. 'Mitochondrial DNA variation and maternal gene flow among humpback whales of the Southern Hemisphere'. *Marine Mammal Science.* **14**, 721-737 p.
- Ball R. M. Jr. y J. C. Avise. 1992. Mitochondrial DNA phylogeographic differentiation among avian populations and the evolutionary significance of subspecies. *Auk.* **109**: 626-636.
- Ballance T. L. 1990. **Residence patterns, group organization, and surfacing associations of bottlenose dolphins in Kino Bay, Gulf of California, México.** *In*: Leatherwood S. and Reeves R. R. (eds.). *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, San Diego, USA. 267-283 p.
- Bandelt H. J., Foster P. y Röhl A. 1999. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**:37-48.
- Barros N.B. y Odell D.K. 1990. **Food habits of bottlenose dolphins in the Southeastern United States.** *In*: S. Leatherwood and R.R. Reeves (eds.): *The bottlenose dolphin*. Academic Press, Inc., San Diego. USA. 309-328 p.

- Bearzi G. 2001. Biopsy sampling and other intrusive research on free-ranging cetaceans. **Tethys Research Institute**. <http://www.tethys.org/biopsy.htm>
- Bernal G., Ripa P. y Herguera J.C. 2001. Variabilidad oceanográfica y climática en el bajo Golfo de California: influencias del trópico y Pacífico norte. *Ciencias Marinas*. **27** (4): 595-617.
- Berteaux D. y Boutin S. 2000. Breeding dispersal in female North American red squirrels. *Ecology*. **5**: 1311–1326.
- Berubé M. y Palsboll P. 1996. Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Mol. Ecol.* **2**: 283-287
- Bigg, M. A. 1982. An assessment of killer whale (*Orcinus orca*) stocks of Vancouver Island, British Columbia. *Rep. Int. Whal. Commn.* **32**: 655-666.
- Birky C.W., Fuerst P., Maruyama T., 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effect of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*. **121**, 613– 627.
- Bristow T. y Rees E. I. S. 2001. Site fidelity and behavior of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Cardigan Bay, Wales. *Aquatic Mammals*. **27**(1): 1-10.
- Brown J.R., Bechenbach A.T., Smith M.J., 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Mol. Biol. Evol.* **10**, 326– 341.
- [Brown M. R.](#), [Corkeron P.J.](#), [Hale P.T.](#), [Schultz K.W.](#) y [Bryden M.M.](#) 1995. Evidence for a sex-segregated migration in the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *Proc Biol Sci.* **259**:229-34.



- Brown W.M., 1985. **The mitochondrial genome of animals**. In: MacIntyre, R.J. (Ed.), *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum, New York, NY. 95–130 p.
- Cassens I. Van Waerebeek K., Best P., Tzika A., Van Helden A., Crespo E. y Milinkovitch M. 2005. Evidence for male dispersal along the coasts but no migration in pelagic waters in dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Molecular Ecology*. **14**, 107–121.
- Chilvers B. L y Corkeron P. J. 2002. Association patterns of bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) off Point Lookout, Queensland, Australia. *Can. J. Zool./Rev. Can. Zool.* **80**(6): 973-979.
- Christal J., Whitehead H. y Lettevall E. 1998. Sperm whale social units: variation and change. *Can. J. Zool./Rev. Can. Zool.* **76**(8): 1431-1440.
- Chow S., Clarke M.E. y Walsh P.J. 1993. PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. *Fish. Bull.* **91**, 619–627.
- Chow S., Kishino H. 1995. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* **41**, 741– 748.
- Coakes A.K. y Whitehead H. 2004. Social structure and mating system of sperm whales off northern Chile. *Can. J. Zool.* **82**: 1360–1369.
- Cockcroft, V. G. y G. B. Ross. 1989. Age, growth and reproduction of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus* from the East coast of Southern Africa. *Fishery Bulletin*. **88**: 289-302.
- Connor R. C., Heithaus M. R. y Barre L. M. 2001. Complex social structure, alliance stability and mating access in a bottlenose dolphin 'super-alliance'. *Proc. R. Soc. Lond.* **268**: 263-267.

- Cruickshank R. H. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic and Applied Acarology*. **7**: 3-14.
- Curry B. E. y Smith, J. 1997. **Phylogeographic structure of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): stock identification and implications for management**. In: Dizon, A. E., Chivers, S. J. and Perrin, W. F. (eds.) *Molecular Genetics of Marine Mammals*. Spec. Publ. 3, Soc. Mar. Mammal., Lawrence, USA. 227-247 p.
- Diaz-Gamboa R. 2003. Diferenciación entre tursiones *Tursiops truncatus* costeros y oceánicos en el Golfo de California por medio de isótopos estables de carbono y nitrógeno. **Tesis Maestría**. CICIMAR-IPN. 62 p.
- Duffield D.A. y Wells R.S. 1991. **The combines application of chromosome, protein and molecular data in the determination of social unit structure and dynamics in *Tursiops truncatus***. In: *Genetic Ecology of Whales and Dolphins*. Ed. A.R. Hoelzel. International Whaling Commn Special Issue 13:155-169 p.
- Eggert L. S., Lux C. A., O'Corry-Crowe G. M. y Dizon A. E. 1998. Dried dolphin blood on fishery observer records provides DNA for genetic analysis. *Marine Mammal Science*. **14**, 136-143.
- Excoffier L., Smouse P. y Quattro J. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*. **131**: 479-491.
- Flores-Ramirez S., Urbán-R. J., Villarreal-Chávez G. y Valles-Jiménez R. 1996. Spatial and temporal changes in the cetacean community structure at Bahía de La Paz, B.C.S., México (1988-1991). *Ciencias Marinas*. **22**: 151-173.

- Ford J.K.B., Ellis G.M., Barrett-Lennard L.G., and Morton A.B. 1998. Dietary specialization in two sympatric populations of killer whales (*Orcinus orca*) in coastal British Columbia and adjacent waters. *Canadian Journal of Zoology* **76** :1456-1471.
- Friesen V.L. 2000. **Introns**. In A. J. Baker (Ed). *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell. 274-294 p.
- Futuyma D. 1998. **Evolutionary Biology**. 3rd ed. Sunderland, MA. Sinauer Associates, Inc. 763p.
- Gannes L.Z., O'Brien D. M. y Martinex del Rio C.M. 1997. Stable Isotopes in Animal Ecology: Assumptions, Caveats and a Call for More Laboratory Experiments. *Ecology*. **78** (4): 1271-1276.
- Gaskin D.E. 1982. **The Ecology of Whales and Dolphins**. Heinemann. Gran Bretaña. 459 p.
- Goerlitz D.S., Urban J., Rojas-Bracho L., Belson M. y Schaeff C.M. 2003. Mitochondrial DNA variation among Eastern North Pacific gray whales (*Eschrichtius robustus*) on winter breeding grounds in Baja California. *Can. J. Zool.* **81** (12):1965-1972.
- Graves J.E., McDowell J.R. y Jones, M.L. 1992. A genetic analysis of weakfish *Cynoscion regalis* stock structure along the mid-Atlantic coast. *Fish. Bull.* **90**, 469–475.
- Haig S.M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*. **2**: 413–425
- Hartl D. L. y Clark A. G. 1997. **Principles of Population Genetics**. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA. 542 p.
- Heist E.J. y Gold J.R., 1999. Microsatellite DNA variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic bight. *Copeia*. **1**, 182–186.

- Hersh S. L. y Duffield D. A. 1990. **Distinction between northwest Atlantic offshore and coastal bottlenose dolphins based on hemoglobin profile and morphology.** *In:* Leatherwood, S. and Reeves, R. R. (eds.) *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, San Diego, USA. 129-142 p.
- Hoelzel, A. R. and Dover, G. A. 1991. Genetic differentiation between sympatric killer whale populations. *Heredity*. **66**: 191-195.
- Hoelzel A. R., Hancock J. M., y Dover G. A. 1991. Evolution of the Cetacean mitochondrial d-loop region. *Molecular Biology and Evolution*. **8**: 475-493.
- Hoelzel A. R., Potter C. W. y Best P. B. 1998. Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' populations of the bottlenose dolphin. *Proc. R. Soc. Lond.* **265**: 1177-1183.
- Hooker S. K., Iverson S. J., Ostrom P. y Smith S. C. 2001. Diet of northern bottlenose whales inferred from fatty-acid and stable-isotope analyses of biopsy samples. *Can. J. Zool.* **79**: 1442-1454.
- Hughes A. L., y Yeager M. 1997. Comparative evolutionary rates of introns and exons in murine rodents. *J. Mol. Evol.* **45**:125–130.
- Islas V. V. 2005. Genética de poblaciones y filogeografía de toninas *Tursiops truncatus* en el sur del Golfo de México y el Caribe. **Tesis Maestría**. UNAM. México DF. 89 p.
- Jarman P.J. 1974. The social organization of antelope in relation to their ecology. *Behavior*. **48**:215-267.
- Jiménez-Illescas A., Obseso M. y D. A. Salas. 1997. **Oceanografía física de la Bahía de La Paz**, B.C.S. *In:* La Bahía de La Paz, investigación y conservación, Urbán R. y Ramírez M. (eds) .UABCS. México, 31-42 p.

- Kenney R. D. 1990. **Bottlenose dolphins off the northeastern United States**. In: Leatherwood, S. and Reeves, R. R. (eds.) *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, San Diego, USA. 369-386 p.
- Klinowska M. 1991. **Dolphins, Porpoises and Whales of the World**: The IUCN Red Data Book. IUCN, Gland, Switzerland. 429 p.
- Kumar S., Tamura K. y Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. **5**:150-163.
- Krajewski C. 1994. Phylogenetic measures of biodiversity: a comparison and critique. *Biological Conservation* **69**:33-39.
- Kruetzen M., Barre, L. M., Moeller L. M., Heithaus M. R., Simms C., Sherwin W. B. 2002. A biopsy system for small cetaceans: Darting success and *wound* healing in *Tursiops spp.* *Mar. Mamm. Sci.* **18** (4): 863-878.
- Lambertsen R. H. 1987. A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. *Journal of Mammalogy*. **68**, 443 –445.
- Leatherwood S. y Reeves R. R. (eds.) **The Bottlenose Dolphin**. Academic Press, San Diego, USA. 653 p.
- LeDuc R. 2004. Species hard to define, but we know it when we see it...or do we? Cetacean Systematics Symposium. La Jolla, Ca. Abril, 2004.
- LeDuc R., Perrin W. F. y Dizon A. E. 1999. Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. *Mar. Mam. Sci.* **15**: 619-648.
- Li W.-H. 1997. **Molecular Evolution**. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 487 p.

- Mann J. 2000. **Unraveling the Dynamics of Social Life: Long-term Studies and Observational Methods**. In: Mann J., Connor R., Tyack P. L. y Whitehead H. (eds.) 2000. Cetacean Societies. University of Chicago Press. USA. 45-64 p.
- Martínez-López A. y Gárate-Lizarraga I. 1994. Cantidad y calidad de la materia orgánica particulada en Bahía Concepción, en la temporada de reproducción de la almeja catarina *Agropecten circularis* (Sowerby, 1835). *Ciencias Marinas*. **20** (3):301-320.
- Mead J. G. y Potter, C. W. 1995. Recognizing two populations of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) off the Atlantic coast of North America: morphologic and ecologic considerations. **IBI Rep.** 5: 31-44.
- Metcalfe N. 1993. Behavioral causes and consequences of life history variation in fish. *Mar. Behav. Physiol.* **23**: 205-217.
- Milinkovitch M.C., Orti G. y Meyer A. 1993. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature*. **361**: 346-8.
- Murphy W. J., S. Sun, Z. Chen, J. Pecon-Slattery y S. J. O'Brien. 1999. Extensive conservation of sex chromosome organizations between cat and human revealed by parallel radiation hybrid mapping. *Genome Reseach*. **9**: 1223-1230
- Natoli A., V. M. Peddemors y A. R. Hoelzel. 2004. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial analyses. *J. Evol. Biol.* **17**:363-375
- Nei M. 1987. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York. 512 p.
- O'Brien S. J., y E. Mayr. 1991. Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies. *Science* **251**:1187-1188.

- Palumbi S. R. y Baker C. S. 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Mol. Biol. Evol.* **11**(3):426-435.
- Rice D. W. 1998. **Marine mammals of the world: Systematics and Distribution.** Society for Marine Mammology Special Publication no. 4. 231 p.
- Richards A.F. 1996. Life history and behavior of female dolphins (*Tursiops* sp.). in Shark Bay, Western Australia. **Tesis Doctorado.** University of Michigan. USA. 226.
- Roca A. L., Georgiadis N. y O'Brien S. J. 2005. Cytonuclear genomic dissociation in african elephant species. *Nature Genetics.* **37** (1): 96-100.
- Roca A. L., Georgiadis N., Pecon-Slattey J. y O'Brien S. J. 2001. Genetic evidence for two species of elephant in Africa. *Science.* **293**: 1473-1477.
- Roden G. I. y Emilson I. 1979. Physical oceanography of the Gulf of California. **Symposium UNAM.** Mazatlan, Sinaloa, Mexico
- Roden G.I. 1964. Oceanographic aspects of the Gulf of California. *In:* van Andel T. H. y G.S. Shore (eds). Marine Geology of the Gulf of California. *Amer. Assoc. Petrol. Geol. Mem.* **3**: 30-58.
- Rojo-Arreola L. 2002. Tasas de reproducción e intervalos de nacimiento del tursiión *Tursiops truncatus* en la Bahía de La Paz. **Tesis Licenciatura.** UABCS. México, 56 p.
- Rojo-Arreola L., Salinas-Zacarías M. y Urbán J. 2001. Distribution and movements of bottlenose dolphin females. Abstracts, 14<sup>th</sup> Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Vancouver, Canada
- Román R. J. 2003. Información ecológica a partir del análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno en las cadenas tróficas. **Ensayo Predoctoral.** CICIMAR-IPN. México. 56 p.

- Rosel P. E., Dizon A. E. y Haygood M. G. 1994. Genetic analysis of sympatric population of common dolphin (genus *Delphinus*). *Mar. Biol.* **119**:159-167.
- Ross G. J. 1977. The taxonomy of bottlenosed dolphins *Tursiops* species in South African waters, with notes on their biology. *Ann. Cape Prov. Mus. (Nat. Hist.)* **11**: 135-194.
- Ross G. J. y Cockcroft V. G. 1990 **Comments on australian bottlenose dolphins and the taxonomic status of *Tursiops aduncus***. In: Leatherwood, S. and Reeves, R. R. (eds.) *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, San Diego, USA. 101-128 p.
- Rosbach K. A. y Herzing D. L. 1999. Inshore and offshore dolphin (*Tursiops truncatus*) communities distinguished by association patterns near Grand Bahama Island, Bahamas. *Can J. Zool.* **77**: 581-592.
- Rosel P. E. 2003. PCR-based sex determination in odontocete cetaceans. *Conservation Genetics*. **4**:647-649.
- Ryder O. A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*. **1**:9-10.
- Salinas-Zacarias M.A. 2005. Ecología de los tursiones, *Tursiops truncatus*, en la Bahía de La Paz, B.C.S. **Tesis de Doctorado**. Centro Interdisciplinario en Ciencias Marinas- IPN. La Paz, B.C.S. 103 pp.
- Salinas-Zacarias M. y Auriolles-Gamboa D. 2002. Variación de las agrupaciones de tursiones (*Tursiops truncatus*) en la Bahía de La Paz. XXVII Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos, Veracruz, Ver., Mayo 2002.
- Sambrook J. y Russell D.W. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 999 p.



- Santamaría N.A., Feliz-Pico E., Sánchez-Lizaso J. L., Palomares-García J. R., y Mazón-Suástegui M. 1999. Temporal coincidence of the annual eelgrass *Zostera marina* and juvenile scallops *Argopecten ventricosus* (Sowerby II. 1842) in Bahía Concepción, México. *Journal of Shellfish Research*. **18** (2): 415-418.
- Schneider S., Roessly D. y Excoffier L. 2000. ARLEQUIN v 2.0. A Software for Population Genetic Analysis. Genetic and Biometry Laboratory. University of Genove, Switzerland.
- Segura G. I. 2004. Diferenciación de ecotipos y estructura genética del delfín *Tursiops truncatus* en el Golfo de California. **Tesis Maestría**. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, B.C. 127 p.
- Shane S. H. 1990. **Comparison of bottlenose dolphin behavior in Texas and Florida, with a critique of methods for studying dolphin behavior**. In: Leatherwood, S. and Reeves, R. R. (eds.) *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, San Diego, USA. 541-558 p.
- Shane S. H., Wells R. S. y Würsig B. 1986 Ecology, behavior and social organization of the bottlenose dolphin: a review. *Mar. Mamm. Sci.* **2**, 34-63.
- Slatkin M. 1995. A Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. **139**: 457-462.
- Tamura K. y M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 512-526.
- Tershy B. R. 1992. Body size, diet, habitat use, and social behavior in *Balaenoptera* whales. *J. Mam.* **73**:477-486 pp.

- Thompson J. D., Higgins D. G. y Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Research*. **22**:4673-4680.
- Torres L. G., Rosel P. E., D'Agrosa C. y Read A. J. 2003. Improving management of overlapping bottlenose dolphin ecotypes through spatial analysis and genetics. *Marine Mammal Science*. **19**(3): 502-514
- Urbán J., Gómez-Gallardo A., Palmeros M. y Velásquez C. G. 1997. **Los mamíferos marinos de la Bahía de La Paz**. In: Urbán J. y Ramírez R. M. (eds.) La Bahía de La Paz. investigación y conservación. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México. 193-217 p.
- Van Waerebeck K., Reyes J. C., Read A. J. y McKinnon J. 1990. **Preliminary observations of bottlenose dolphins from the Pacific coast of South America**. In: Leatherwood, S. and Reeves, R. R. (eds.) The Bottlenose Dolphin. Academic Press, San Diego, USA. 143-154 p.
- Vidal-Hernández L.E. 1993. Variación biogeográfica de las dimensiones craneanas en toninas, (*Tursiops truncatus*) del mar de Cortés, México. **Tesis de Licenciatura**. FC-UNAM, 50 p.
- Wakeley J. 1993. Substitution rate variation among sites in hypervariable Region I of Human Mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **37**: 613-623.
- Walker J. L. y S. A. Macko. 1999. Dietary studies of marine mammals using stable carbon and nitrogen isotopic ratios of teeth. *Mar. Mammal Sci.* **15**(2):314-334.
- Walker J. L., Potter C. W. y Macko S. A. 1999. The diets of modern and historic bottlenose dolphin populations reflected through stable isotopes. *Mar. Mammal Sci.* **15**(2):335-350.

- Walker W. A. 1981. Geographical variation in morphology and biology of bottlenose dolphin (*Tursiops*) in the eastern north Pacific. **NOAA/NMFS Southwest Fisheries Center Administrative Report**, LJ-81-03C, La Jolla, USA. 21 p.
- Wang J.Y., Chou L.S. y White B.N. 1999. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Mol Ecol.* **8**: 1603-1612.
- Weller D. W., Cockcroft V. G., Würsig B., Lynn S. K. y Fertl D. 1997. Behavioral responses of bottlenose dolphins to remote biopsy sampling and observations of surgical biopsy wound healing. *Aquat. Mamm.* **23**: 49-58.
- Wells R. S. 1991. **The role of long-term study in understanding the social structure of a bottlenose dolphin community.** In: Pryor K. y Norris K. Dolphin Societies. L.A., CA. University of California Press. V. 6: 199-225 p.
- Wells R. S. y Scott M. D. 1999. **Bottlenose dolphin – *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821).** In: Ridgway S. H. y Harrison R. (eds.) Handbook of Marine Mammals. Vol. 6. Academic Press, San Diego, USA. 137-182 p.
- Wells R. S., Irvine A. B., y Scott M. D. 1980. **The social ecology of inshore odontocetes.** In: Cetacean Behavior: Mechanisms and Function. Herman L. R. (ed.). Wiley & Sons. USA.
- Wells R. S., Scott M. D. y Irvine A.B. 1987. **The Social structure of free-ranging bottlenose dolphins.** In: Current Mammalogy. Vol 1. Genoways H. (ed.). Plenum Press. USA.
- West-Eberhard M. J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **20**: 249-278.
- Whitehead, H. 1998. Cultural selection and genetic diversity in matrilineal whales. *Science.* **282**: 1708-1711.

- Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M., Gyllensten U.B., Helm-Bychowski K.M., Higuchi R.G., Palumbi S.R. y Prager E.M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* **26**, 375– 400.
- Young K. A. 2001. Defining units of conservation for intraspecific biodiversity: Reply to Dimminck *et al.* *Conservation Biology*. **15** (3): 784-787.

## ANEXO 1

### Protocolo de extracción de ADN genómico – Fenol-Cloroformo

1. Cortar finamente ~20 mg de tejido con una navaja fina.
2. Colocar el tejido en un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar 500µL de STE 0.1M (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, ph 8.0)
3. Agregar 20 µL de SDS al 20%
4. Agregar 5 µL de proteínasa K (10mg/ml) y agitar vigorosamente
5. Incubar a 37 °C en baño de agua durante toda lo noche o hasta que se digiera el tejido.
6. Agregar 500 µLde Fenol:Cloroformo:alcohol Isoamilico (24:24:1) y mezclar (vortex)
7. Agitar vigorosamente o vortexear 2 minutos
8. Centrifugar a 13 000 g por 15 min.
9. Separar cuidadosamente con una pipeta 500 µL de la fase acuosa (superior) a un tubo eppendorf de 1.5 mL. En caso de succionar parte de la interfase expulsar de la pipeta y centrifugar nuevamente por 5 min.
10. Repetir paso 6 a 9.
11. Agregar 1000 µL de etanol frío al 100%
12. Invertir el tubo varias veces y mantenerlo en refrigeración a –20 °C por al menos un par de horas
13. Centrifugar a máxima velocidad por 20 min. Para mejor producción de ADN centrifugar a 4 °C.
14. Remover el líquido del tubo, teniendo cuidado de no perder el pelet.
15. Agregar 750 µL de etanol 70 % y mezclar suavemente por 15 min.
16. Centrifugar a máxima velocidad por 5 min.
17. Remover cuidadosamente el etanol.
18. Dejar secar el pelet o secar en centrífuga SpeedVac por 10 min. o hasta secarse.
19. Agregar 50 –100 µL de TE 1x pH 8.0 o agua destilada estéril para resuspender el pelet. Dejar resuspender durante la noche a 4°C o por 30 min. a temperatura ambiente
20. Verificar la extracción con electroforesis en gel de agarosa al 1 %, por 50 min. / 85 V.

## ANEXO 2

CODIGO	ECOTIPO	REGION DE MUESTREO	FUENTE	DNA?	SEXO	MITOCONDRIAL?	PLP?
TT Abr03 A	costero	Bahía de La Paz (GS)	Este estudio	✓	Hembra		
TT Abr03 B	costero	Bahía de La Paz (GS)	Este estudio	✓	Macho	✓	✓
TT Jun03 A	costero	Bahía de La Paz (GS)	Este estudio				
Tt01 ES	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	Este estudio	✓	Macho	✓	✓
Tt1	costero	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Hembra	✓	
Tt2	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓		✓	
Tt39	costero	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓		✓	
Tt40	costero	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Macho	✓	
Tt41	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Hembra		
Tt42	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Hembra	✓	
Tt43	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR				
Tt44	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Macho		
Tt45	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Hembra	✓	
Tt46	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR				
Tt47	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR				
Tt48	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Macho	✓	
Tt49	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR				
Tt50	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR				
Tt51	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR				
Tt52	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Macho	✓	
Tt53	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR				
Tt54	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Macho	✓	
Tt001M	costero	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Hembra	✓	
Tt002M	costero	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Hembra		
Tt003M	costero	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR				
Tt004M	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Hembra	✓	
Tt005M	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓	Macho	✓	
BAPAZ VAR	costero	Bahía de La Paz (GS)	varado	✓			
TT (a)	costero	Bahía de La Paz (GS)	CICICMAR	✓			
Tt 1 amigo	oceánico	Bahía Concepcion (GC)	UABCS	✓	Macho	✓	✓
biopsia 1	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	UABCS	✓	macho	✓	✓
biopsia 2	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	UABCS	✓	Hembra	✓	
biopsia 3	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	UABCS	✓	Hembra	✓	
biopsia 4	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	UABCS	✓	Hembra		
biopsia 5	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	UABCS	✓	Macho	✓	
BahConMar1	costero	Bahía Concepcion (GC)	Este estudio	✓	Hembra	✓	
BahConAbr1	costero	Bahía Concepcion (GC)	Este estudio	✓	Macho		✓
BahConMay1	costero	Bahía Concepcion (GC)	Este estudio	✓	Hembra	✓	
BC VAR	costero	Bahía Concepcion (GC)	CIBNOR	✓	Macho		✓
BGC020804-02	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Macho	✓	
BGC020804-03	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC030804-06	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC030804-07	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC030804-08	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC030804-09	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Hembra		
BGC030804-10	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Macho	✓	
BGC030804-11	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC030804-12a	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC030804-12b	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC030804-13	oceánico	Bahía de La Paz (GS)	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC030804-14	oceánico	GC	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC030804-15	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC030804-16	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC030804-17	oceánico	GC	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC030804-18	oceánico	GC	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC030804-19	oceánico	GC	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC030804-20	oceánico	GC	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC030804-21	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC030804-22	oceánico	GC	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC030804-23	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC030804-24	oceánico	GC	BGC	✓	Macho		✓
BGC030804-27	oceánico	GC	BGC	✓		✓	
BGC040804-33	oceánico	GC	BGC	✓	Macho		✓
BGC040804-34	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra		
BGC050804-36	costero	GC	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC050804-37	costero	GC	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC060804-38	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra		
BGC100804-58	costero	GN	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC140804-71	oceánico	GC	BGC	✓	Macho		
BGC140804-74	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra		
BGC140804-75	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC140804-76	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra		
BGC140804-77	oceánico	GC	BGC	✓	Macho	✓	✓
BGC140804-78	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra		
BGC140804-79	oceánico	GC	BGC	✓	Hembra	✓	
BGC150804-81	oceánico	GC	BGC				
BGC150804-83	oceánico	GC	BGC				
BGC160804-84	oceánico	GC	BGC	✓		✓	
BGC160804-85	oceánico	GC	BGC	✓		✓	
QUINTA		Bahía Magdalena	SEMARNAT	✓	Hembra	✓	
CONCHA		Bahía Magdalena	SEMARNAT	✓	Hembra	✓	
DELFINARIO 2		Bahía Magdalena	SEMARNAT	✓	Macho		✓
DELFINARIO 3		Bahía Magdalena	SEMARNAT	✓	Hembra		✓