

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

“Genética de poblaciones y filogeografía de toninas *Tursiops truncatus*, en el sur del Golfo de México y el Caribe”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

PRESENTA

VALENTINA ISLAS VILLANUEVA

DIRECTOR DE TESIS: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2005



COORDINACIÓN

M343907



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de febrero del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) del(a) alumno(a) **Islas Villanueva Valentina** con número de cuenta 94529449 con la tesis titulada: "Genética de poblaciones y filogeografía de toninas *Tursiops truncatus*, en el sur del Golfo de México y el Caribe", bajo la dirección del(a) Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau.

| | |
|-------------|----------------------------------|
| Presidente: | Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa |
| Vocal: | Dr. Luis Medrano González |
| Secretario: | Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau |
| Suplente: | Dra. Gabriela Parra Olea |
| Suplente: | Dr. Juan Núñez Farfán |

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 22 de abril del 2005

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Valentina Islas Villanueva.

FECHA: 6 Mayo 05

FIRMA: Valentina Islas V

Si nos aventuramos en el conocimiento y en la ciencia lo hacemos tan sólo para
regresar mejor equipados para la vida.

Johann Wolfgang von Goethe

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo de la beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (172830-CONACYT) y de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (94529449-DGEP) y bajo el permiso de exportación de material biológico de CITES: MX-HR-008-MEX.

Quiero dedicar no sólo esta tesis de maestría sino todo mi futuro científico (bueno o mediocre) a mi tutor, el Dr. Daniel Piñero, por su apoyo en todo momento para sacar adelante a unos cuantos delfincitos en medio de tantos pinos, por enseñarme la cara amigable de la Ciencia, por ser un incansable formador, siempre optimista y esperanzador que nunca me dejó claudicar. Gracias por enseñarme que los grandes hombres pueden ser sencillos, entusiastas y divertidos. Gracias Dr. Pi.

Quiero agradecer a mi comité tutorial: el Dr. Luis Medrano González y el Dr. Constantino Macías García por su orientación a lo largo de toda la maestría.

A los miembros externos del jurado.: Dra. Gabriela Parra Olea, Dr. Ken Oyama Nakagawa y Dr. Juan Núñez Farfán, quiero agradecer de manera muy especial por su amable e inmediata disposición a revisar mi trabajo y por todas y cada una de sus valiosas aportaciones, las cuales le dieron forma y sentido a esta tesis. Los errores que prevalecen son todos mi responsabilidad.

A la Dra. Ella Vázquez Domínguez quiero agradecerle infinitamente por todo su apoyo e interés en mi proyecto a lo largo de la maestría, por sus aportaciones a mi tesis y por tantísimas cartas de recomendación.

Al Dr. Rus Hoelzel en cuyo laboratorio llevé a cabo una estancia de investigación y quien compartió conmigo todos sus conocimientos sobre mamíferos marinos que han sido una inspiración para mi carrera. A todos mis amigos de la Universidad de Durham, Claire, Emma, Rachael, Andy, Laura, Fiona, Ana, Demetrios, Ada, Grace y Carla quienes hicieron que mi experiencia en Inglaterra fuera inolvidable y muy especialmente a mi amigo Carlos de Luna por su apoyo y amistad incondicional en todo momento, sin el cual Durham no hubiera sido tan amigable y divertida.

Al Dr. Ramón Coral y la Dra. Haydeé Vargas del Centro Médico Nacional por estar siempre interesados en mi trabajo, compartir sus conocimientos conmigo, permitirme trabajar en su laboratorio en todo momento y sobre todo por su amistad y a todos mis amigos que se llenaron las manos de sangre de delfín al enseñarme a extraer DNA: Rocío, Manuel (Oscarito), Omar y Adriancito.

Al Dr. Antonio Mignucci por su valiosa colaboración en mi proyecto aportando sus conocimientos y una gran cantidad de muestras y proyectos futuros.

A todos los delfinarios que amablemente me han dado muestras ya que sin su cooperación este trabajo literalmente no se hubiera llevado a cabo, principalmente a Via Delphi y al Ing. Adán Zurbia quienes han apoyado mi carrera desde sus inicios y han confiado en mi trabajo. Al Dr. Alberto Delgado Estrella por enseñarme a trabajar correctamente con mamíferos marinos, por ser el principal aportador de muestras para este trabajo, por 10 años de trabajo en la zona de estudio en cuyos resultados se origina mi trabajo, por apoyarme y confiar en mí, a pesar de todo, en todos estos años.

A Roberto Sánchez Okrucky y Mauricio Cortez de Dolphin Discovery por su disposición y colaboración en la toma de muestras de sangre, algunas de las cuales están incluidas en este trabajo. A Patricia Meneses, Paola Smolensky y Francisco Rebolledo (Ricky) de Vallarta Adventures por su colaboración en la toma de muestras y principalmente a Alejandro Gómez Rubio por su interés y disposición a colaborar en este proyecto.

Al personal de Delfinity en Ixtapa, Guerrero. A los veterinarios de Six Flags (Aurora, Liz, Ennque y Jaime) por su confianza en mi trabajo, su colaboración y gran disposición de ayudar y aportar información y sobre todo por querer y cuidar a sus delfines a pesar de todo.

A Alejandro Ortega Argueta y Enrique Portilla de la Red de Varamientos de Veracruz por su cooperación para recaudar la única muestra de vida libre de ese estado en todo el trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Genética y Evolución, Ale Moreno, Miro, Lev, Erika A, Erika D, Paty Delgado y principalmente a Ana W, Argelia, Ale Vázquez, Rodolfo y anexos del lab: León y Paco por ayudarme, enseñarme, regañarme, contagiarme sus obsesiones, incorporarme al ruido de los refrigeradores y por generar el caos donde se generó mi proyecto.

A Rocío Esteban y Oscar Rodríguez por enseñarme y ayudarme en el trabajo de laboratorio, por tener todo listo y funcionando para que los resultados fluyeran rápidamente. A Anabel, Laura, Don José y Doña Chivis por su lucha para mantener en orden y limpio este laboratorio siempre de buen humor a pesar de mis histerias.

A toda mi familia en México y en Suecia por apoyarme donde quiera que me encuentre y darme ánimos para seguir adelante. A mi madre le agradezco su apoyo para que yo pudiera llevar a cabo este proyecto de vida.

A mi amiga Ana W por haberme ayudado, malacostumbrado, paseado, terapeado y haberme enseñado lo que es una cañas de altos vuelos. Argelia fue mi guía durante mis primeros pasos en el laboratorio. En ambas siempre he encontrado unas amigas cercanas, solidarias y con las que he compartido y madurado muchísimas cosas durante estos tres años.

Gracias a todos mis amigos por que sí.

CONTENIDO

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 | Estructura genética en las poblaciones de cetáceos | 3 |
| 1.2 | Distribución de <i>Tursiops truncatus</i> , (Montagu, 1821) | 8 |
| 1.3 | Normatividad y aprovechamiento de la especie | 10 |
| 1.4 | El problema de estudio | 11 |
| 2. | CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS | 13 |
| 2.1 | Marcadores moleculares | 13 |
| 2.1.1 | DNA mitocondrial (mtDNA) | 13 |
| 2.1.2 | Microsatélites | 14 |
| 3. | OBJETIVOS | 15 |
| 4. | MÉTODOS | 16 |
| 4.1. | Extracción de DNA | 16 |
| 4.2. | Obtención de datos genéticos | 16 |
| 4.2.1. | Microsatélites | 16 |
| 4.2.2. | DNA mitocondrial (mtDNA) | 17 |
| 4.3. | Análisis de datos | 18 |
| 4.3.1. | Diversidad genética en las poblaciones | 18 |
| 4.3.1.1. | Microsatélites | 18 |
| 4.3.1.2. | DNA mitocondrial (mtDNA) | 19 |
| 4.3.2. | Estructura genética y divergencia entre las poblaciones | 20 |
| 4.3.2.1. | Microsatélites | 20 |
| 4.3.2.2. | DNA mitocondrial (mtDNA) | 21 |

| | |
|--|----|
| 4.3.3 Relaciones entre haplotipos y poblaciones | 23 |
| 5. RESULTADOS | 26 |
| 5.1 Distribución geográfica de la muestra | 26 |
| 5.2 Obtención de datos genéticos | 28 |
| 5.2.1 Microsatélites | 28 |
| 5.2.2 DNA mitocondrial (mtDNA) | 29 |
| 5.3 Diversidad genética | 31 |
| 5.3.1 Microsatélites | 31 |
| 5.3.2 DNA mitocondrial (mtDNA) | 33 |
| 5.4 Estructura genética y divergencia entre las poblaciones | 37 |
| 5.4.1 Microsatélites | 37 |
| 5.4.2 DNA mitocondrial (mtDNA) | 40 |
| 5.5 Relaciones entre haplotipos | 47 |
| 5.6 Análisis de clados anidados (NCPA) | 53 |
| 6 DISCUSIÓN | 56 |
| 6.1 Diversidad genética en las poblaciones | 56 |
| 6.2 Estructura genética y divergencia entre las poblaciones | 61 |
| 6.3 Relaciones entre los haplotipos y análisis de clados anidados (NCPA) | 68 |
| 7 CONCLUSIONES | 72 |
| 8 LITERATURA CITADA | 74 |
| 9 APÉNDICES | 81 |

RESUMEN:

El delfín *Tursiops truncatus*, presenta una distribución cosmopolita con una mayor presencia en regiones costeras templadas y tropicales, en el Golfo de México su presencia ha sido bien documentada y por medio de fotoidentificación se han registrado desplazamientos de individuos entre las poblaciones del sureste del Golfo de México. En este trabajo se analizaron 61 individuos con cuatro *loci* de microsatélites nucleares y 332 pb de la región control del DNA mitocondrial (mtDNA) con el fin de conocer los procesos de subdivisión genética así como los patrones de dispersión sexo-específicos de estas poblaciones, se empleó una población de Sinaloa para comparar los resultados. Las poblaciones analizadas con ambos marcadores presentaron altos valores de diversidad genética comparados con Sinaloa. El flujo génico con los microsatélites nucleares fue muy alto entre las poblaciones del Golfo de México y el Caribe como se había sugerido anteriormente en estudios ecológicos y acústicos, mientras que los marcadores mitocondriales reflejaron una mayor estructura genética materna y un flujo génico restringido aún en poblaciones cercanas geográficamente como Cuba y Quintana Roo; estos resultados reflejan la dispersión diferencial entre ambos sexos. Los análisis filogenéticos y de asociación geográfica de haplotipos revelaron la presencia de un posible linaje ancestral en el Caribe, que probablemente se ha mantenido por el efecto de refugio que constituyen las lagunas semi-costeras como Holbox y una expansión territorial contigua en todas las poblaciones del sur Golfo de México y el Caribe, seguida de eventos de flujo génico restringido entre Bahamas, Cuba y Tabasco.

ABSTRACT:

The bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, shows a worldwide distribution with a major occurrence in coastal temperate and tropical waters although they also occur in pelagic waters. In Mexico its presence is very well documented and by means of photoidentification movements of bottlenose dolphins among populations from the southern Gulf of Mexico have been detected. In this work we analyzed 59 individuals with four nuclear microsatellite loci and 332 bp from the mitochondrial DNA control region, to determine the genetic structure of the southern Gulf of Mexico and Caribbean populations of bottlenose dolphins, and the sex-specific dispersal patterns they show, we compared our results with a population from the Pacific Mexican coast (Sinaloa). The populations from the Gulf of Mexico and the Caribbean showed higher genetic diversity values with both markers compared with the Sinaloa. The gene flow showed with the microsatellites within the Gulf of Mexico-Caribe group was quite high as it was suggested previously by ecological and acoustic studies, while the mtDNA showed a stronger genetic structure and a restricted genetic flow even in very close geographical regions like Cuba and Quintana Roo, these results show the sex-specific dispersal driven by males. Phylogenetic analyses showed the presence of a possible ancestral lineage in the Caribbean, probably as a result of a historical refuge in coastal lagoons like Holbox lagoon in Quintana Roo. The historical analysis of the haplotypes showed two main processes, an initial contiguous range expansion among all the populations from the southern Gulf of Mexico and the Caribbean, followed by: restricted genetic flow between Bahamas, Cuba and TabascoVer .

1. INTRODUCCIÓN:

Las poblaciones naturales por lo general están estructuradas en subpoblaciones discretas interconectadas por diferentes niveles de flujo génico. El flujo génico es el componente principal de la estructura de las poblaciones y determina en que grado están evolucionando dependiente o independientemente una de otra. Si N_m (la proporción de migrantes por generación) es mucho mayor que uno, el flujo génico impide la diferenciación local y si es mucho menor la deriva génica actúa independientemente en cada población (Slatkin, 1987). El origen de esta interrupción en el flujo génico y separación de las poblaciones puede estar influenciado por la vicarianza y la dispersión (Ronquist, 1997).

Si la dispersión entre las subpoblaciones resulta costosa, debido a que los individuos requieren desplazarse a hábitats desconocidos y poco favorables, sus movimientos serán mínimos y desarrollarán una fidelidad por el territorio o filopatría (Perrin y Mazalov, 2000; Ballance, 1990) lo que causará una restricción en el flujo génico y como resultado las poblaciones comenzarán a diferenciarse.

Por otra parte cuando hay competencia entre parientes dentro de una población, se reduce la adecuación inclusiva, como consecuencia las especies tienden a desviar las proporciones sexuales en favor del sexo que sufre menos en la competencia local o a dispersarse. En algunas especies de mamíferos el origen

de esta competencia intra-poblacional es el sistema reproductivo que presentan. Algunas especies de mamíferos son promiscuas o poligínicas. En estos sistemas de apareamiento los machos realizan una contribución muy pequeña al cuidado parental y se enfocan más a la competencia entre machos por las hembras y en la dispersión (Trivers, 1985).

Estas diferencias etológicas, ecológicas y de dispersión son de gran importancia para elucidar los patrones filogeográficos de las especies, ya que en la mayoría de los animales estos patrones están bien diferenciados entre sexos (Greenwood, 1980). En la mayoría de las especies la información acerca del comportamiento de los machos se ha inferido a través de los patrones de diversidad y variación genética del DNA mitocondrial (mtDNA) y de los marcadores heredados biparentalmente (Fitz-Simmons *et al.* 1997).

La distribución geográfica en el tiempo, de los linajes genealógicos de las especies inferidos en su mayoría a través de estos marcadores genéticos, es el objeto de estudio de la Filogeografía. Esta disciplina requiere conocimientos de genética molecular, genética de poblaciones, etología, demografía, biología filogenética, paleontología y geografía histórica para analizar e interpretar las distribuciones de los linajes, así como la disposición actual y estructura genética observada en las poblaciones naturales (Avice, 2000).

1.1 Estructura genética en las poblaciones de cetáceos

Las poblaciones de cetáceos habitan un medio aparentemente continuo cuyas barreras geográficas, totales o parciales, podrían estar dadas por aspectos físicos como la topografía marina y la temperatura del agua (Würsig y Würsig, 1979), sin embargo cuando las barreras geográficas totales o parciales están ausentes, la divergencia de las poblaciones bajo los supuestos de un equilibrio entre migración y deriva genética ocurre por la adaptación diferencial de las poblaciones a ambientes contrastantes (Latta, 2003).

Se ha observado que las fuerzas principales que determinan la estructura genética presente en las poblaciones de cetáceos son las especializaciones derivadas de su comportamiento, cuya evolución está influenciada principalmente por tres factores ecológicos: dónde nacen, dónde forrajean y qué comen (Connor, 2003).

En los cetáceos la diferenciación o estructuración genética intraespecífica puede ser simpátrica o parapátrica (Hoelzel, 1998). Se dice que la simpatría surge cuando los rasgos adquiridos durante el aislamiento están correlacionados con el uso de recursos de las poblaciones, por esta razón las especializaciones por lo general surgen con diferencias de comportamiento. Cuando este polimorfismo en el uso de los recursos lleva a una reproducción diferencial o

separación física, esto puede derivar en una especialización etológica que lleve a la simpatria (Skulason y Smith, 1995). Por su parte la parapatria se da cuando las poblaciones se separan físicamente el tiempo necesario para lograr que se diferencien en cierto grado pero posteriormente se encuentran en zonas de contacto y vuelven a reproducirse entre sí. Un ejemplo de este fenómeno es la división de algunas especies durante las glaciaciones o la expansión territorial de otras por cambios en el ambiente, si en este aislamiento se desarrollan mecanismos de aislamiento precigótico pero las subsecuentes cruces son viables, la simpatria se mantendrá dependiendo de la intensidad en las adaptaciones o comportamiento desarrollado durante la alopatria (Hoelzel, 1998).

Algunos casos de diferenciación simpátrica como consecuencia de especializaciones en comportamiento incluyen a diversas especies de odontocetos. Estas especies presentan una marcada estructura genética entre poblaciones de distribución geográfica contigua, en ocasiones mayor o igual a la estructura presente entre poblaciones muy lejanas de la misma especie. Hoelzel *et al.* (1998b) estudiaron a las poblaciones de orcas desde el norte de California hasta las costas de Alaska con marcadores nucleares y mitocondriales, se sabe que como consecuencia de su estrategia de forrajeo las orcas se dividen en dos grupos: residentes y transitorios. Los grupos de orcas residentes están especializados en comer peces y presentan un comportamiento filopátrico en su mayoría, mientras que los grupos transitorios especializadas en comer pequeños

mamíferos marinos presentan una gran dispersión. Los resultados revelaron niveles de diversidad genética muy bajos en ambos marcadores y una profunda separación entre poblaciones vecinas de orcas especializadas en diferentes estrategias de forrajeo.

Los delfines moteados *Stenella attenuata*, del Pacífico Oriental Tropical (ETP), presentan poblaciones costeras y oceánicas que coexisten en la zona. Ezcorza-Treviño *et al.* (1999) emplearon tres microsátélites y mtDNA para determinar la subdivisión poblacional dentro de esta especie. Con el mtDNA encontraron profundas separaciones entre individuos costeros y oceánicos, así como gran estructura entre las poblaciones costeras, mientras que con los microsátélites únicamente se mantuvo la separación entre costeros y oceánicos, lo cual nos habla de dispersión sexo-específica dentro de las poblaciones costeras y una gran divergencia entre poblaciones costeras y oceánicas simpátricas.

En el caso de los delfines giradores, *Stenella longirostris*, se encontraron diferencias genéticas significativas con mtDNA y 13 microsátélites entre poblaciones pelágicas, de aguas someras y de islas, así como entre poblaciones de diferentes océanos (Garrison *et al.*, 1999).

Este fenómeno está muy bien documentado en *Tursiops truncatus*, varios estudios sugieren la presencia de dos formas de toninas, una costera y una pelágica. En la costa noroeste del Atlántico las toninas costeras son más

pequeñas y las oceánicas más grandes con intervalos sobrelapados en las medidas de largo total del animal y largo del cráneo, estudios de contenido estomacal de estas dos formas revelan que las costeras se alimentan predominantemente de peces costeros de la familia Sciaenidae y de una especie de cefalópodo costero (*Loligo sp.*), mientras que las toninas oceánicas se alimentan de peces y calamares pelágicos (Mead y Potter, 1995). En el Pacífico Nororiental (ENP) las diferencias entre estas dos formas son tan grandes que por mucho tiempo se les llegó a considerar diferentes especies. Walker (1981) comparó varias medidas craneales entre las dos formas y encontró grandes diferencias en tamaño y en contenido estomacal entre la forma costera, comúnmente llamada (*Tursiops gilli*) y la oceánica (*Tursiops nuuanu*), siendo en esta ocasión la costera significativamente más grande. Estas diferencias entre las dos formas no son sólo morfológicas. Hersh y Duffield (1990) encontraron diferencias significativas entre ambas formas de toninas en la concentración de hemoglobina, así como de eritrocitos en la sangre, siendo mayor en los animales oceánicos además de presentar dos tipos de mioglobina a diferencia de los costeros que sólo presentan uno.

Hoelzel *et al.* (1998) analizaron las poblaciones de toninas *Tursiops truncatus* de la costa del Atlántico Norte con microsatélites nucleares y secuencias de mtDNA, sus resultados confirmaron que las poblaciones que anteriormente se habían dividido en costeras y oceánicas, son unidades evolutivas independientes que a pesar de coexistir geográficamente (en parapatría) han

desarrollado especializaciones de forrajeo que dan como resultado la marcada divergencia genética entre los dos grupos con ambos marcadores.

Esta gran divergencia genética entre poblaciones vecinas no ocurre únicamente entre grupos claramente especializados (costeros, pelágicos, residentes y transitorios), Dowling y Brown (1992) analizaron RFLP's de la región control del mtDNA en poblaciones de *Tursiops truncatus* y encontraron diferencias entre los grupos vecinos de toninas de cada lado de la península de Florida, pero no entre las poblaciones contiguas del noreste de Florida o entre poblaciones del suroeste de Massachussets.

Por su parte Parsons *et al.* (2002) analizaron la región control del mtDNA en 29 muestras de cinco localidades en el Reino Unido. A pesar del pequeño tamaño de muestra, lograron encontrar algunas subdivisiones poblacionales significativas y una variable diversidad genética entre las poblaciones putativas. El resultado más notable fue que la población principal que se localiza en Moray Firth presenta una menor estructura genética con la población de Gales y una mucho más marcada con su vecina geográfica del Norte de Escocia.

Natoli *et al.* (2004) analizaron nueve microsatélites nucleares y secuencias de mtDNA en seis poblaciones de toninas distribuidas ampliamente (Mar Mediterráneo, Atlántico Norte Oriental, Atlántico Norte Occidental, Pacífico Norte Oriental y norte del Golfo de México), encontraron diferenciación genética con

ambos marcadores entre todas las poblaciones putativas regionales lo que sugiere un flujo genético restringido tanto para machos como para hembras, de nuevo la diferenciación entre grupos pelágicos y costeros en la mayoría de los casos es muy grande y es menor entre los costeros.

No está claro si la abundante variabilidad en la morfología, las adaptaciones al hábitat, el comportamiento de alimentación y la estructura social entre las poblaciones de *Tursiops truncatus*, reflejan separaciones filogenéticas reales o sólo la plasticidad fenotípica de una sola especie ampliamente distribuida (Curry y Smith, 1997).

1.2 Distribución de *Tursiops truncatus* Montagu (1821)

El delfín *Tursiops truncatus*, es la especie de odontoceto más conocido y estudiado. Su distribución es cosmopolita y más abundante en regiones costeras templadas y tropicales (Shane, 1988), aunque también habitan aguas pelágicas. A excepción de su presencia en el Reino Unido y el norte de Europa generalmente no se encuentran más allá de los 45° de latitud en ambos hemisferios como se observa en la Fig. 1 (Jefferson *et al.*, 1996; Rice, 1998).

En México se han observado en la costa del Pacífico en Sinaloa (Reza-García, 2001), Sonora y dentro del Golfo de California. En el Golfo de México su

presencia está bien documentada en Veracruz (Heckel, 1992), Tabasco (López-Hernández, 1997), Campeche (Delgado-Estrella, 1991), Yucatán y Quintana Roo (Ortega-Ortíz, 1986; Delgado-Estrella, 2002).

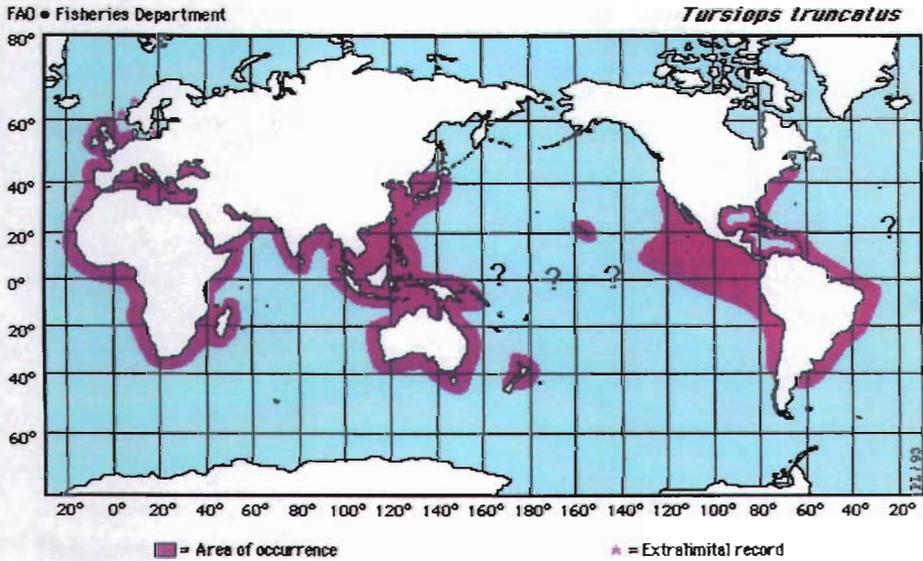


Figura 1. Distribución mundial de *Tursiops truncatus*. Se muestran con un asterisco los registros de animales fuera de los límites descritos.

1.3 Normatividad y aprovechamiento de la especie

Dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 el delfín *Tursiops truncatus* aparece como una especie sujeta a protección especial, lo que incluye a las especies o poblaciones que podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad. Por estarazón se determina la necesidad de propiciar la recuperación y conservación de poblaciones de esta especie y de especies asociadas.

El factor de riesgo que incide sobre las poblaciones de esta especie, es el hecho de que se explota de varias maneras y en diferentes intensidades dependiendo de la localidad; para espectáculo y exhibición (Ortega-Ortiz, 1996), como camada para tiburón y eliminación por competencia con los pescadores (Gallo, 1986; Delgado-Estrella, 1991 y López-Hernández, 1997), en programas interactivos de humanos con delfines incluyendo entretenimiento y terapia de patologías como el autismo (Simmonds, 1991 en Pérez-Cao, 1996) y en otros países forman parte de programas de ecoturismo como "Whalewatcher" y "Dolphin watch trip" (Hoyt, 1994 en Pérez-Cao, 1996).

La diversidad de actividades realizadas con delfines aumenta la demanda de capturas y decesos de los mismos durante o como consecuencia de la maniobra, siendo este fenómeno intensivo en localidades en donde se pueden capturar fácilmente o donde compiten más con los pescadores. Es necesario

que se conozca el estatus genético de todas las poblaciones y que las poblaciones disminuidas no sean agotadas para que se conserven los niveles naturales y patrones de diversidad genética de la especie (Hoelzel, 1998).

1.4 El problema de estudio

Comprender los procesos de subdivisión genética de los cetáceos es muy difícil ya que muchas de las especies tienen áreas de distribución amplias y son muy móviles (Escorza-Treviño y Dizon, 2000). Varios estudios sugieren que las poblaciones costeras de *Tursiops truncatus*, presentan patrones de dispersión influenciados por el sexo, con diversos grados de filopatría en las hembras y no se sabe que sucede con las poblaciones oceánicas (Curry y Smith, 1997). Se cree que algunas poblaciones del Golfo de México migran por la costa y que otras de Carolina del Norte migran hacia Florida (Curry y Smith, 1997). Delgado-Estrella (2002) encontró por medio de fotoidentificación, toninas que se desplazaron desde Quintana Roo hasta Tabasco (aprox. 800 km) y desde la laguna de Términos, Campeche hasta Tabasco, (aprox. 270 km), lo que indica que hay un flujo de individuos entre las poblaciones del sureste del Golfo de México.

Estas observaciones son importantes pero incompletas ya que para tomar medidas sobre la conservación efectiva de especies estructuradas por

comportamientos de forrajeo o reproducción se requiere de un amplio conocimiento tanto geográfico como histórico de las dinámicas en la estructura genética de las poblaciones (Hoelzel, 1998; O'Corry-Crowe *et al.*, 1997) así como de la diversidad genética actual como consecuencia de sus interacciones con el hombre. En el caso de las toninas su comercialización puede hacer que los animales se muevan de manera artificial y la detección de patrones genéticos particulares de la región, así como de sus alcances migratorios se hace también indispensable como medida de control del tráfico ilegal de animales.

2. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

2.1 Marcadores moleculares

2.1.1 DNA mitocondrial (mtDNA)

El mtDNA ha sido empleado principalmente en estudios filogeográficos y es considerado el marcador molecular ecológico por excelencia. Las características principales que presenta esta molécula y que son ideales en estudios de filogeografía son: alta tasa de mutación, ausencia de recombinación y herencia materna (Avice, 2000).

Diferentes sitios en los genes del genoma mitocondrial evolucionan a diferentes tasas. Una de las regiones mayormente estudiadas es la región control del mtDNA, y dentro de esta la región llamada D-loop, que por lo general muestra una alta tasa de sustitución nucleotídica y como consecuencia, altos niveles de polimorfismo intraespecífico. Calibraciones sugeridas para esta región dicen que su tasa de sustitución puede ser de tres a cinco veces mayor que la del resto del genoma mitocondrial (Avice, 2000).

2.1.2 Microsatélites.

Los microsatélites también llamados STR, SSR, VNTR y SSLP (Short Tandem Repeats, Simple Sequence Repeats, Variable Number of Tandem Repeats y Single Strand Length Polymorphisms) (Bruford y Wayne, 1993; Tautz y Renz, 1984) son pequeños segmentos de DNA distribuidos ampliamente en genomas eucarióticos (Tautz y Renz, 1984) donde se repiten de una a seis bases hasta 60 veces o más (Goldstein y Pollock, 1997). En eucariontes se pueden encontrar estas secuencias simples al menos cada 10 kb de la secuencia DNA y comprenden aproximadamente el 5% del genoma (Tautz, 1989).

La longitud de estos productos por lo general es de 50 a 300 nucleótidos, lo que permite observarlos en geles comunes de secuenciación y registrar incluso diferencias de un sólo nucleótido (Tautz, 1989). Una de las mayores ventajas de los análisis con microsatélites es que los alelos se registran de acuerdo a su peso molecular o tamaño (Palsboll *et al.*, 1997). Los microsatélites son excepcionalmente variables en el número de alelos (Nauta y Weissing, 1996), esto es debido a que la tasa de mutación en los *loci* de microsatélite es muy alta y parece variar entre 10^{-5} y 10^{-2} (Weber y Wong, 1993). Esta tasa de mutación junto con su fácil conteo hace que sean ampliamente usados en estudios de genética de poblaciones, relaciones de parentesco e identificación de individuos (Goldstein y Pollock, 1997).

3. OBJETIVOS:

Objetivo General:

- Determinar la estructura genética presente en poblaciones de *Tursiops truncatus* del sur del Golfo de México y el Caribe.

Objetivos Particulares:

- Obtener valores de diversidad, distancia y estructura genética en estas poblaciones por medio de microsatélites y mtDNA y compararlas con las de una población del Pacífico Mexicano (Sinaloa).
- Establecer una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica.
- Inferir los posibles procesos históricos que han dado como resultado los patrones de estructuración genética de las poblaciones analizadas.

4. MÉTODOS:

4.1 Extracción de DNA

Se extrajo DNA de 66 individuos procedentes de diferentes parques acuáticos y varamientos. Se emplearon diferentes técnicas de extracción dependiendo del modo de colecta y preservación de la muestra, dichas técnicas se describen en el Apéndice A. El número de identificación, localidad de origen, procedencia de la muestra, sexo del individuo y modo de preservación de cada muestra analizada en este trabajo se presenta en el Apéndice B.

4.2 Obtención de datos genéticos

4.2.1 Microsatélites

Se amplificaron por PCR los microsatélites nucleares: TexVet7 (Rooney, *et al.*, 1997), D08, D18 y D22 (Shinohara *et al.*, 1999), las condiciones para cada una de las reacciones de PCR se describen en Islas-Villanueva (2002).

La integridad de los productos obtenidos se verificó en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. El tamaño de los diferentes alelos se analizó en

geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6%, empleando marcadores fluorescentes (1/10 del oligonucleótido marcado en el total de la reacción) en un secuenciador automático ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER. Para determinar el tamaño de los microsatélites se empleó un marcador estándar interno (Genescan-500 ROX: Applied Biosystems) y el programa GENOTYPER 2.0 (http://www.biotech.uiuc.edu/frag_genotyper.htm).

Los resultados obtenidos se verificaron y extendieron a toda la muestra, corriendo los productos en geles de poliacrilamida desnaturizantes al 6% y visualizándolos por medio de tinción por plata como se indica en el Apéndice A.

4.2.2 DNA mitocondrial (mtDNA)

Se amplificó por PCR la región control de mtDNA con los primers L15824 y H16265 (Rosel *et al.*, 1999).

L15824 5'-CCTCACTCCTCCCTAAGACT-3'

H16265 5'-GCCCCGGTGCGAGAAGAGG-3'

La visualización de los fragmentos de la región control del mtDNA se llevó a cabo por SSCP's (Single Strand Conformation Polymorphisms), con el objeto de detectar de manera más rápida y sencilla los diferentes haplotipos; los productos

correspondientes a los haplotipos elegidos se secuenciaron en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas y verificadas se alinearon y corrigieron manualmente con el programa BIOEDIT 5.0.6 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>).

4.3 Análisis de datos

4.3.1. Diversidad genética en las poblaciones

4.3.1.1 Microsatélites

La diversidad genética en los cuatro *loci* de microsatélites se calculó con el programa GENETIX v 4.03 (<http://www.univ-montp2fr/~genetix/genetix/genetix.htm>), a través de las frecuencias alélicas por *locus*, número promedio de alelos por *locus* y los índices de heterocigosidad esperada (H_E) y heterocigosidad observada (H_O). A partir de los valores de H_E y H_O se probó si cada una de las poblaciones se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg con una probabilidad (p) del 95% de confianza para aceptar la hipótesis nula: "Las poblaciones se encuentren en equilibrio Hardy-Weinberg". Por último se obtuvo el coeficiente de endogamia (F_{IS}) con la siguiente fórmula:

$$F_{IS} = 1 - (H_O / H_E)$$

Posteriormente se emplearon todos los *loci* y todas las poblaciones para obtener los coeficientes F_{IS} y F_{IT} con los índices de Weir y Cockerham (1984) y Roberston y Hill (1984), la significancia de dichos índices se calculó con una prueba de bootstrap de 1000 repeticiones.

4.3.1.2 DNA mitocondrial (mtDNA)

Con el programa DNAsp (<http://www.ub.es/dnasp/> (Rozas y Rozas, 1995)), se estimó la diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (π) según Nei (1987). Se localizaron y cuantificaron los sitios informativos para parsimonia, sitios monomórficos, sitios polimórficos y mutaciones totales de todas las secuencias de *Tursiops truncatus* analizadas.

Los análisis de diversidad haplotípica, nucleotídica y el promedio de diferencias pareadas en cada una de las poblaciones con sus respectivas desviaciones estándar se estimaron con el programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 2000)

4.3.2. Estructura genética y divergencia entre poblaciones

4.3.2.1 Microsatélites

El coeficiente de estructura genética F_{ST} , la proporción de migrantes por generación N_m y la distancia genética D_X con el índice de Reynolds, Weir y Cockerham (1983) se obtuvieron por medio del programa GENETIX v 4.03 para cada par de poblaciones. A partir de los valores de D_X se obtuvo un árbol de neighbor-joining con el programa MEGA version 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) con el fin de representar gráficamente las distancias entre las poblaciones.

Se obtuvieron las distancias geográficas esféricas en kilómetros (km), entre todas las poblaciones analizadas, por medio de la fórmula de Haversine (Sinnot, 1984) que calcula la distancia más corta entre dos puntos a partir de las coordenadas geográficas de las localidades (<http://www.movable-type.co.uk/scripts/LatLong.html>). Posteriormente se graficaron los valores de distancia geográfica contra los valores de F_{ST} y se obtuvo el valor del coeficiente de correlación r entre ambos parámetros. La significancia del valor de r se analizó con $(n-2)$ grados de libertad, siendo n el número de datos analizados y un 95% de confianza (Rohlf y Solka, 1981).

La estructura genética de todas las poblaciones del Golfo de México y el Caribe, se obtuvo calculando F_{ST} con los índices de Weir y Cockerham (1984) y de

Robertson y Hill (1984). Cuando las poblaciones analizadas estén altamente estructuradas se recomienda emplear el índice *W&C* y el *R&H* cuando la diferenciación es moderada o baja disminuyendo el sesgo de los datos con una corrección de Raufaste *RH* (Raufaste y Bonhomme, 2000). Por último se realizó un análisis de bootstrap de 1000 repeticiones para cada uno de los índices con un intervalo de confianza del 95%.

4.3.2.2. DNA mitocondrial (mtDNA)

Las estimaciones del coeficiente de estructura genética (F_{ST}) global a partir de los promedios de las diferencias pareadas entre las secuencias de todas las poblaciones (Hudson *et al.* 1992), así como las comparaciones pareadas de la proporción de migrantes por generación N_m y la distancia genética D_{XY} se obtuvieron para cada una de las poblaciones analizadas (Puerto Rico, Bahamas, Cuba, Quintana Roo, Tabasco y Sinaloa) con el programa DNAsp 4.0. Posteriormente con la matriz de distancias genéticas (D_{XY}) entre poblaciones se realizó un árbol de neighbor-joining con el programa MEGA 2.1.

Los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones a partir de los promedios corregidos de las diferencias pareadas entre poblaciones y las frecuencias haplotípicas se obtuvieron con ARLEQUIN 2.0 junto con sus respectivos valores de confianza de (p) del 95%.

Se determinó de que manera está repartida la variación genética entre y dentro de las poblaciones con el análisis de varianza molecular (AMOVA) (Weir y Cockerham, 1984; Excoffier *et al.*, 1992, Weir, 1996) con el programa ARLEQUÍN 2.0 y a partir de este análisis se calculó el índice de fijación ϕ_{ST} (análogo de F_{ST}). Este índice analiza la varianza contenida entre todas las poblaciones del grupo analizado (σ_a^2) con respecto a la varianza total de la muestra (σ_t^2).

Se graficaron los valores pareados de F_{ST} y de ϕ_{ST} con los valores de distancia geográfica, se obtuvo el coeficiente de correlación r para cada análisis y se analizó su significancia con $(n-2)$ grados de libertad y un 95% de confianza.

Por último para apoyar los resultados de estructura genética y determinar si la estructura observada no es un artefacto del tamaño de muestra o producto del azar, se realizó la prueba exacta de diferenciación genética de Raymond y Rousset (1994) que supone como hipótesis nula que las poblaciones se encuentran en panmixia y obtiene un valor de confianza p por medio de una cadena de Markov de 10 000 repeticiones.

4.3.3 Relaciones entre haplotipos y poblaciones

A partir de la alineación de las secuencias de todos los individuos estudiados se obtuvieron los haplotipos diferentes con el programa COLLAPSE 1.2 (<http://darwin.uvigo.es>) y se incluyeron individuos de otra especie de delfínidos del *GenBank*. Los individuos secuenciados se muestran con las claves del Apéndice B y los individuos procedentes del *GenBank* presentan las siglas de su especie y su número de acceso: Nph, *Neophocaena phocaenoides*; Oor, *Orcinus orca*; Lob, *Lagenorhynchus obscurus*; Lal, *L. albirostris*; Lac, *L. acutus*, Dde, *Delphinus delphis*; Sco, *Stenella coeruleoalba*; Tad, *Tursiops aduncus* y Ttr, *Tursiops truncatus*.

Se determinó el modelo de sustitución bajo el cual evoluciona la región secuenciada con el programa MODELTEST 3.05 (Posada y Crandall, 1998) y se realizaron reconstrucciones filogenéticas con los criterios de máxima verosimilitud, estadística Bayesiana y máxima parsimonia

Se generó un árbol de máxima verosimilitud ingresando los parámetros de sustitución obtenidos con MODELTEST 3.05, realizando una búsqueda heurística de 1000 repeticiones y enraizando el árbol con *Neophocaena phocaenoides* (NphAY334100) como grupo externo en el programa PAUP 4.0 b10. En el programa Mr.Bayes 3 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) se corrieron 2 000 000 generaciones con una temperatura=0.1, burnin=100 000 y

NphAY334100 como grupo externo, se obtuvo el árbol consenso y la probabilidad posterior de las ramas que lo componen. El análisis de máxima parsimonia se realizó con una búsqueda heurística de 1000 réplicas y NphAY334100 como grupo externo en PAUP 4.0 para comparar con otro criterio evolutivo las relaciones entre las secuencias analizadas. Se escogió el árbol más parsimonioso y posteriormente se corrieron 1000 réplicas de bootstrap que se incorporaron a las ramas correspondientes.

Posteriormente se construyó una red de haplotipos con el programa TCS 1.18 (Clement *et al.*, 2000); el programa colapsa todas las secuencias en haplotipos y calcula las frecuencias de los mismos en la muestra. A partir de estos datos genera una matriz de distancia absoluta por medio del método de parsimonia estadística. El número de conexiones mutacionales obtenido con el programa se calcula a partir de las diferencias existentes en cada par de secuencias de toda la muestra hasta que se rebasa el 90 o 95% de probabilidad.

Con la red resultante se realizó el análisis de Clados Anidados (NCPA) con el método de Templeton (1998). El anidamiento comienza desde las puntas de la red de haplotipos y se mueve un paso mutacional hacia el interior de la misma conectando los haplotipos que están a un paso mutacional en un primer clado. Posteriormente anida todos los clados de primer nivel que estén unidos por un paso mutacional en un segundo clado y viceversa hasta que todos los clados están unidos en un sólo y último nivel.

Finalmente con el fin de establecer una relación entre los haplotipos y su distribución geográfica desde una perspectiva histórica se generó una matriz a partir del análisis de clados anidados (NCPA) que se analizó con el programa GeoDis 2.2 (Posada *et al.*, 2000) y los resultados obtenidos se interpretaron con la clave de inferencia de Templeton (2004).

5. RESULTADOS:

5.1 Distribución geográfica de la muestra

Se analizaron en total 61 individuos de seis localidades diferentes: Sinaloa (17), Tabasco (15), Veracruz (2), Quintana Roo (9), Cuba (16) y Puerto Rico (2) como se muestra en la Fig. 2. En los análisis poblacionales de mtDNA se incorporaron al estudio seis secuencias de individuos (*Tursiops truncatus*) provenientes de Bahamas obtenidas del *GenBank*.

Se calculó la distancia geográfica esférica entre cada par de poblaciones (Tabla 1) analizadas a partir de las coordenadas geográficas de cada una de las localidades con la fórmula de Haversine (Sinnot, 1984).

Tabla 1. Distancia geográfica esférica. Se muestran las coordenadas geográficas de cada población y la distancia en km que las separa.

| | PuertoRico | Bahamas | Cuba | QuintanaRoo | TabascoVer | Sinaloa |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Coordenadas geográficas | 18 15 10 N 066 04 60 W | 24 15 00 N 076 00 00 W | 22 31 20 N 079 28 20 W | 21 09 04 N 087 13 66 W | 18 26 00 N 093 10 00 W | 27 02 00 N 109 28 00 W |
| Puerto Rico | | | | | | |
| Bahamas | 1224 km | | | | | |
| Cuba | 1499 km | 403 | | | | |
| Quintana Roo | 2236 km | 1202 km | 815.5 | | | |
| TabascoVer | 3083 km | 2094 km | 1663 km | 847.4 km | | |
| Sinaloa | 4535 km | 3359 km | 3042 km | 2346 km | 1923 km | |



Figura 2. Distribución geográfica de la muestra. Se presentan las localidades muestreadas y el número de individuos analizados por población. Sinaloa (17), Veracruz (2), Tabasco (15), Quintana Roo (9), Cuba (16) y Puerto Rico (2).

5.2 Obtención de datos

5.2.1 Microsatélites

Se analizaron cuatro *loci* de microsatélites para 54 individuos provenientes de cuatro poblaciones diferentes: tres del Golfo de México-Caribe y una del Pacífico Mexicano (Sinaloa) para comparar. El tamaño de cada alelo se determinó por medio del programa GENOTYPER 2.0 a partir de la fluorescencia emitida por los productos de PCR como se muestra en los gráficos de la Fig. 3.

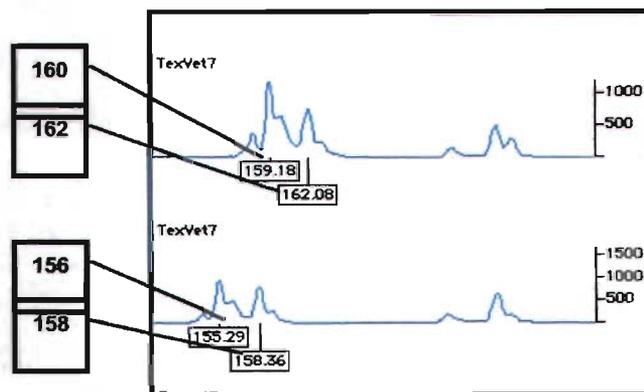


Figura 3. Locus TexVet7. Se muestra la lectura de los picos fluorescentes correspondientes a los tamaños de los alelos y sus respectivos tamaños.

Una vez obtenidos los tamaños de todos los alelos diferentes se emplearon algunos individuos analizados con GENOTYPER 2.0 como referencia de tamaño y se compararon con el resto de los individuos de la población en geles de poliacrilamida 6% teñidos con nitrato de plata como se muestra en la Fig. 4.

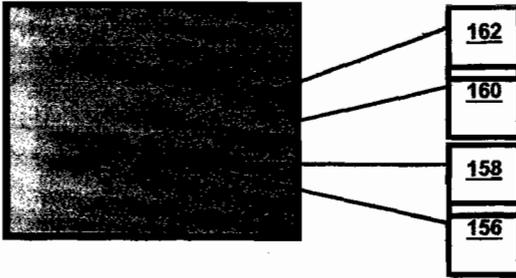


Figura 4. *Locus TexVet*. Se muestran los alelos de ocho individuos diferentes en un gel de poliacrilamida anteriormente analizados con el secuenciador y su tamaño correspondiente.

5.2.2 DNA mitocondrial (mtDNA)

La región control amplificada se visualizó por medio de los marcadores SSCP's (Fig. 5). Estos marcadores presentan algunas limitaciones en cuanto al número de posibles patrones de configuración lo que da como resultado que en algunos casos patrones de bandeo muy similares o iguales provengan de secuencias diferentes. Diversos artículos mencionan que la sensibilidad de estos marcadores disminuye proporcionalmente con la longitud de la secuencia (Sheffield *et al.*, 1993), por esta razón se secuenciaron algunos individuos que presentaron los mismos patrones de migración para confirmar que los haplotipos que presentan los mismos patrones de SSCP's dentro de cada una de las poblaciones presentan la misma secuencia.

Los individuos elegidos se secuenciaron en ambas direcciones, confirmando la presencia de cada nucleótido del electroferograma en ambas direcciones de la

secuencia. Las secuencias corregidas resultantes se alinearon con el programa BIOEDIT 5.0.6.

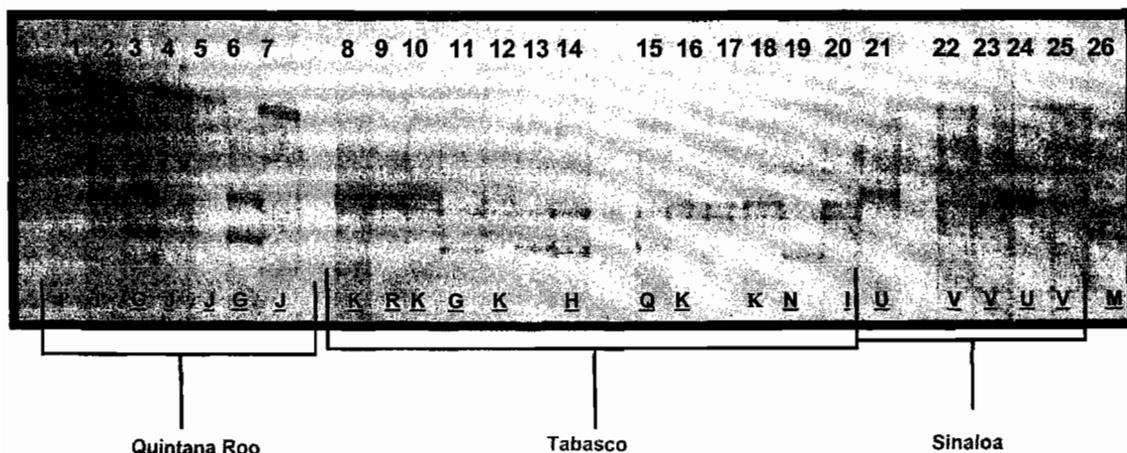


Figura 5. SSCP's de la región control del mtDNA de poblaciones de *Tursiops truncatus*. Se muestran los diferentes haplotipos determinados por SSCP's y secuenciación en Quintana Roo, Tabasco y Sinaloa. Los diferentes haplotipos se denominan con diferentes letras.

Posteriormente todas las secuencias corregidas se alinearon junto con secuencias tomadas del *GenBank*. Se incluyeron individuos de *Tursiops truncatus* (Ttr) de las siguientes localidades: Bahamas (5), Mar del Norte (1) y China (3). Las secuencias de Bahamas se incluyeron en los análisis comparativos poblacionales y las del Mar del Norte y China en las genealogías de la región control.

5.3 Diversidad genética

5.3.1 Microsatélites

Se analizaron 55 individuos provenientes de las poblaciones del grupo Golfo de México-Caribe (Cuba, Quintana Roo y Tabasco) y de Sinaloa. En el *locus* D08 se encontraron siete alelos en total, seis de ellos presentes en el grupo Golfo de México-Caribe (alelo 109 ausente) con valores de heterocigosidad observada (H_o) que van de 0.2222 en Cuba a 0.7778 en Quintana Roo, mientras que en la población de Sinaloa sólo encontramos los cuatro alelos de mayor tamaño (107, 109, 111 y 113) y una $H_o = 0.5294$ (Apéndice C).

En el *locus* TexVet 7 encontramos cinco alelos en el Golfo de México-Caribe y valores de H_o que van de 0.7500 en Cuba a 0.8182 en Tabasco, mientras que en Sinaloa se presentaron únicamente dos alelos (158 y 162) y obtuvimos una $H_o = 0.2941$ (Apéndice C).

En el *locus* D18 encontramos siete alelos en el Golfo de México-Caribe y los valores de H_o más altos de los cuatro microsatélites analizados, que van de 0.75 en Cuba a 1.0 en Tabasco. En Sinaloa se presentan seis alelos y también el valor más alto en esta población de $H_o = 0.9412$ (Apéndice C).

En el *locus* D22 encontramos ocho alelos en el Golfo de México-Caribe y valores de H_O de 0.6667 en Tabasco a 0.8889 en Cuba, mientras que en Sinaloa se presentan únicamente cinco alelos y una $H_O = 0.7273$ (Apéndice C).

En la Tabla 2 podemos observar los resultados del análisis con los datos de los cuatro *loci* juntos. Se observa que Tabasco presenta el mayor número promedio de alelos por *locus* (5.20), seguido por Cuba y Quintana Roo (4.75) y Sinaloa presenta el menor (4.25). Las cuatro poblaciones presentan valores de heterocigosidad promedio observada y esperada muy similares entre sí, lo que indica que las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg como lo confirman los valores tan altos de p . Los valores negativos de F_{IS} nos sugieren que en todas las poblaciones hay un exceso de heterocigotos.

Tabla 2. Heterocigosidad promedio y prueba de equilibrio Hardy-Weinberg con todos los *loci*.

| LOCALIDAD | H_E | H_O | $p(0.95)$ H-W | F_{IS} $1-(H_O/H_E)$ | Número promedio de alelos por <i>locus</i> |
|--------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------------|---|
| Cuba | 0.6284 (+0.2341) | 0.6528 (+0.2944) | 1.00 | -0.0388 | 4.75 |
| Quintana Roo | 0.6654 (+0.1187) | 0.7951 (+0.0548) | 1.00 | -0.1949 | 4.75 |
| Tabasco | 0.7020 (+0.0602) | 0.7962 (+0.1506) | 1.00 | -0.1342 | 5.25 |
| Sinaloa | 0.6017 (+0.1109) | 0.6230 (+0.2763) | 1.00 | -0.0354 | 4.25 |

Al evaluar la significancia de los índices de fijación (F_{IS}) y (F_{IT}) con el índice de Weir y Cockerham (1984) en las poblaciones del Golfo de México-Caribe (Tabla 3), se observa que los valores obtenidos para ambos son negativos y que se encuentran dentro del intervalo de valores de bootstrap, este resultado indica

que ambos índices no son estadísticamente diferentes de cero, por lo tanto no hay exceso de heterocigotos significativo ni dentro de cada una de las poblaciones ni para todas ellas.

Tabla 3. F_{IS} , y F_{IT} para todas las poblaciones del Golfo de México-Caribe.

| Indices | W&C | bootstrap |
|----------|--------|----------------------|
| F_{IS} | -0.050 | (-0.20649 - 0.05916) |
| F_{IT} | -0.013 | (-0.15579 - 0.10932) |

5.3.2 DNA mitocondrial (mtDNA)

A partir de la matriz generada con la alineación de las secuencias de *Tursiops truncatus* se obtuvieron los haplotipos diferentes con el programa COLLAPSE

1.2. Los haplotipos designados para cada individuo de todas las poblaciones incluidas en nuestro estudio junto con los números de acceso de los individuos de Bahamas (Ba y BaNE) obtenidos del *GenBank*, el código de identificación de los individuos secuenciados en este estudio y el total de individuos que presentaron cada haplotipo se muestran en la Tabla 4. Los individuos secuenciados se denominaron con dos iniciales de su localidad de origen (Cuba Cu, Quintana Roo QR, Tabasco Ta, Veracruz Ve y Sinaloa SI) y dos dígitos.

Tabla 4. Haplotipos presentes en las poblaciones de *Tursiops truncatus* analizadas.

| Secuencia | Haplotipo | Individuos | Total |
|------------------|------------------|--|--------------|
| AF155162Ba | A | CU02, CU03, CU04, CU05, CU06, CU08, CU09, CU10, CU49, CU52, CU53 | 12 |
| AF378178Ba | B | | 1 |
| AF155160Ba | C | | 1 |
| AF155161Ba | D | | 1 |
| AF378176Ba | E | | 1 |
| AF378177BaNE | F | PR02, QR08, | 3 |
| Ta04 | G | QR06, QR03, | 3 |
| Ta07 | H | | 1 |
| Cu01 | I | CU07, TA14, VE01 | 4 |
| QR07 | J | QR04, QR05 | 3 |
| Ta01 | K | TA09, TA15, TA03, TA05, TA10 | 6 |
| Ta17 | L | | 1 |
| PR01 | M | | 1 |
| Ta11 | N | | 1 |
| Ve02 | O | | 1 |
| QR02 | P | QR01 | 2 |
| Ta08 | Q | | 1 |
| Ta02 | R | | 1 |
| Ta06 | S | | 1 |
| Cu00 | T | | 1 |
| SI18 | U | SI13, SI12 | 3 |
| SI19 | V | S10, S11 | 3 |

Los haplotipos compartidos entre localidades y los porcentajes de cada haplotipo en cada localidad se muestran en el Apéndice D y en la figura 5. Se agruparon las únicas dos muestras de Veracruz en la población de Tabasco (Tabasco-Ver) debido a su cercanía, mientras que los únicos dos individuos secuenciados de Puerto Rico se mantuvieron como una sola población por su lejanía geográfica con el resto de las poblaciones analizadas.



Figura 5. Distribución geográfica de los haplotipos de mtDNA. Se muestran los gráficos de pie que representan los porcentajes de los haplotipos encontrados en cada localidad. En la tabla se muestra el color correspondiente a cada haplotipo.

En el análisis total de las 52 secuencias de la región control del mtDNA, tanto de este trabajo como obtenidas del *GenBank*, se alinearon 332 sitios a partir de los cuales se obtuvieron 40 sitios variables (12%), 42 mutaciones totales y 22

haplotipos diferentes. En la Tabla 5 se muestran entre paréntesis los valores de varianza de cada uno de los índices estimados y debajo de estos sus valores de desviación estándar.

Tabla 5. Diversidad genética y polimorfismos de las secuencias de mtDNA.

| Sitios excluyendo gaps (3gaps) | Sitios Monomórficos | Sitios Polimórficos | Mutaciones Totales | Sitios Informativos Parsimonia | Haplotipos Diferentes | Diversidad Haplotípica (H_D) | Diversidad Nucleotídica (π) |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--|
| 329 | 288 | 40 | 42 | 32 | 22 | 0.922 (0.00053) D.E.=0.023 | 0.01786 (0.0000035) D.E.=0.00187 |

Los valores de diversidad genética por población y sus respectivas desviaciones estándar se muestran en la Tabla 6. La mayor diversidad haplotípica se presenta en Bahamas y Puerto Rico, esto es debido a que todos los haplotipos de la población son diferentes. En el caso de Bahamas deliberadamente se escogieron seis haplotipos diferentes, por lo que este valor no es un reflejo de las condiciones reales de la población. En el caso de Puerto Rico únicamente se secuenciaron dos individuos que resultaron ser diferentes por lo que tampoco nos indica la diversidad haplotípica real de la población. Tabasco y Quintana Roo presentaron también diversidades haplotípicas (H_D) altas (0.8476 y 0.8214 respectivamente) y Cuba la más baja 0.3846. La diversidad nucleotídica (π) en las poblaciones del Golfo de México-Caribe osciló entre 0.013253 en Bahamas y 0.055830 en Quintana Roo.

Podemos observar que los valores de la población de Sinaloa con ambos índices de diversidad genética son menores a los valores de cualquiera de las

poblaciones del Golfo de México-Caribe y que el promedio de las diferencias pareadas es muy pequeño (menor a uno) lo que nos sugiere que los dos haplotipos presentes en Sinaloa son casi idénticos.

Tabla 6. Diversidad genética de mtDNA en cada una de las poblaciones.

| Poblaciones | Bahamas | Cuba | Puerto Rico | Quintana Roo | TabascoVer | Sinaloa |
|--|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Número de Haplotipos/ Tamaño muestra(N) | 6/6 | 3/14 | 2/2 | 4/8 | 9/15 | 2/6 |
| Diversidad Haplotípica (H_D) | 1.0000 +/-0.0962 | 0.3846 +/-0.1494 | 1.0000 +/-0.500 | 0.8214 +/-0.1007 | 0.8476 +/-0.0878 | 0.6000 +/-0.1291 |
| Diversidad Nucleotídica (π) | 0.013253 +/-0.008785 | 0.014475 +/-0.008445 | 0.039157 +/-0.040635 | 0.055830 +/-0.031619 | 0.015433 +/-0.008886 | 0.001818 +/-0.001917 |
| Promedios de Diferencias Pareadas | 4.400000 +/-2.525866 | 4.791209 +/-2.490056 | 13.000000 +/-9.539392 | 18.535715 +/-9.215365 | 5.123809 +/-2.631100 | 0.600000 +/-0.547723 |

5.4 Estructura genética y divergencia entre las poblaciones

5.4.1 Microsatélites

La mayor estructura genética (valores mayores de F_{ST}) se presenta entre las poblaciones del grupo Golfo de México-Caribe y la población de Sinaloa con valores que van desde 0.21209 hasta 0.25815, como es de esperarse por el aislamiento geográfico de las mismas. Dentro del grupo Golfo de México-Caribe la mayor estructura genética se observa entre Cuba y Tabasco con una $F_{ST} =$

0.03548 y la menor entre Quintana Roo y Tabasco con una $F_{ST} = 0.02965$ y con un alto flujo génico, de 6.8 a 8.18 migrantes por generación entre poblaciones.

Tabla 7. Se muestran los valores del coeficiente de estructura genética (F_{ST}) por debajo de la diagonal y de la proporción de migrantes por generación (N_m) en la diagonal superior. Los tamaños de muestra (N) se indican debajo de cada localidad.

| | Cuba | Q. Roo | Tabasco | Sinaloa |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| (N) | 18 | 9 | 10 | 17 |
| Cuba | 0 | 7.17 | 6.80 | 0.72 |
| Q. Roo | 0.03369 | 0 | 8.18 | 0.74 |
| Tabasco | 0.03548 | 0.02965 | 0 | 0.93 |
| Sinaloa | 0.25815 | 0.25301 | 0.21209 | 0 |

Se graficaron los valores de distancia geográfica contra los valores de estructura genética (F_{ST}) dentro de las poblaciones del Golfo de México y el Caribe como se muestra en la Fig. 8. El factor de correlación obtenido para ambos parámetros fue $r = 0.71213$ que resultó ser no significativo para el conjunto de datos analizado, lo que sugiere que no se puede comprobar un aislamiento por distancia con el conjunto de datos analizados en los marcadores nucleares.

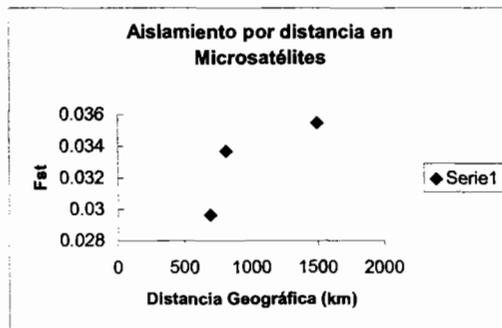


Figura 8. Aislamiento por distancia en el Golfo de México y el Caribe. Se muestran los valores de F_{ST} para los microsatélites y su correlación con la distancia geográfica entre las poblaciones.

Por último se evaluó la estructura genética entre todas las poblaciones del Golfo de México-Caribe, se presentan los valores de F_{ST} con los índices $W\&C$, $R\&H$ y RH' y su correspondiente intervalo de bootstrap en la Tabla 9. El valor de F_{ST} con RH es significativamente diferente de cero pero ya que la estructura genética observada es baja se recomienda considerar el valor corregido (RH') que es un poco más alto $RH'=0.081$, lo que nos indica que hay una ligera estructura genética entre las poblaciones del Golfo de México-Caribe con marcadores nucleares, mantenido por un alto flujo genético.

Tabla 9. F_{ST} para todas las poblaciones del Golfo de México-Caribe.

| Indices | $W\&C$ | RH | RH' | bootstrap |
|----------|--------|-------|-------|----------------------|
| F_{ST} | 0.035 | | | (0.00510 - 0.09019) |
| F_{ST} | | 0.025 | | (0.00135 - 0.01068) |
| F_{ST} | | | 0.081 | |

La divergencia entre las poblaciones calculada a través del índice de distancia genética (D) de Reynolds *et al.* (1983) se muestra en la Tabla 8. Nuevamente se observa la mayor distancia genética entre todas las poblaciones del grupo Golfo de México-Caribe y la población de Sinaloa, mientras que dentro del grupo Golfo de México-Caribe se presenta igualmente la mayor distancia genética entre Cuba y Tabasco y la menor entre Quintana Roo y Tabasco aunque con diferencias mínimas.

Tabla 8. Distancia genética entre pares de poblaciones.

| | Cuba | Q. Roo | Tabasco | Sinaloa |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| (N) | 18 | 9 | 10 | 17 |
| Cuba | 0 | | | |
| Q. Roo | 0.03427 | 0 | | |
| Tabasco | 0.03612 | 0.03010 | 0 | |
| Sinaloa | 0.29861 | 0.29171 | 0.23837 | 0 |

El árbol de distancia por el método de neighbor-joining muestra la gran distancia entre Sinaloa y el grupo Golfo de México-Caribe así como distancias muy pequeñas dentro del grupo, aunque se muestra una relación más cercana entre Cuba y Quintana Roo que entre Tabasco y Quintana Roo (Fig. 9) a diferencia de lo que muestran los resultados pareados de F_{ST} y D_{XY} .

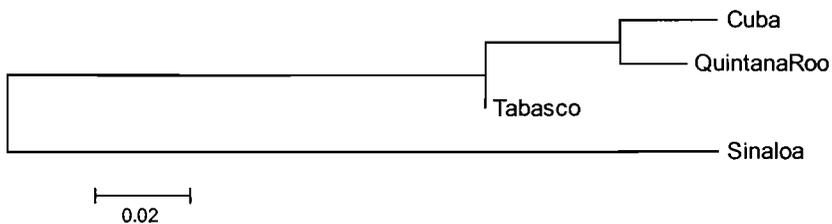


Figura 9. Árbol de distancia genética entre poblaciones realizado con neighbor-joining a partir de la matriz de distancias D de Reynolds.

5.4.2 DNA mitocondrial (mtDNA)

La F_{ST} global obtenida con DNAsp para las poblaciones del Golfo de México y Caribe (Bahamas, Cuba, Puerto Rico, Quintana Roo y Tabasco-Veracruz) fue de 0.27578 con una proporción de migrantes por generación de $N_m = 1.31$. Los valores de F_{ST} pareados entre poblaciones obtenidos con ARLEQUÍN 2.0 se muestran en la Tabla 10, se muestran en negritas los que obtuvieron un valor de $p < 0.5$ y por lo tanto son significativos. Se observa que las poblaciones con tamaños de muestra menores como Puerto Rico (2) y Bahamas (6) presentan valores no significativos en sus comparaciones pareadas. Dentro del grupo

Golfo de México-Caribe observamos que la menor estructura genética se presenta entre Quintana Roo-TabascoVer seguida de Bahamas-Cuba y la mayor estructura genética se encuentra entre Cuba-Quintana Roo, seguida de Cuba-TabascoVer por una diferencia mínima. Los valores presentes entre las poblaciones del grupo Golfo de México-Caribe y Sinaloa son muy parecidos e incluso menores en algunas ocasiones, esto nos sugiere que la estructura genética con mtDNA entre las poblaciones del sur del Golfo de México y el Caribe es bastante marcada.

Tabla 10. Coeficiente de estructura genética F_{ST} en todas las poblaciones analizadas, se muestran en negritas los valores que resultaron significativos.

| | Bahamas | Cuba | Puerto Rico | Quintana Roo | TabascoVer | Sinaloa |
|------------------|----------------|----------------|-------------|----------------|----------------|---------|
| Bahamas (6) | 0 | | | | | |
| Cuba (14) | 0.17674 | 0 | | | | |
| Puerto Rico (2) | -0.08333 | 0.30769 | 0 | | | |
| Quintana Roo (8) | 0.06845 | 0.39698 | 0.02679 | 0 | | |
| TabascoVer (15) | 0.07619 | 0.36484 | 0.07619 | 0.14881 | 0 | |
| Sinaloa (6) | 0.2000 | 0.50769 | 0.20000 | 0.28929 | 0.27619 | 0 |

Al correlacionar el coeficiente de estructura genética F_{ST} con la distancia geográfica únicamente entre los pares de poblaciones del grupo Golfo de México-Caribe (Bahamas, Cuba, Puerto Rico, Quintana Roo y TabascoVer) se obtuvo la gráfica de la Fig. 10. El coeficiente de correlación (r) entre ambos parámetros fue $r = -0.29152$ incluyendo todos los datos de la Tabla 10 y $r = 0.56067$ únicamente con los valores de F_{ST} significativos, ambos coeficientes resultaron ser no son significativos para este conjunto de datos.

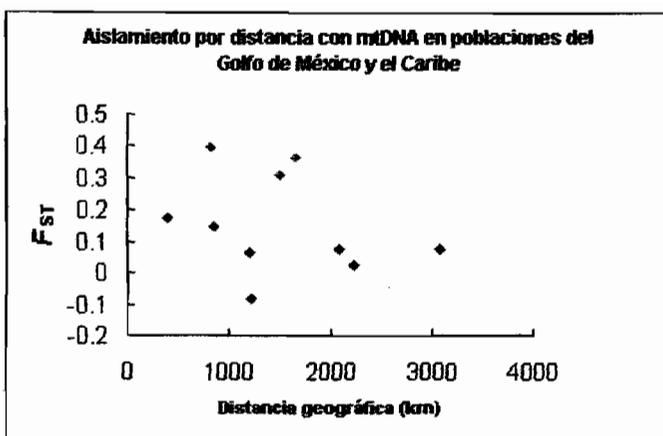


Figura 10. Se muestra la relación entre la distancia geográfica (km) y los coeficientes de estructura genética F_{ST} en las poblaciones del Golfo de México y el Caribe con mtDNA. Los puntos que corresponden a los valores significativos se señalan en rosa.

El análisis de AMOVA realizado con ARLEQUIN 2.0 para las poblaciones del Golfo de México y el Caribe, reveló que el 25% de la variación genética se encuentra entre las poblaciones y el 74% dentro de ellas como se muestra en la Tabla 11. El índice de fijación obtenido a partir de este análisis fue $\phi_{ST} = 0.25612$ con valores de $p = 0$, muy parecido a la $F_{ST} = 0.27578$ global obtenida con DNAsp.

Tabla 11. Análisis de varianza molecular.

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Varianza | Porcentaje |
|-----------------------|-------------------|------------|------------|
| Entre poblaciones | 5.536 | 0.12316 Va | 25.61 |
| Dentro de poblaciones | 14.308 | 0.35771 Vb | 74.39 |
| Total | 19.844 | 0.48087 | |

Los resultados de las comparaciones pareadas de ϕ_{ST} en todas las poblaciones analizadas se muestran en la Tabla 12, los valores de ϕ_{ST} que presentaron valores de $p < 0.05$ son significativos y se muestran en negritas, observamos nuevamente que la menor estructura genética dentro del grupo Golfo de México-Caribe se presenta entre Quintana Roo-TabascoVer seguida de Bahamas-Cuba y la mayor estructura genética entre Quintana Roo-Cuba y TabascoVer-Cuba. De igual modo podemos observar que los valores son bastante altos comparados con los del grupo Golfo de México-Caribe y Sinaloa.

Tabla 12. Coeficiente de estructura genética (ϕ_{ST}) entre todas las poblaciones analizadas. Los valores significativos se muestran en negritas.

| | Bahamas | Cuba | PuertoRico | QuintanaRoo | TabascoVer | Sinaloa |
|-------------|----------------|----------------|------------|----------------|----------------|---------|
| (N) | 6 | 14 | 2 | 8 | 15 | 6 |
| Bahamas | 0 | | | | | |
| Cuba | 0.27210 | 0 | | | | |
| PuertoRico | -0.09091 | 0.51163 | 0 | | | |
| QuintanaRoo | 0.07485 | 0.43228 | 0.07097 | 0 | | |
| TabascoVer | 0.08664 | 0.36797 | 0.11495 | 0.14997 | 0 | |
| Sinaloa | 0.20000 | 0.53846 | 0.29412 | 0.28051 | 0.25168 | 0 |

La correlación entre la distancia geográfica y el índice de fijación ϕ_{ST} de las poblaciones del sur del Golfo de México y el Caribe se muestra en la Fig. 11., el coeficiente de correlación obtenido para todo el conjunto de datos fue $r = -0.26343$ y únicamente para los datos significativos de la Tabla 12 fue $r = 0.52743$, ambos coeficientes resultaron ser no significativos.

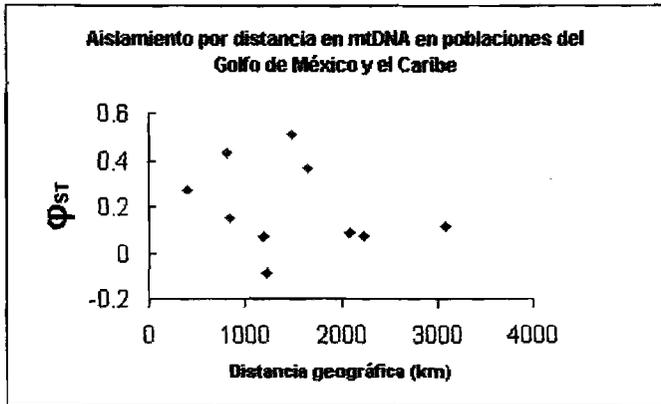


Figura 11. Se muestra la relación entre la distancia geográfica (km) y los coeficientes de estructura genética Φ_{ST} en las poblaciones del Golfo de México y el Caribe con mtDNA. Los puntos que corresponden a los valores significativos se señalan en rosa.

Los valores de $p < 0.05$ de la prueba exacta de diferenciación genética se muestran en negritas, los valores significativos indican que en las poblaciones se presentan restricciones al flujo genético en cierto nivel como se observa con los datos de F_{ST} y Φ_{ST} , que no son productos del azar o de una deficiencia en el muestreo, de nuevo observamos que el tamaño de muestra de Puerto Rico y Bahamas no es suficiente para sacar datos concluyentes en la mayoría de sus comparaciones.

Tabla 11. Prueba exacta de diferenciación genética

| | Bahamas | Cuba | PuertoRico | QuintanaRoo | TabascoVer | Sinaloa |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| Bahamas (6) | | | | | | |
| Cuba (14) | 0.00650 +-0.0026 | | | | | |
| Puerto Rico (2) | 1.00000 +-0.00000 | 0.01970 +-0.048 | | | | |
| Quintana Roo (8) | 0.11275 +-0.0132 | 0.00000 +-0.0000 | 0.06665 +-0.0047 | | | |
| TabascoVer (15) | 0.01220 +-0.0063 | 0.00000 +-0.0000 | 0.25890 +-0.0211 | 0.00230 +-0.0014 | | |
| Sinaloa (6) | 0.0434 +-0.0063 | 0.00000 +-0.0000 | 0.03565 +-0.0023 | 0.00065 +-0.0005 | 0.00005 +-0.0001 | |

Los valores de D_{XY} de las comparaciones pareadas entre las poblaciones de *Tursiops truncatus* analizadas se muestran en la Tabla 12, debajo de la diagonal se muestra entre paréntesis el número promedio de diferencias pareadas y también se muestran las diferencias fijas (apomorfías) entre poblaciones. En la diagonal superior se muestra el valor de D_{XY} corregido con el algoritmo de Jukes-Cantor. Se observa que los valores abarcan un intervalo que va de 0.00905 a 0.03002, es decir un porcentaje de divergencia entre poblaciones mínimo del 0.9% entre Bahamas-Cuba y máximo del 3% entre Cuba-Q. Roo. Los valores de distancia genética entre las poblaciones del Golfo de México-Caribe (Bahamas, Cuba, Quintana Roo y Tabasco) y el Pacífico mexicano (Sinaloa) contrario a lo esperado son muy parecidas a las existentes entre las poblaciones del Golfo de México-Caribe e incluso menores pero Sinaloa presenta de dos a tres apomorfías en cada comparación.

Tabla 12. Distancia genética entre las poblaciones.

| | Bahamas | Cuba | Puerto Rico | Quintana Roo | TabascoVer | Sinaloa |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|
| Bahamas (6) | | 0.00905 | 0.02788 | 0.03074 | 0.01286 | 0.02153 |
| Cuba (14) | 0.00905(2.97) dif. Fij. 0 | | 0.02793 | 0.02966 | 0.01256 | 0.01736 |
| Puerto Rico (2) | 0.02727(9) dif.fij. 0 | 0.02736 dif.fij. 1 | | 0.02798 | 0.02516 | 0.02465 |
| Quintana Roo (8) | 0.03002(9.87) dif.fij. 0 | 0.02898(9.5) dif.fij. 0 | 0.02736(9) dif.fij. 0 | | 0.02881 | 0.02789 |
| TabascoVer (15) | 0.01271(4.2) dif. Fij. 0 | 0.01239(4.07) dif.fij. 0 | 0.02462(8.12) dif. Fij. 0 | 0.02814(9.25) dif.fij. 0 | | 0.02231 |
| Sinaloa (6) | 0.02121(7) dif.fij. 3 | 0.01715(5.64) dif. Fij. 2 | 0.02424(8) dif.fij.2 | 0.02736(9) dif.fij.3 | 0.02197(7.25) dif. Fij. 3 | |

El árbol de neighbor-joining a partir de los datos de distancia genética entre las poblaciones (Fig. 12), enraizando con Sinaloa muestra que el Golfo de México-Caribe se divide en dos grupos principales, uno formado por Puerto Rico y Quintana Roo que se muestra muy alejado del resto de las poblaciones y otro formado por Bahamas, Cuba y TabascoVer un poco más cercanos entre sí.

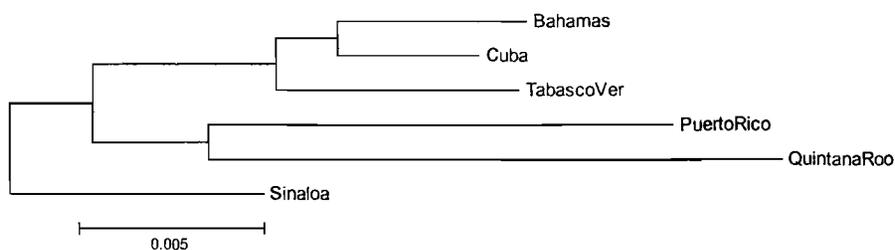


Figura 12. Árbol de distancia genética entre poblaciones realizado con neighbor-joining a partir de la matriz de distancias corregidas.

5.5 Relaciones entre haplotipos

El modelo seleccionado por MODELTEST 3.5 fue HKY+I+G (Hasegawa *et al.*, 1985), con una proporción de transiciones/transversiones = 6.5958, valor del parámetro gamma (G) = 2.3097 y una proporción de sitios invariables (I) = 0.4353.

En las Figs. 13 y 14 se muestran los filogramas resultantes de los análisis de máxima verosimilitud y estadística Bayesiana. En ambas reconstrucciones se observa al grupo de los delfínidos como un grupo monofilético, dentro de este grupo *L. obscurus* es monofilético, pero parafilético con respecto a sus congéneres *L. albirostris* y *L. acutus* y muy cercanos a *O. orca*.

La especie analizada *Tursiops truncatus* se observa monofilética en ambas reconstrucciones pero con una probabilidad posterior de 0.59 en el análisis Bayesiano. La rama que sostiene a *T. truncatus* junto con su grupo hermano presenta una probabilidad posterior bastante alta de 0.83 y dentro del grupo hermano que comprende a *Tursiops aduncus*, también monofilético y hermano de un clado comprendido por *D. delphis* y *S. coeruleoalba*, encontramos las probabilidades posteriores más altas del análisis (0.82-0.99).

Dentro de *T. truncatus*, observamos que el haplotipo más antiguo parece ser el del Mar del Norte en ambas reconstrucciones, en el análisis de máxima verosimilitud hay una divergencia que agrupa por un lado a haplotipos del Caribe: Quintana Roo y Cuba y por otro a un haplotipo de Puerto Rico con dos del Pacífico (China), mientras que con estadística Bayesiana se observa al grupo de Quintana Roo-Cuba con una probabilidad posterior de 0.70 aislado de otro grupo que presenta en relaciones no definidas a haplotipos del Pacífico (China y Sinaloa) y a un grupo formado por Puerto Rico y China. Por último en ambas reconstrucciones se observa un nodo que agrupa a dos grandes grupos de aparente origen reciente que presenta una probabilidad posterior bastante alta (0.87), un grupo comprende a Bahamas, Cuba y Tabasco y el otro a Bahamas, Tabasco y Veracruz en su mayoría. Ambos grupos poseen ramas cortas no resueltas.

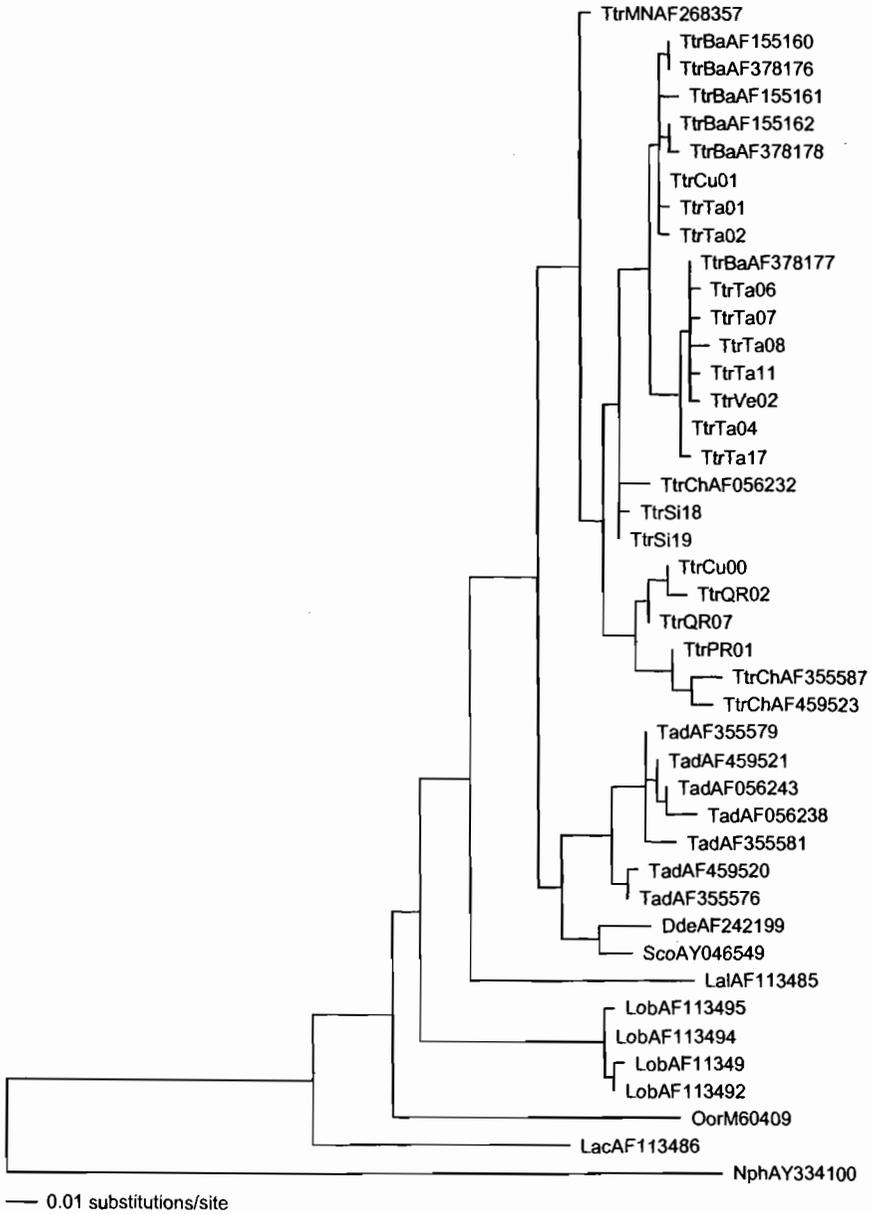


Figura 13. Filograma de máxima verosimilitud con el modelo HKY+I+G. Se realizaron 1000 réplicas de una búsqueda heurística, enraizando con NphAY334100 como grupo externo.

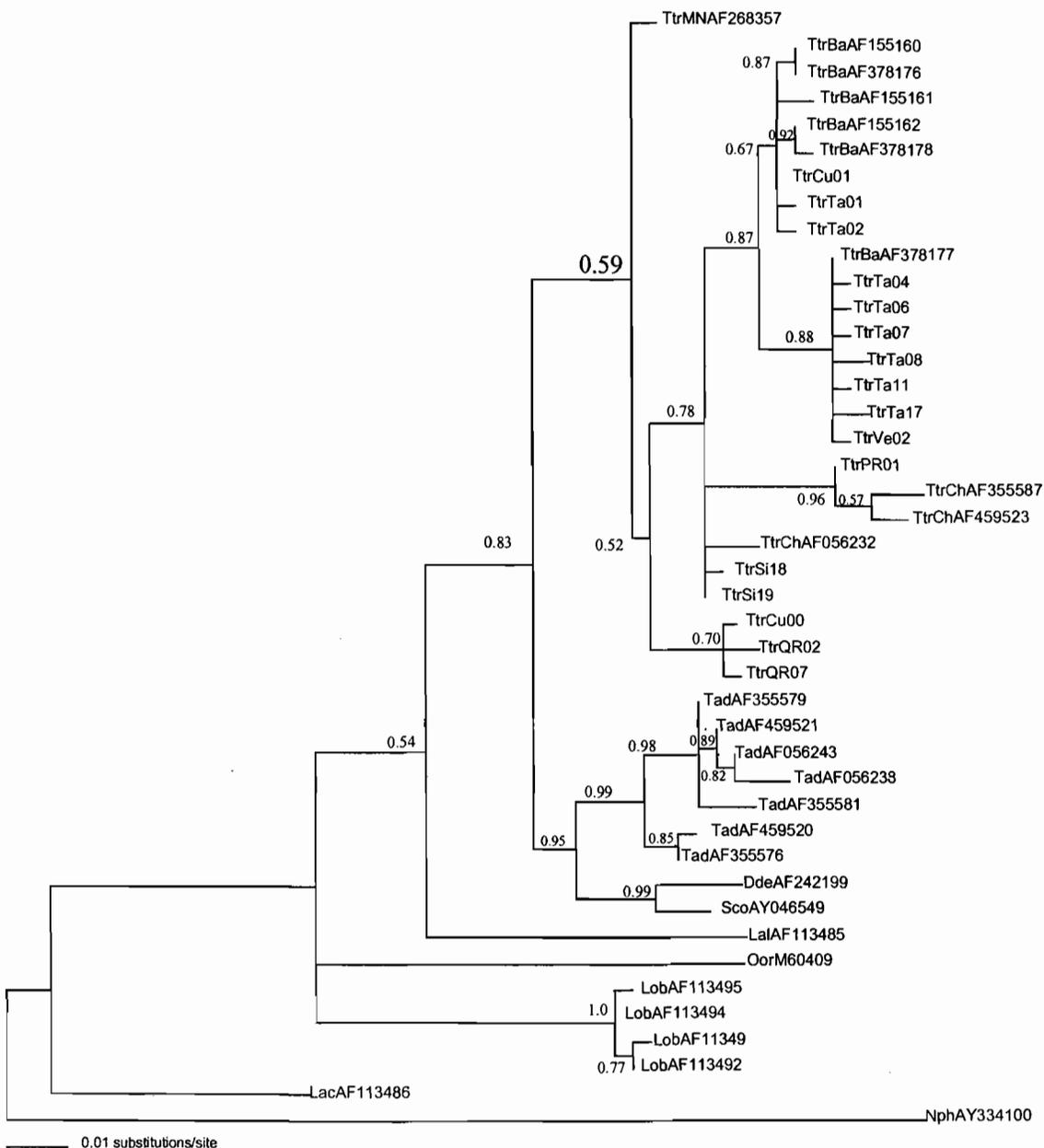


Figura 14. Filograma consenso realizado con MrBayes. Se definió a *NphAY334100* como grupo externo, se corrieron 2 000 000 de generaciones con una $Temp=0.1$. Se muestra la probabilidad posterior consenso de algunas de las ramas.

En el análisis de máxima parsimonia (Fig. 15) se observa de nuevo la parafilia del género *Lagenorhynchus*. Los delfinidos no se muestran como un grupo monofilético y el nodo que contiene a *T. truncatus* y *T. aduncus* presenta un bootstrap de 78. Se observa a *T. aduncus* como un grupo monofilético bien soportado (bootstrap 73) y a *T. truncatus* como un grupo monofilético bien soportado (bootstrap 70) hermano de *D. delphis* y *S. coeruleoalba*. Dentro de *T. truncatus* se observan dos grandes grupos uno que incluye a los grupos que en los análisis anteriores se mostraban más antiguos (Mar del Norte, Cuba-Quintana Roo, Puerto Rico-China y Sinaloa-China) y otro que incluye a los dos grupos de origen reciente Bahamas-Cuba-Tabasco y Bahamas-Tabasco-Veracruz.

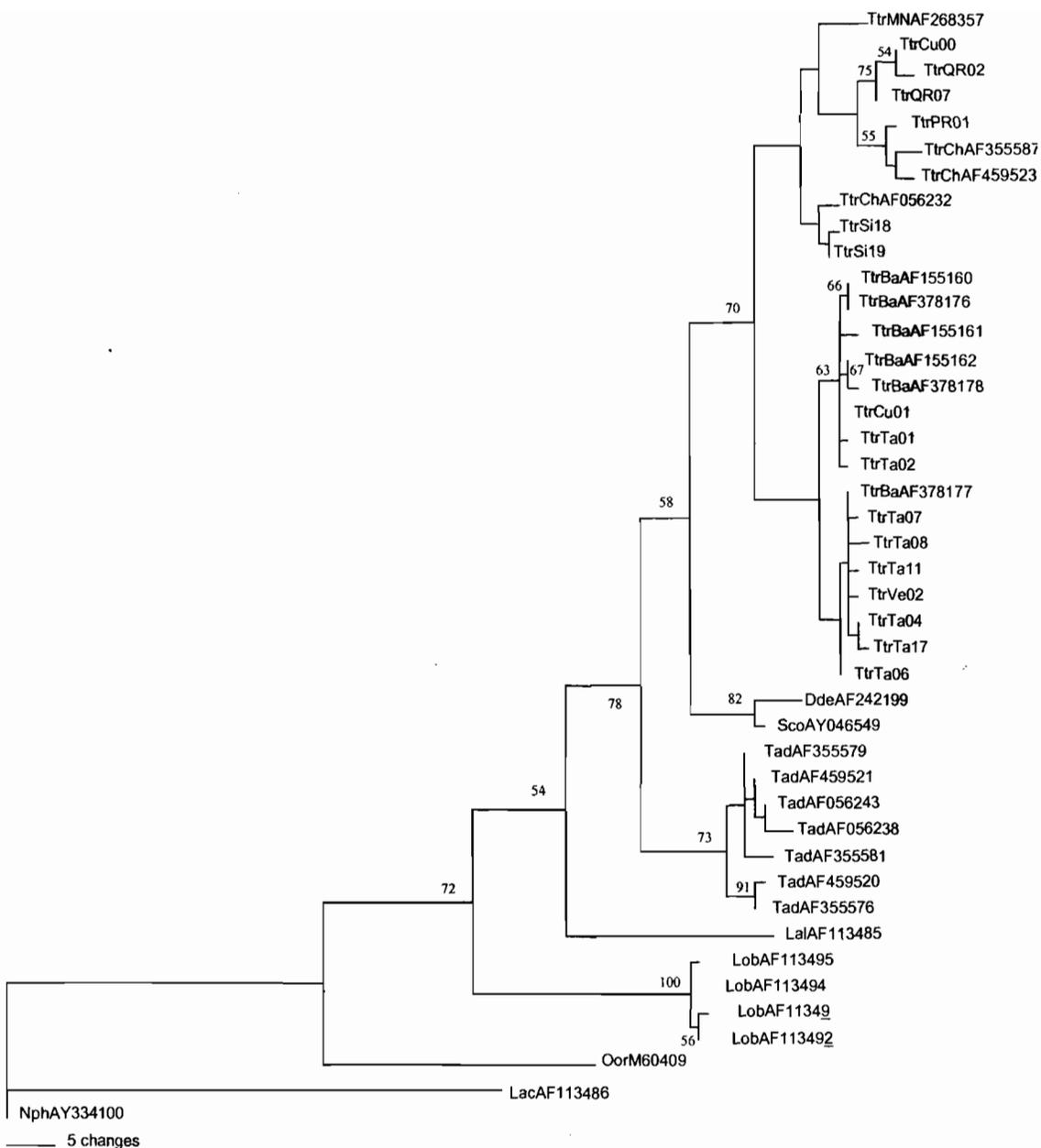


Figura 15. Filograma realizado con máxima parsimonia, se escogió el mejor árbol de una búsqueda heurística de 1000 réplicas, enraizado con NphAY334100 como grupo externo monofilético. Se muestran los valores de 1000 réplicas de bootstrap.

5.6 Análisis de clados anidados (NCPA)

La red de haplotipos que se observa en la Fig. 16 se construyó con un 90% de confianza, con el fin de unir todos los haplotipos en una sola red, los haplotipos más antiguos se muestran en rectángulo y la frecuencia de los mismos es relativa al tamaño. El análisis de clados anidados (Fig.16) muestra claramente dos grupos bien definidos que corresponden a los clados 2-1 y 2-2 que se mantienen iguales si aumentamos la confianza de las conexiones a un 95%. Estos clados están compuestos por haplotipos de todas las localidades del Golfo de México-Caribe (Tabasco, Veracruz, Quintana Roo, Cuba, Puerto Rico y Bahamas). El clado 2-3 está compuesto por los individuos de Sinaloa y se encuentra intermedio entre los anteriores que forman el clado 3-1 y los clados 2-4 y 2-5 que contienen haplotipos de Puerto Rico y Cuba-Quintana Roo respectivamente muy alejados del grupo principal (clado 3-1). El clado 2-5 que contiene haplotipos de Quintana Roo y Cuba se une a la red de haplotipos únicamente bajando la confianza a 90% y el 2-4 que consta de un haplotipo de Puerto Rico se mantiene más cercano al grupo de Sinaloa aún con un 95% de confianza.

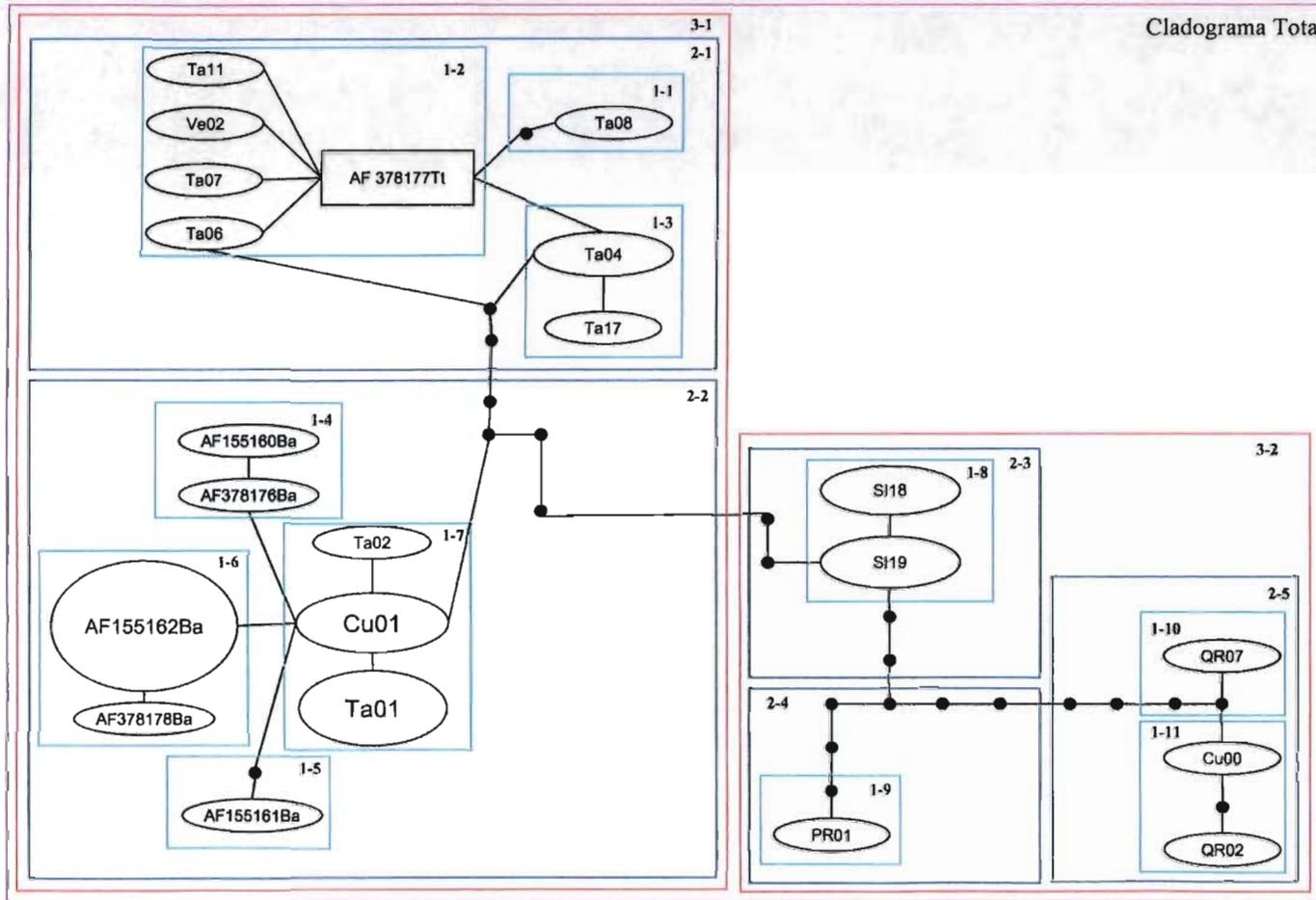


Figura 16. Red de haplotipos y andamiaje de todos los clados analizados. El nivel uno presenta 11 clados delimitados en color rosa. En el nivel dos se presentan cinco clados representados en color azul.

Para asociar estos grupos de haplotipos con su distribución geográfica, se empleó el programa GeoDis 2.2. La matriz de datos para el programa se muestra en el Apéndice E y el archivo de salida con los resultados obtenidos se muestra en el Apéndice F.

La interpretación con la clave de Templeton (2004) de los resultados significativos obtenidos con GeoDis 2.2 (Apéndice F) nos indica que todas las poblaciones del sur del Golfo de México y el Caribe han seguido una dinámica de expansión territorial contigua (clado 3-1) seguida de flujo genético restringido entre Bahamas, Cuba y TabascoVer (clados 1-6 y 1-7). Finalmente el muestreo resulta inadecuado para determinar si hay fragmentación alopátrica o aislamiento por distancia entre las poblaciones de Sinaloa, Puerto Rico, Quintana Roo y Cuba (clado 3-2).

6. DISCUSIÓN:

6.1 Diversidad genética en las poblaciones

En general la diversidad genética encontrada en las poblaciones del sur del Golfo de México y el Caribe tanto con marcadores nucleares como mitocondriales es alta y similar a la encontrada en otros trabajos de regiones vecinas (Natoli *et al.*, 2004; Hoelzel *et al.*, 1998).

El número de alelos por *locus* y los valores de heterocigosidad encontrada en cada *locus* de microsatélite en las tres poblaciones analizadas en este trabajo (Cuba Quintana Roo y Tabasco) se compararon con los valores obtenidos por Natoli *et al.* (2004) en el norte del Golfo de México y la costa oeste del Atlántico norte (WNAC) con nueve microsatélites. De igual modo comparamos la población de Sinaloa con los valores reportados previamente para el Pacífico norte oriental (ENP).

Al analizar las poblaciones por *locus* (Apéndice C) y en conjunto con los cuatro *loci*, nos encontramos que nuestras poblaciones presentan por separado el mismo número de alelos y de heterocigosidad promedio observada y esperada que en los trabajos de regiones vecinas y que Tabasco es incluso más diversa en la mayoría de los *loci* analizados. Por otra parte al comparar con Sinaloa observamos que presenta el menor número de alelos por *locus* y de

heterocigosidad promedio al igual que su población vecina (ENP). Esto podría deberse al hecho de que es una pequeña población que no representa a todo el Pacífico Mexicano pero apoyados en los resultados similares de Natoli *et al.* (2004) podemos inferir que hay una menor diversidad genética en el Norte del Pacífico Oriental comparada con la presente en el sur del Golfo de México y el Caribe y al ser unidades evolutivas independientes presentan alelos exclusivos reflejo de los diferentes procesos que se han llevado a cabo en cada una.

Ninguna de las poblaciones analizadas se desvió significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg al igual que cinco de las seis poblaciones analizadas por Natoli *et al.* (2004) en todo el mundo, y aunque al obtener los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}) por población se observa un exceso de heterocigotos, al juntar los cuatro *loci* y probar la significancia de los índices de fijación F_{IS} y F_{IT} ninguno de los dos es significativamente diferente de cero, por lo tanto no se puede probar que haya un exceso de heterocigotos ni dentro ni en el total de las poblaciones. También pudimos observar que cuatro microsatélites suficientemente polimórficos pueden evidenciar la diversidad genética de las poblaciones aún a pesar del tamaño de muestra.

Al analizar la diversidad genética mitocondrial de las 52 secuencias incluidas en este trabajo obtuvimos 40 sitios variables (12%) con 42 mutaciones y 21 haplotipos diferentes. Hoelzel *et al.* (1998), encuentran 18 haplotipos diferentes en 55 muestras y 45 sitios variables (15%) en 300 pb analizados de poblaciones

costeras y oceánicas de *Tursiops truncatus*, del Atlántico Norte Occidental.

Natoli *et al.* (2004) encontraron 61 haplotipos con 56 sitios polimórficos (19%) en siete poblaciones distribuidas mundialmente de la especie.

La diversidad haplotípica total de todas las secuencias analizadas es bastante alta $H_D = 0.922$ considerando que una $H_D = 1$ implica que todos los haplotipos de la muestra son diferentes. Si consideramos que en diversos organismos eucariontes se ha observado que la diversidad nucleotídica π abarca un intervalo de 0.002 - 0.019 (Nei, 1987), entonces la diversidad nucleotídica promedio que se encontró en este trabajo para todas las secuencias (0.01786) se encuentra dentro de los valores más altos.

Entre las poblaciones del Golfo de México y el Caribe el análisis de varianza molecular (AMOVA) nos reveló que el 74% de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones. Al analizar los índices de diversidad genética en cada una de las poblaciones encontramos que la mayor diversidad haplotípica se registró en Tabasco y Quintana Roo ($H_D = 0.8476$ y 0.8214) respectivamente y en Cuba la más baja ($H_D = 0.3846$). La diversidad nucleotídica (π) en estas poblaciones osciló entre 0.013253 en Bahamas y 0.055830 en Quintana Roo. Hoelzel *et al.* (1998) obtuvieron mayor diversidad en las poblaciones oceánicas ($\pi = 0.027$ y 12 haplotipos diferentes), en comparación con las poblaciones costeras ($\pi = 0.0006$ y únicamente 6 haplotipos) en 55 individuos analizados del Atlántico Norte Occidental. Natoli *et al.* (2004) obtuvieron valores de (H_D) entre

0.42 (ENA Atlántico Norte Oriental) y 0.94 (MS Mar Mediterráneo) y de π entre 0.008 (SA Sudáfrica) y 0.024 (poblaciones pelágicas chinas). Particularmente en la población del norte del Golfo de México, representada por 22 individuos, obtuvieron un valor de $H_D = 0.72$ y $\pi = 0.013$.

Se empleó una población del Pacífico Mexicano (Sinaloa) para compararla con las poblaciones del Golfo de México y el Caribe. Se analizaron seis individuos y se encontraron dos haplotipos únicamente, dando como resultado un valor de $H_D = 0.600$ y una $\pi = 0.001818$, un orden de magnitud por debajo de todas las encontradas en el Golfo de México y el Caribe. Parsons *et al.* (2002) encontraron en las poblaciones de delfines del Reino Unido, una $H_D = 0.697$ en 29 individuos del Mar del Norte y una diversidad nucleotídica (π) entre 0.0009 y 0.0164, ellos argumentan que estos niveles extremadamente bajos de diversidad nucleotídica, comparada con los de otros cetáceos no reflejan necesariamente bajos niveles de heterocigosidad en el genoma nuclear (Rosel y Rojas-Bracho, 1999). Esto se observa cuando comparamos la baja diversidad nucleotídica mitocondrial observada en Sinaloa junto con los datos de los cuatro microsatélites nucleares y encontramos valores de heterocigosidad nuclear moderadamente altos, aunque menores a los de todas las poblaciones del Golfo de México y el Caribe, por lo que podemos concluir que la población analizada del Pacífico mexicano es genéticamente menos diversa que cualquiera de las poblaciones del sur del Golfo de México y el Caribe de este trabajo. Esta situación no es preocupante ya que los niveles de diversidad genética no son

excesivamente bajos y si una población siempre ha estado en bajas densidades poblacionales y presenta bajos niveles de diversidad genética, puede permanecer así, sin sufrir los efectos negativos de la pérdida de variabilidad genética o de la endogamia (Templeton, 1987; Pope, 1996).

Podemos concluir que en general las poblaciones del sur del Golfo de México y el Caribe mantienen altos niveles de diversidad genética tanto nuclear como mitocondrial, probablemente como resultado de un gran tamaño poblacional histórico y se ha mantenido gracias a la dispersión que llevan a cabo los machos.

6.2 Estructura genética y divergencia entre las poblaciones

Los valores de F_{ST} obtenidos con microsatélites entre las poblaciones del Golfo de México-Caribe y la población del Pacífico mexicano van de 0.21209 hasta 0.25815. Los valores obtenidos por Natoli *et al.* (2004) de estructura genética entre el Golfo de México Norte y el Pacífico Norte Oriental (ENP) son de $F_{ST} = 0.281$ muy parecidos a los nuestros. Este resultado es de esperarse por el obvio aislamiento entre las poblaciones del Atlántico y del Pacífico y nos da un punto de comparación para poblaciones cuyo aislamiento no es tan evidente.

Al analizar la estructura genética nuclear entre las poblaciones de Cuba, Tabasco y Veracruz obtuvimos un valor de $F_{ST} = 0.081$, que nos sugiere una ligera estructura poblacional nuclear entre las poblaciones. Al realizar los análisis pareados del coeficiente de estructura genética observamos que esta ligera estructura está relacionada con los altos números de migrantes por generación ($N_m = 7$ y 8 individuos) entre las tres poblaciones (Tabla 7).

Dowling y Brown (1993) postularon que las poblaciones de *Tursiops truncatus* en ambos lados de la Península de Florida están separadas de manera profunda, este patrón de fuerte estructuración genética entre ambos lados de la Península de Florida es consistente con el de varios grupos de animales (Avise, 2000).

Natoli *et al.* (2004) obtuvieron un valor de $F_{ST} = 0.060$ entre el norte del Golfo de México y las poblaciones costeras del Atlántico Norte Occidental (WNAC) con

nueve microsatélites nucleares. En este trabajo obtuvimos una mayor estructura genética nuclear en las comparaciones pareadas entre Cuba-Tabasco ($F_{ST} = 0.03548$) y Cuba-Quintana Roo ($F_{ST} = 0.03369$) y la menor de todas entre Quintana Roo y Tabasco ($F_{ST} = 0.02965$) aunque podemos observar que las diferencias entre los coeficientes son mínimas. Este patrón se repite con los datos de distancia genética presentados en la Tabla 8. Esto sugiere una ligera separación poblacional en marcadores nucleares entre las poblaciones del sur del Golfo de México mantenida por un considerable flujo genético, especialmente entre Quintana Roo y Tabasco y ligeramente menor entre el Golfo de México y Cuba. El árbol de neighbor-joining a partir de esta matriz de distancias genéticas, con Sinaloa como grupo externo, muestra una relación más cercana entre Cuba y Quintana Roo, pero una distancia muy pequeña entre ambas poblaciones y Tabasco. Por otra parte al tratar de probar "aislamiento por distancia" correlacionando los valores de F_{ST} con los valores de distancia geográfica esférica no encontramos una correlación significativa con este conjunto de datos, este resultado sugiere que los individuos (en su mayoría machos) se mueven libremente por el Golfo de México y Cuba por igual.

Estos resultados se apoyan en las observaciones de Delgado-Estrella (2002) que registró toninas, por medio de fotoidentificación, que se desplazaron desde Quintana Roo hasta Tabasco y desde la laguna de Términos, Campeche hasta Tabasco. Bazúa-Durán (1997) encontró un patrón de vocalizaciones (dialecto) muy similar entre diferentes poblaciones del norte del Golfo de México y la

laguna de Términos, Campeche lo que también sugiere que los grupos de toninas del Golfo de México mantienen contacto entre ellos.

Los análisis de estructura genética mitocondrial o "materna" entre las poblaciones del sur del Golfo de México y el Caribe (Bahamas, Cuba, Puerto Rico, Quintana Roo y TabascoVer) revelaron un ligero flujo génico entre todas las poblaciones ($N_m = 1.31$) con valores muy parecidos en ambos estimadores de la estructura genética (F_{ST}) y (ϕ_{ST}).

Los valores pareados de F_{ST} entre las poblaciones del Golfo de México y el Caribe se vieron afectados por los tamaños de muestra especialmente en las comparaciones con Puerto Rico y Bahamas, dando como resultado valores no significativos (Tabla 10). Waples (1998) menciona que los tamaños pequeños de muestra generalmente tienden a causar diferencias poblacionales no significativas, resultando en una subestimación del grado de estructuración poblacional, por lo que probablemente el flujo génico global entre todas las poblaciones analizadas sea aún menor.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) nos indica que el 25% de la variación genética se encuentra entre las poblaciones. En las comparaciones pareadas con ambos estimadores del coeficiente de estructura genética se presenta una menor estructura materna entre TabascoVer-Quintana Roo ($\phi_{ST} = 0.14997$, $F_{ST} = 0.14881$) así como entre Bahamas-Cuba ($\phi_{ST} = 0.27210$, $F_{ST} = 0.17674$) y una

mucho más marcada entre Cuba-Quintana Roo ($\phi_{ST} = 0.43228$, $F_{ST} = 0.39698$) y Cuba-TabascoVer ($\phi_{ST} = 0.36797$, $F_{ST} = 0.36484$). Estos resultados de estructura genética se confirman con la "prueba exacta de diferenciación genética" que nos demuestra que las poblaciones del Golfo de México y el Caribe no se reproducen panmícticamente. Únicamente el valor de $F_{ST} = 0.30769$ y de p en la prueba exacta de diferenciación genética entre Cuba y Puerto Rico fueron significativos. Tampoco se pudo probar "aislamiento por distancia" en los marcadores mitocondriales con ninguno de los coeficientes de estructura genética.

La distancia genética D_{XY} obtenida entre las dos especies del género *Tursiops*; *T. truncatus* y *T. aduncus* en aguas chinas es de 0.044 con siete diferencias fijas (apomorfías), lo que corresponde a un 4.4% de divergencia entre ambas especies (Wang *et al.*, 1999). Para darnos una idea de lo que representa este valor podemos observar el valor de la distancia genética entre dos especies de odontocetos muy diferentes como son la orca y el delfín de Commerson, el valor de D_{XY} entre *Orcinus orca* y *Cephalorhynchus commersonii* es de 0.105 (10.5%) en toda la región del D-loop (Hoelzel *et al.*, 1991).

En todas las poblaciones de *Tursiops truncatus* analizadas en este trabajo encontramos valores de D_{XY} que van desde 0.00905 hasta 0.03002. Podemos observar que dentro del grupo Golfo de México-Caribe, la menor divergencia se observa entre Cuba y Bahamas (0.9%), lo cual sería de esperarse por su

cercanía geográfica. También observamos que los valores más altos de D_{XY} los presentan las poblaciones de Quintana Roo y Puerto Rico con el resto de las poblaciones del Golfo de México-Caribe con aproximadamente un 3% de divergencia e incluso con una apomorfía entre Cuba y Puerto Rico. Dowling y Brown (1993) encontraron un porcentaje de divergencia $> 2\%$ entre Océano Atlántico y Pacífico con fragmentos de restricción de la región control, esta coincidencia con nuestros datos de divergencia dentro del Golfo de México y el Caribe puede deberse a la menor resolución que tienen los RFLP's frente a las secuencias totales, ya que en otros trabajos se han encontrado estimados de divergencia genética similares en poblaciones muy cercanas, por ejemplo; Hoelzel *et al.* (1998) emplearon secuencias de mtDNA y obtuvieron una $D_{XY} = 0.039$ (3.9%) entre poblaciones costeras y oceánicas que coexisten en el Atlántico Norte Occidental. Natoli *et al.* (2004) obtuvieron un 2.91% de divergencia genética entre los linajes que comprenden Bahamas, Golfo de México (norte) y Atlántico Norte Occidental (poblaciones costeras). Estos resultados nos hablan de un grado considerable de divergencia genética (materna) entre las poblaciones del Caribe atenuado un poco más entre Bahamas y Cuba por un mayor flujo génico.

Los valores pareados de D_{XY} entre Sinaloa y el resto de las poblaciones analizadas en este trabajo, son similares a los obtenidos entre las poblaciones del Golfo de México-Caribe y van de 0.01736 a 0.02789, el aislamiento entre el Pacífico y el Golfo de México-Caribe se aprecia mejor al observar que en todas

las comparaciones se presentan dos o tres apomorfias. El árbol de neighbor-joining a partir de estos datos con Sinaloa como grupo externo muestra que dentro del Golfo de México-Caribe hay dos grupos de poblaciones considerablemente divergentes entre sí. El primer grupo lo constituyen Puerto Rico y Quintana Roo separados por distancias muy largas y muy divergentes del segundo grupo constituido por Bahamas-Cuba y TabascoVer separados por distancias menores entre sí.

Los resultados de estructura y divergencia genética obtenidos en este estudio son congruentes con lo observado en diversos organismos, donde la estructura genética mitocondrial (materna) es mucho más marcada que la observada en marcadores nucleares, a causa de la dispersión sexo-específica presente en los organismos. En odontocetos sucede lo mismo, los machos son los que generalmente se dispersan, O'Corry-Crowe *et al.* (1997) encontraron que los machos adultos son los que mayormente se dispersan entre las poblaciones de belugas, *Delphinapterus leucas*, en el Neártico occidental, así como Escorza-Treviño y Dizon (2000) encontraron nueve subpoblaciones de la marsopa de Dall, *Phocoenoides dalli*, conectadas por un alto flujo genético de los machos inferido a través de los microsatélites. Rosel *et al.* (1999) analizaron las poblaciones de la marsopa común *Phocoena phocoena* del Atlántico Noroccidental con mtDNA y seis microsatélites, encontraron una gran subdivisión entre las poblaciones analizadas con mtDNA y una estructura muy ligera con microsatélites nucleares. Esto se observa claramente en nuestros

resultados al comparar los altos niveles de flujo genético (N_m) revelados por los microsatélites en el Golfo de México y el Caribe, comparados con los obtenidos con mtDNA.

Los análisis de microsatélites apoyados por los estudios ecológicos y acústicos apoyan la idea de que las poblaciones de toninas, *Tursiops truncatus*, del Golfo de México y Caribe, presentan un considerable flujo genético, en su mayoría dado por los machos. Esta relativa homogeneidad poblacional no refleja el comportamiento de todos los individuos. Los linajes maternos se han mantenido estructurados a lo largo de la historia de las poblaciones y cada una de estas contiene una diversidad haplotípica particular.

Por otra parte a pesar de la relativa cercanía entre la Península de Yucatán y Cuba se observa que las toninas hembras se dispersan más fácilmente dentro del Golfo de México o de Cuba a Tabasco y no de Cuba a Quintana Roo como se pensaría.

Delgado-Estrella (2002) postula que la laguna de Holbox, como otras lagunas costeras del sur del Golfo de México (Laguna de Términos, Campeche), es un área de crianza de *Tursiops truncatus* ya que mantiene condiciones favorables de alimentación y protección para las crías. Esto podría ser una posible explicación para la mayor distancia y estructura genética que se observa entre Cuba y Quintana Roo a pesar de su cercanía geográfica, además de la

presencia de haplotipos ancestrales en el Caribe como se discute adelante. Faltaría muestrear Laguna de Términos y determinar el flujo génico de esta localidad hacia el resto de las poblaciones. Si la estructura genética fuera muy alta en las comparaciones pareadas podríamos pensar que las lagunas semi-costeras funcionan como refugios históricos de animales que albergan linajes antiguos y aumentan la estructura genética presente en las poblaciones.

Tabasco ha sido postulada como una zona de estancia temporal y de tránsito hacia otras regiones del Golfo de México (Delgado-Estrella, 2002) probablemente por esa razón la estructura y distancia genética entre Tabasco y Quintana Roo y Tabasco y Cuba es mucho menor que entre Quintana Roo y Cuba. Además Tabasco presenta una mayor diversidad haplotípica (H_D), que podría estar generada por la presencia de haplotipos de animales provenientes de diferentes poblaciones que se reúnen ocasionalmente para alimentarse y luego regresan a sus territorios.

6.3 Relaciones entre los haplotipos y análisis de clados anidados (NCPA)

Los análisis de máxima verosimilitud, estadística Bayesiana y parsimonia muestran a *Tursiops truncatus* como una especie monofilética. En los tres análisis se presentan dos grandes grupos que contienen a la mayoría de los

haplotipos de las poblaciones del sur del Golfo de México y el Caribe analizadas. La composición de los grupos se mantiene constante y presenta ramas muy cortas y varias politomias. Esta topología es congruente con una hipótesis de expansión territorial contigua entre las poblaciones del Golfo de México y el Caribe y un origen reciente de las mismas, por lo que probablemente no haya pasado el tiempo suficiente para que se diferencien o continúan mezclándose entre sí, lo cual también está apoyado por los bajos resultados de estructura genética nuclear en toda el área.

Otra explicación para la falta de resolución de los análisis es que la región analizada no es lo suficientemente larga para resolver esas relaciones. Hoelzel *et al.* (1991) analizaron la región D-loop de varios cetáceos y encontraron que el delfín, *Cephalorhynchus commersonii*, presenta un total de 900 pb en toda la región, suponiendo que la familia *Delphinidae* presenta un tamaño constante, en este trabajo se analizó aproximadamente el 37% de la región. Posiblemente este porcentaje no sea suficiente para detectar divergencias en una especie que mínimo apareció hace 5 millones de años (Barnes, 1990).

En los análisis de máxima verosimilitud y de estadística Bayesiana, que es donde incorporamos el modelo de evolución obtenido para la región control, la topología obtenida nos sugiere que las poblaciones de *Tursiops truncatus* en el Caribe están compuestas por algunos linajes muy antiguos que se originan al mismo tiempo que los linajes del Mar del Norte en el filograma realizado con

MrBayes y que en el análisis de máxima verosimilitud se encuentran junto con un grupo formado por dos haplotipos de China y uno de Puerto Rico, probablemente estos linajes han permanecido gracias al refugio que representa la laguna de Holbox en Quintana Roo.

Es posible que los clados que agrupan haplotipos del Atlántico y el Pacífico (Caribe y China) y (China-Sinaloa y Golfo de México-Caribe) hayan divergido durante el origen del Istmo de Panamá hace 3 millones de años (Emiliani *et al.*, 1972) y por eso todavía están muy cercanos. Se requiere de una comparación más amplia de estas secuencias y sobre todo de un mayor número de muestras del Caribe para determinar si las relaciones entre los haplotipos del Atlántico y el Pacífico son consecuencia de un polimorfismo ancestral o de eventos extraordinarios de migración.

El análisis de asociación geográfica de los haplotipos nos confirmó que históricamente hubo una expansión territorial contigua entre todas las poblaciones del sur del Golfo de México y el Caribe, este mismo resultado es sugerido por Natoli *et al.* (2004) cuando observan las redes entre los grupos del norte del Golfo de México, las poblaciones costeras del Atlántico Norte Occidental y Bahamas. Posterior a esta expansión se presentaron eventos de flujo génico restringido entre Bahamas, Cuba y TabascoVer, lo cual explica que en todas las reconstrucciones filogenéticas los dos grupos principales de ramas cortas contienen haplotipos de Bahamas, Cuba y TabascoVer. Esto podría

representar el hecho de que a lo largo de la historia de las poblaciones, animales del Caribe que por lo general se encuentran estables en sus poblaciones se mueven hacia Tabasco, probablemente en búsqueda de alimento o en tránsito hacia otra población del Golfo de México. Esta hipótesis se apoya en el árbol de distancias genéticas poblacionales (Fig.12) donde se muestra a un clado formado por Bahamas-Cuba unido a Tabasco, además de que los valores de los coeficientes de estructura genética son menores entre Bahamas y Cuba y mayores entre estas poblaciones y Tabasco.

Por último se encontró un muestreo inadecuado para argumentar fragmentación alopátrica o aislamiento por distancia entre los clados que comprenden la población de Sinaloa, Puerto Rico y los haplotipos ancestrales de Quintana Roo y Cuba, por lo que se recomienda realizar un muestreo mayor de la zona para esclarecer las dinámicas poblacionales y con esa información hacer algunas recomendaciones para su conservación.

7. CONCLUSIONES:

*Las poblaciones de delfines *Tursiops truncatus*, del Golfo de México y Caribe analizadas con cuatro *loci* de microsatélites (Cuba, Quintana Roo y Tabasco) se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y presentaron valores de diversidad genética nuclear altos y similares a los reportados en otros trabajos para poblaciones vecinas.

Las poblaciones del Golfo de México y Caribe analizadas con mtDNA (Bahamas, Cuba, Puerto Rico, Quintana Roo, Tabasco y Veracruz) presentaron valores altos de diversidad haplotípica (especialmente Tabasco) y nucleotídica comparados con los valores de Sinaloa y de otros estudios de regiones vecinas,

*La población del Pacífico Mexicano analizada (Sinaloa) presentó valores muy bajos de diversidad genética mitocondrial, probablemente como consecuencia de un tamaño poblacional disminuido por mucho tiempo. Esto no parece significar que la población esté en riesgo ya que sus valores de diversidad genética nuclear a pesar de ser menores al resto de las poblaciones analizadas, son similares a los reportados por Natoli *et al.* (2004) para la población vecina del Pacífico Norte Oriental (ENP) y se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg.

*Los valores de la proporción de migrantes por generación (N_m) con marcadores nucleares, dentro del Golfo de México y el Caribe fueron bastante altos (6.8-

8.18) lo que indica un alto flujo génico (en su mayoría de machos) entre las poblaciones como se había sugerido anteriormente en estudios ecológicos y acústicos.

*Los marcadores mitocondriales reflejaron una mayor estructura genética materna y un flujo génico restringido aún en poblaciones cercanas geográficamente como Cuba y Quintana Roo. Estos resultados reflejan la dispersión diferencial entre ambos sexos, probablemente aumentada por el efecto de protección para madres y crías que representan las lagunas costeras como Holbox en Quintana Roo.

*El análisis histórico y filogenético de los haplotipos nos indican que en la región hubo una expansión territorial contigua de todas las poblaciones, seguida de eventos de flujo génico restringido entre Bahamas, Cuba y TabascoVer

*Los análisis de máxima verosimilitud y estadística Bayesiana sugieren que en el Caribe hay linajes antiguos de *Tursiops truncatus*, que probablemente han permanecido gracias al refugio que representa la laguna de Holbox en Quintana Roo.

Literatura citada:

- Avice, J.C. (2000) *Phylogeography The history and formation of species*. Harvard University Press, USA. 447 pp.
- Ballance, L. (1990) Residence patterns, group organization and surfacing association of bottlenose dolphins in Kino Bay, Gulf of California, Mexico. Pp. 267-283. En: S. Leatherwood S. y R.R. Reeves (Eds.). *The bottlenose dolphin*. Academic Press, U:S:A. 641 pp.
- Barnes, L.G. (1990) The Fossil Record and Evolutionary Relationships of the Genus *Tursiops*. Pp 3-28. En: S. Leatherwood S. y R.R. Reeves (Eds.). *The bottlenose dolphin*. Academic Press, U:S:A. 641 pp.
- Barroso, A., S. Dunner y J. Cañón (1998) Technical Note: Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C and E by means of polymerase Chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Journal of Animal Science* 76:1535-1538.
- Bazúa-Durán, C. (1997) Comparación de vocalizaciones entre distintos grupos de delfines (*Tursiops truncatus*) del Golfo de México. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM.
- Bruford, M.W. y R.K. Wayne (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* 3:939-943.
- Clement, M., D. Posada y K.A. Crandall (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1659.
- Connor, R.C. (2003) Ecology of Group Living and Social Behaviour. Pp 353-370. En: Hoelzel, A.R (Ed.) *Marine Mammal Biology: An Evolutionary Approach*. Blackwell Publishing, United Kingdom. 432pp.
- Curry, B. E. y J. Smith (1997) Phylogeographic structure of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): Stock identification and implications for management. pp. 227-247. En: Dizon, A.E., S.J. Chivers y W.F. Perrin (Eds). *Molecular Genetics of Marine Mammals, Special Publication 3, Society for Marine Mammalogy*. 388pp.
- Delgado-Estrella, A. (1991) Algunos aspectos de la ecología de poblaciones de las toninas *Tursiops truncatus*, Montagu 1821, en la laguna de Términos y sonde de Campeche, México. Tesis de Licenciatura, Biología. ENEP. Iztacala, UNAM 149 pp.

- Delgado-Estrella, A. (2002) Comparación de parámetros poblacionales de las toninas, *Tursiops truncatus*, en la región sureste del Golfo de México (Estados de Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Dowling, T.E. y W.M. Brown (1993) Population Structure of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) as determined by restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Marine Mammal Science*, 9:138-155
- Emiliani, C., S. Gartner y B. Lidz (1972) Neogene sedimentation on the Blake Plateau and the emergence of the Central American Isthmus. *Paleogeography, Paleoclimate, Paleocology*. 11:1-10.
- Escorza-Treviño, S., K. Abella y A.E. Dizon (1999) Stock structure analices of spotted dolphins in the eastern tropical Pacific Ocean reveal a high degree of female phylopatry. Resúmenes de la XIII Conferencia bienal de Biología de Mamíferos Marinos. Wailea, Maui, Hawaii.
- Escorza-Treviño, S y A. E. Dizon (2000) Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology* 9:1049-1060.
- Excoffier, L. P. , Smouse y J. Quattro (1992) Analysis of molecular variance inferred for metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Fitz-Simmons N, C. Moritz, C. Limpus, L. Pope y R. Prince (1997) Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and male biased gene flow. *Genetics* 1147:1843-1854.
- Gallo-Reynoso, J.P. (1986) Sobre mamíferos marinos mexicanos. *Rev. Tec. Pesq.* 19:10-16.
- Garrison, L. M., W.F. Perrin, C. Vitulli y A. E. Dizon (1999) Three types of genetic markers used to compare worldwide genetic variation with morphology and ecology in spinner dolphins. Resúmenes de la XIII Conferencia bienal de Biología de Mamíferos Marinos. Wailea, Maui, Hawaii.
- Goldstein, D.B y Pollock, D.D. (1997) Launching microsatellites: A review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*. 88:335-342.
- Greenwood, P.J. (1980) Mating systems, phylopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour* 28:1140-1162.

- Hasegawa, M., H. Kishino, and T. Yano (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA: *Journal of Molecular Evolution*. 22: 160–174.
- Heckel, D. G. (1992) Fotoidentificación de tursiones, *Tursiops truncatus* (Montagu 1821), en la boca de Cazones de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México (Cetacea:Delphinidae). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. 164 pp.
- Hersh, S.L. y D. A. Duffield (1990) Distinction between Northwest Atlantic offshore and coastal bottlenose dolphins based on hemoglobin profile and morphometry. Pp. 129-139. En: S. Leatherwood y R. Reeves (Eds) *The bottlenose dolphin*. Academic Press. San Diego. 641pp.
- Hoelzel, A.R., J.M. Hancock y G.A. Dover (1991) Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology and Evolution* 8:475-493.
- Hoelzel, A.R. (1998) Genetic Structure of Cetacean Populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: Implications for Conservation Policy. *Journal of Heredity* 89: 451-458.
- Hoelzel, A.R., C.W. Potter y P.B. Best (1998) Genetic differentiation between parapatric “nearshore” and offshore” populations of the bottlenose dolphin. *Proceedings of the Royal Society London B Biological Sciences* 265:1177-1183.
- Hoelzel AR, Dahlheim M y Stern SJ (1998b) Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the eastern north Pacific and genetic differentiation between foraging specialists. *Journal of Heredity*. 89:121-8.
- Hudson, R.R., D. D. Boos y N. L. Kaplan (1992) A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular Biology and Evolution* 9:138-151.
- Islas-Villanueva, V. (2002) Caracterización genética por medio de microsatélites de toninas, *Tursiops truncatus*, en el parque de Xcaret, Quintana Roo. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Jefferson, T.A., S. Leatherwood y M.A. Webber (1996). *Marine Mammals of the World*. ETI Biodiversity Center, University of Amsterdam, The Netherlands. CD-ROM. ISBN:3-540-14508-7.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen y M. Nei (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Latta, R.G. (2003) Gene flow, adaptive population divergence and comparative population structure across loci. *New phytologist* 161:51-58.

- López-Hernández, I. (1997) Ecología poblacional de las toninas *Tursiops truncatus* en la costa de Tabasco, México. Tesis Licenciatura Biología. Facultad de Ciencias, UNAM, México 77p.
- Mead, J. G. y C. W. Potter (1995) Recognizing two populations of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) off the Atlantic coast of North America: morphological and ecologic considerations. IBI Report. 5: 31-44
- Natoli, A., V.M. Peddermors y A.R. Hoelzel (2004) Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellites and mitochondrial DNA analyses. Journal of Evolutionary Biology 17:363-375.
- Nauta, M.J. y F.J. Weissing (1996) Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. Genetics. 143:1021-1032.
- Nei, M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
- O'Corry-Crowe, R.S. Suydam, A. Rosenberg, K.J. Frost y A.E. Dizon (1997) Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphinapterus leucas* in the western Nearctic revealed by mitochondrial DNA. Molecular Ecology 6:955-970
- Ortega-Ortíz, J.G. (1996) Distribución y abundancia de las toninas *Tursiops truncatus* en la Bahía de la Ascensión, Q. Roo, México. Tesis Maestría, ICMYL, UACPyP-CCH, UNAM 82 pp.
- Palsbøll, P.J., J. Allen, M. Bérube, P.J. Clapham, T.P. Feddersen, P.S. Hammond, R.R. Hudson, H. Jørgensen, S. Katona, A.H. Larsen, F. Larsen, J. Lien, D.K. Mattila, J. Sigurjónsson, R. Sears, T. Smith, R. Spomer, P. Stevick and N. Øien (1997) Genetic tagging of humpback whales. Nature 388:767-769
- Parsons, K.M., L.R. Noble, R.J. Reid and P.M. Thompson (2002) Mitochondrial genetic diversity and population structuring of UK bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): is the NE Scotland population demographically and geographically isolated? Biological Conservation 108: 175-182.
- Pérez-Cao, H. (1996) Genética-Bioquímica poblacional del delfín tonina *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) de Cuba. Trabajo de Diploma, Universidad de la Habana, Facultad de Biología. 64 pp.
- Perrin, N. y V. Mazalov (2000) Local competition, inbreeding, and the evolution of sex-biased dispersal. The American naturalist 1:116-127

- Pope, T.R. (1996) Socioecology, population fragmentation and patterns of genetic loss in endangered primates. Pp 119-159. En: Avise, J.C. y J.L. Hamrich (Eds.) Conservation genetics: case histories from nature. Chapman&Hall, New York.
- Posada, D. y K.A. Crandall (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Posada, D., K.A. Crandall y A.R. Templeton (2000) GeoDis: A program for the Cladistic Nested Analysis of the Geographical Distribution of Genetic Haplotypes. *Molecular Ecology* 9:487-488.
- Raufauste, N., y F. Bonhomme (2000) Properties of bias and variance of two multiallelic estimators of F_{ST} . *Theoretical Population Biology* 57: 285-296.
- Raymond, M y F. Rousset (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.
- Reza-García, I. (2001) Abundancia y distribución de las toninas *Tursiops truncatus* en la laguna Santa María, Sinaloa, México. Tesis licenciatura Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. 59 pp.
- Reynolds, J., B.S. Weir y C.C. Cockerham (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105:767-779.
- Rice, W.D. (1998) Marine Mammals of the World. Systematics and Distribution. Special Publication Number 4, The Society for Marine Mammalogy
- Robertson, A. y W.G. Hill (1984) Deviations from Hardy-Weinberg proportions, sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107: 703-718.
- Rohlf, F.J. y R.R. Sokal (1981) Statistical Tables. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- Ronquist, R. (1997) Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46:195-203.
- Ronquist, F. y J.P. Huelsenbeck (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rooney, A.P., D.B. Merrit y J.N. Der (1999) Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Heredity*. 90:228-231.

-Rosel, P.E. y L. Rojas-Bracho (1999) Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus* (Norris and MacFarland, 1958). *Marine Mammal Science* 15:990-1003.

-Rosel P.E., R. Tiedemann y M. Walton (1999) Genetic evidence for restricted trans-Atlantic movements of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*. *Marine Biology* 133:583-591.

-Rozas, J. y R. Rozas (1995) DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data. *Comput. Applic. Biosci.* 11: 621-625.

-Schneider S., D. Roessli y L. Excoffier (2000) Arlequin ver 2.000: A software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.*

-Seutin, G., J. Brawn, R.E. Ricklefs y E. Bermingham (1993) Genetic Divergence among populations of a Tropical passerine, The Streaked Saltator (*Saltator albicollis*). *The Auk* 110:117-126.

-Shane, S.H., R. S. Wells y B. Würsig (1986) Ecology, behavior and social organization of the bottlenose dolphin: A review. *Marine Mammal Science* 2:34-63.

-Sheffield, V.C., J.S. Beck, A.E. Kwitek, D.W. Sandström y E.M. Stone (1993) Analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16:325-332.

-Shinohara, M., X. Domingo-Roura y O. Takenaka (1997) Microsatellites in the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. *Molecular Ecology* 6: 695-696.

-Sinnott, R.W. (1984) Virtues of the Haversine. *Sky and Telescope* 68:159

-Skulason, S y T.B. Smith (1995) Resource polymorphisms in vertebrates. *Trends in Ecology and Evolution* 10:366-370.

-Slatkin, M. (1987) Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* 263: 787-792

-Tautz, D. y M. Renz (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12:4127-4138.

-Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17:6463-6471.

-Templeton, A.R. (1987) Inferences on natural population structure from genetic studies on captive mammalian population. Pp. 257-272 En: Chepko-Sade, B.D., Z.T. Halpin (Eds.) Mammalian dispersal patterns: the effect of social structure on population genetics. University of Chicago Press, Chicago.

-Templeton A.R. (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7:381-397.

-Templeton A.R. (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13:789-809.

-Trivers, R.L. (1985) Parental investment and sexual selection. Pp 136-179 En: Campbell, B (Ed) Sexual selection and the descent of man, 1871-1971. Aldine, Chicago.

-Walker, W.A. (1981) Geographic variation in morphology and biology of bottlenose dolphins (*Tursiops*) in the eastern North Pacific. NOAA/NMFS Southwest Fisheries Science Center Administrative Report no. LJ-81-3c, 21pp.

-Waples, R.S. (1998) Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity* 89:438-450.

-Wang, J.Y., L.S. Chou y B.N. White (1999) Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Molecular Ecology* 8:1603-1612.

-Weber, J.L. y C. Wong (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2:1123-1128.

-Weir, B.S. y C.C. Cockerham (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

-Weir, B.S. (1996) Genetic data analysis, vol.2. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

-Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 15: 323-354.

-Wu, Q., M. Buchwald y R.A. Phillips (1995) *Nucleic Acids Research* 23 (24): 5087-5088.

-Würsig, B y M. Würsig (1979) Behavior and ecology of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, in the South Atlantic Fishery Bulletin 77:399-412.

APÉNDICES

*APÉNDICE A

Protocolos y Soluciones

Buffer de campo para preservar DNA en sangre

(Seutin *et al.*, 1993)

100mM EDTA

100 mM Tris-HCl pH 8

2% SDS

Agregar 1ml de buffer a 100µl de sangre y mantener a T° ambiente

Extracción de DNA a partir de tejido

(Wu *et al.*, 1995)

Cortar un cm. de cola de ratón (o su equivalente) y macerar en pedacitos

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocaron los pedazos de cola y se agregaron 500 µl de buffer de lisis preparado recientemente.

Buffer de lisis:

NaCl 400 mM

Tris-HCL (pH 8.5) 100 mM

SDS 0.2%

RNAasa A 40µg/ml

Proteinasa K 500 µg/ml

Se incubó el tubo toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se agregó EDTA pH 8, para quedar a una concentración final de 5 mM. El pelo no digerido se removió por centrifugación a 7 rpm, 15 min.

El sobrenadante se transfirió a una caja de cultivo P60 o P35 y se le agregó un volumen de isopropanol, mezclando por rotación considerablemente la caja.

Dejar en reposo la caja durante 2 hrs a T°A, hasta que se observe un precipitado blanco de DNA en el fondo.

Dado que el DNA se pega a la caja, se decanta el sobrenadante y el DNA se lava 2 veces con 1 ml de etanol 70% frío.

Después de lavar el DNA se seca al aire (10 min) y se disuelve en aprox. 500µl de TE, pH 8 a 37°C por 2 hrs en agitación.

**Extracción de DNA a partir de sangre total.
Método de sales hipertónicas para sangre fresca**

1. Obtener 6 ml de sangre utilizando EDTA como anticoagulante.
2. Centrifugar de 10-15 min a 2500 rpm.
3. Recuperar leucocitos de la interfase y lavar las ocasiones que se necesiten con RCLB (2-3 veces) hasta que la pastilla se vea blanca.
4. Resuspender la pastilla en 180 μ l de NaCl 5 mM.
5. Agregar 90 μ l de SDS 10% (agitar vigorosamente hasta que esté lechoso)
6. Incubar 5 min a T^oA.
7. Agregar 615.9 μ l de NaCl saturada.
8. Incubar 5 min a T^oA.
9. Centrifugar a 15 000 rpm durante 15 min, recuperar el sobrenadante y repetir únicamente si el sobrenadante está muy sucio.
10. Recuperar sobrenadante y precipitar con dos volúmenes de etanol absoluto.
11. Incubar 5 min a T^oA
12. Lavar el precipitado 2-3 veces con etanol al 70% a 1 500 rpm 3-5 min.
13. Resuspender la pastilla con agua inyectable (20-60 μ l) dependiendo del tamaño.

RBCL

Tris 10mM pH 7.6

MgCl₂ 5mM

NaCl 10mM

Extracción de DNA a partir de tejido y de sangre en Buffer de preservación por Fenol-Cloroformo con algunas modificaciones

Para tejido

- 1) Cortar en pedacitos (lo más fino posible)
- 2) Agregar 500 μ l de Buffer de digestión
- 3) Agregar 30 μ l de proteinasa K (10 mg/ μ l)
- 4) Mezclar delicadamente por inversión
- 5) Incubar a 37° C toda la noche o a 65° C por 2 horas
- 6) Agregar volúmenes iguales de fenol 500 μ l y agitar moderadamente por un minuto
- 7) Centrifugar 13000 rpm durante un minuto
- 8) Transferir la fase acuosa a otro tubo de microcentrifuga
(Evadir interfase y guardar el fenol para repetir en caso de no obtener DNA)

Para sangre preservada a temperatura ambiente comenzar a partir del paso 9.

Previamente incubar toda la noche 100-180 μ l de sangre con 40 μ l de proteinasa K (10mg/ μ l) y 200 μ l de ddH₂O

- 9) Agregar volúmenes iguales (500 o 300 μ l) de fenol y agitar moderadamente por un minuto
- 10) Centrifugar a 13000 rpm durante un minuto
- 11) Transferir fase acuosa a otro tubo de microcentrifuga (evadir interfase)
- 12) Agregar 500 μ l de mezcla 25:24:1 fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y agitar moderadamente durante un minuto
- 13) Centrifugar a 13000 rpm durante un minuto
- 14) Transferir fase acuosa a otro tubo de microcentrifuga (evadir interfase)
- 15) Agregar 500 μ l de mezcla de 24:1 cloroformo:alcohol isoamílico y agitar moderadamente durante un minuto
- 16) Centrifugar a 13000 rpm durante nueve minutos
- 17) Transferir fase acuosa a otro tubo de microcentrifuga (Evadir interfase)
- 18) Agregar 1/10 de volumen (50 μ l) de acetato de Sodio 3 M.
- 19) Agregar 2 volúmenes (1000 μ l de etanol 100% e invertirlo levemente hasta que se vea la pastilla de DNA.
- 20) Si el DNA no se ve, incubar a -20°C durante 30 minutos o una hora.
- 21) Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos
- 22) Descartar el etanol, cuidando que el DNA se quede pegado.
- 23) Agregar un ml de etanol al 70% y dejarlo reposar un minuto
- 24) Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos
- 25) Descartar el etanol y secar la pastilla de DNA
- 26) Agregar 100 μ l de TE o agua esteril.
- 27) Incubar a 65°C durante una o dos horas o hasta que se solubilize el DNA.

Buffer de digestión

Para 500 ml

SDS 2% (w/v)

EDTA 20 mM

10 mM Tris-HCl pH 8

NaCl 100 mM

(almacenar a temperatura ambiente)

SSCP's
(Barroso *et al.*, 1998)

Se empleó la metodología descrita en con algunas modificaciones. Se tomaron 2 μ l del producto de PCR con 8 μ l del buffer de corrida y se desnaturalizaron a 94°C por 5 min.

Posteriormente se corrieron en una cámara de electroforesis vertical de (42* 35cm????), en un gel no desnaturalizante de poliacrilamida al 12% (radio 1:100) y 5% glicerol, por 14 horas a 300 V y a una T° entre 10-14°C.

Se hicieron unos reajustes a la tinción por plata

5 min de fijación inicial en un litro de ácido acético al 10%

2 min de enjuage (en agitación) con agua bidestilada fría

Se tira el agua y se repite el enjuage dos veces más por un minuto

20 min de tinción en nitrato de plata

5 seg de enjuage en agua bidestilada fría

Revelado en Solución de carbonato de calcio hasta que aparezcan las bandas deseadas

3 min de fijación final (en agitación) en ácido acético al 10%

10 min de enjuage con agua corriente

Para 60 ml de solución de poliacrilamida :

Solución de Poliacrilamida (100:1) 7.2 ml

TBE 10X 3 ml

Glicerol 3 ml

APS (persulfato de amonio) 10% 420 μ l

TEMED 21 μ l

H₂O milliQ 46 ml

Solución de Poliacrilamida (100:1)

Acrilamida 99 g

N,N' metilénbisacrilamida 1 g

Aforar a 1000 ml

Caliente a 37°C para disolver

Filtrar y almacenar en botellas oscuras a 4°C

Buffer de corrida SSCP's

Xylene cyanol 0.05%

Azul de bromofenol 0.05%

EDTA 5.5mM pH 8

Todo en formamida y almacenar a 4° hasta 3 meses

Solución de Plata

1 litro de agua bidestilada (fría)

Disolver un gramo de nitrato de plata

Agregar 1.5 ml de formaldehído 37%

(Esta solución se puede reusar de 3 a 10 veces, consérvese en un lugar fresco y en un recipiente que no exponga la solución a la luz)

Solución Reveladora

1 litro de agua bidestilada

Disolver 30g de Carbonato de Sodio

Enfriar la solución

Inmediatamente antes de usar la solución agregar:

1.5 ml de formaldehído 37%

1ml de Tiosulfato de Sodio (2g/L)

APÉNDICE B
Banco de muestras

| Código de la muestra | Nombre del Individuo | Localidad de origen | Procedencia de la muestra | Sexo | Preservación de la muestra |
|----------------------|----------------------|---|---------------------------|------|----------------------------|
| CU01 | Bayli | Bahía de Caibarién, Cuba | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| CU02 | Kinich | Bahía de Caibarién, Cuba | Xcaret | M | DNA(-20°C) |
| CU03 | Nicté-Ha | Bahía de Caibarién, Cuba | Xel-Ha | F | DNA(-20°C) |
| CU04 | Quiché | Bahía de Caibarién, Cuba | Xel-Ha | F | DNA(-20°C) |
| CU05 | Dzic | Bahía de Caibarién, Cuba | Xel-Ha | M | DNA(-20°C) |
| CU06 | Itzmán | Bahía de Caibarién, Cuba | Xel-Ha | M | DNA(-20°C) |
| CU07 | Chen | Bahía de Caibarién, Cuba | Xel-Ha | F | DNA(-20°C) |
| CU08 | Pax | Bahía de Caibarién, Cuba | Xel-Ha | M | DNA(-20°C) |
| CU09 | Aj'itzi | Bahía de Caibarién, Cuba | Xcaret | ? | DNA(-20°C) |
| CU10 | Xanum | Bahía de Caibarién, Cuba | Xcaret | ? | DNA(-20°C) |
| CU43 | Ninfa | Bahía de Caibarién, Cuba | Dolphin Discovery | F | Sangre |
| CU46 | Venus | Bahía de Caibarién, Cuba | Dolphin Discovery | F | Sangre |
| CU49 | Marte | Bahía de Caibarién, Cuba | Dolphin Discovery | M | Sangre |
| CU51 | Daniela | Bahía de Caibarién, Cuba | Dolphin Discovery | F | Sangre |
| CU52 | Lulu | Bahía de Caibarién, Cuba | Dolphin Discovery | F | Sangre |
| CU53 | Hera | Bahía de Caibarién, Cuba | Dolphin Discovery | F | Sangre |
| CU54 | Pegaso | Bahía de Caibarién, Cuba | Dolphin Discovery | M | Sangre |
| CU00 | Pepe | Bahía de Caibarién, Cuba | Six Flags | M | DNA(-20°C) |
| PR01 | NEPST834 | La Puntilla, Bahía de San Juan, San Juan, Puerto Rico | Varamiento Dr. Mignucci | F | DMSO |
| PR02 | NEPST869 | Cayo Enrique, La Parquera, Lajas, Puerto Rico | Varamiento Dr. Mignucci | F | DMSO |
| QR01 | Fanny | Holbox, Quintana Roo, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| QR02 | Abril | Holbox, Quintana Roo, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| QR03 | Chiquilá | Holbox, Quintana Roo, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| QR04 | Polé | Holbox, Quintana Roo, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| QR05 | Melissa | Holbox, Quintana Roo, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| QR06 | Ixchel | Holbox, Quintana Roo, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| QR07 | Maya | Holbox, Quintana Roo, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| QR08 | Alux | Holbox, Quintana Roo, México | Xcaret | M | DNA(-20°C) |
| QR09 | Holbox | Holbox, Quintana Roo, México | Xcaret | M | DNA(-20°C) |
| TA01 | Kelem | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| TA02 | T.t. 17 | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | M | DNA(-20°C) |
| TA03 | Palú | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| TA04 | Kanab | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | M | DNA(-20°C) |
| TA05 | Kin | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| TA06 | Ik | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| TA07 | Tapish | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| TA08 | Dzul | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | M | DNA(-20°C) |
| TA09 | Xtup | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | M | DNA(-20°C) |
| TA10 | Huinic | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | M | DNA(-20°C) |
| TA11 | Balam | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | ? | DNA(-20°C) |
| TA12 | Chel | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | F | DNA(-20°C) |
| TA13 | Nup | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | M | DNA(-20°C) |
| TA14 | Yok | Paraíso, Tabasco, México | Xcaret | M | DNA(-20°C) |
| TA15 | Rómulo | Paraíso, Tabasco, México | Dolphin Discovery | M | Sangre |

| | | | | | |
|------|---------|-------------------------------------|-------------------|---|-------------|
| TA17 | Musa | Paraíso, Tabasco, México | Dolphin Discovery | F | Sangre |
| VE01 | Ver1 | Veracruz, Golfo de México, México | Varamiento | ? | DMSO |
| VE02 | Maggie | Veracruz, Golfo de México, México | Dolphin Discovery | F | Sangre |
| SI01 | Chirris | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | F | DNA(-20°C) |
| SI02 | Mitzon | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | M | DNA(-20°C) |
| SI03 | Tinda | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | F | DNA(-20°C) |
| SI04 | Karina | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | F | DNA(-20°C) |
| SI05 | Ashim | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | F | DNA(-20°C) |
| SI06 | Yagalla | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | F | DNA(-20°C) |
| SI07 | Amizcle | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | M | DNA(-20°C) |
| SI08 | Nuna | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | F | DNA(-20°C) |
| SI09 | Pue | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | F | DNA(-20°C) |
| SI10 | Hannah | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Six Flags | F | DNA(-20°C) |
| SI11 | Tango | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Six Flags | M | DNA (-20°C) |
| SI12 | Hembra1 | Laguna de Macapule, Sinaloa, México | Delfinity | F | DNA(-20°C) |
| SI13 | Hembra2 | Laguna de Macapule, Sinaloa, México | Delfinity | F | DNA(-20°C) |
| SI14 | Hembra3 | Laguna de Macapule, Sinaloa, México | Delfinity | F | DNA(-20°C) |
| SI15 | Macho1 | Laguna de Macapule, Sinaloa, México | Delfinity | M | DNA(-20°C) |
| SI16 | Macho2 | Laguna de Macapule, Sinaloa, México | Delfinity | M | DNA(-20°C) |
| SI17 | Macho2b | Laguna de Macapule, Sinaloa, México | Delfinity | M | DNA(-20°C) |
| SI18 | Nouba | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | F | DNA(-20°C) |
| SI19 | Jashui | Laguna de Huitussi, Sinaloa, México | Dolphin Adventure | F | DNA(-20°C) |

APÉNDICE C

Se muestran las frecuencias alélicas de los cuatro *loci* de microsatélite, para las cuatro poblaciones principales y se resaltan las frecuencias de 0. El tamaño de muestra (*N*) por población H_E (Heterocigosidad esperada) y H_O (Heterocigosidad observada).

| LOCUS D08 (<i>N</i>) | CUBA (18) | Q. ROO (9) | TABASCO (9) | SINALOA (19) |
|---------------------------|--------------|---------------|----------------|-----------------|
| 95 | 0.0000 | 0.2778 | 0.0500 | 0.0000 |
| 103 | 0.0278 | 0.0556 | 0.1000 | 0.0000 |
| 105 | 0.8333 | 0.6111 | 0.4000 | 0.0000 |
| 107 | 0.1389 | 0.0000 | 0.3000 | 0.2059 |
| 109 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1765 |
| 111 | 0.0000 | 0.0556 | 0.1000 | 0.5294 |
| 113 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0500 | 0.0882 |
| H_E | 0.2855 | 0.5432 | 0.7250 | 0.6384 |
| H_O | 0.2222 | 0.7778 | 0.7000 | 0.5294 |

| LOCUS TexVet7 (<i>N</i>) | CUBA (18) | Q. ROO (9) | TABASCO (10) | SINALOA (17) |
|----------------------------------|--------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 156 | 0.2188 | 0.5000 | 0.2727 | 0.0000 |
| 158 | 0.2813 | 0.1667 | 0.2727 | 0.3235 |
| 160 | 0.2813 | 0.2778 | 0.3636 | 0.0000 |
| 162 | 0.2188 | 0.0556 | 0.0455 | 0.6765 |
| 164 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0455 | 0.0000 |
| H_E | 0.7461 | 0.6420 | 0.7149 | 0.4377 |
| H_O | 0.7500 | 0.7778 | 0.8182 | 0.2941 |

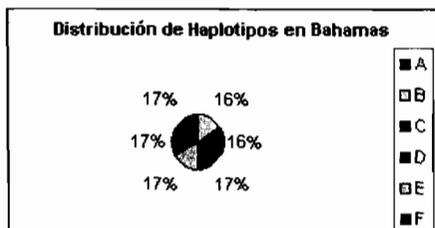
| LOCUS D18 (<i>N</i>) | CUBA (18) | Q. ROO (9) | TABASCO (10) | SINALOA (17) |
|---------------------------|--------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 80 | 0.0313 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 82 | 0.4063 | 0.4375 | 0.5000 | 0.3824 |
| 84 | 0.0000 | 0.0625 | 0.0000 | 0.0294 |
| 86 | 0.3438 | 0.1250 | 0.1000 | 0.0294 |
| 88 | 0.1875 | 0.3750 | 0.3500 | 0.0882 |
| 90 | 0.0313 | 0.0000 | 0.0000 | 0.4412 |
| 92 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0500 | 0.0294 |
| H_E | 0.6797 | 0.6484 | 0.6150 | 0.6488 |
| H_O | 0.7500 | 0.8750 | 1.0000 | 0.9412 |

| LOCUS D22 (<i>N</i>) | CUBA (18) | Q. ROO (9) | TABASCO (10) | SINALOA (17) |
|---------------------------|--------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 122 | 0.1111 | 0.2500 | 0.0000 | 0.0000 |
| 124 | 0.2778 | 0.0625 | 0.2222 | 0.0909 |
| 126 | 0.1111 | 0.1875 | 0.1111 | 0.4091 |
| 128 | 0.2777 | 0.1875 | 0.3889 | 0.0455 |
| 130 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1667 | 0.0909 |
| 132 | 0.0556 | 0.1250 | 0.0000 | 0.3636 |
| 134 | 0.1111 | 0.1250 | 0.0556 | 0.0000 |
| 136 | 0.0556 | 0.0625 | 0.0556 | 0.0000 |
| H_E | 0.8025 | 0.8281 | 0.7531 | 0.6818 |
| H_O | 0.8889 | 0.7500 | 0.6667 | 0.7273 |

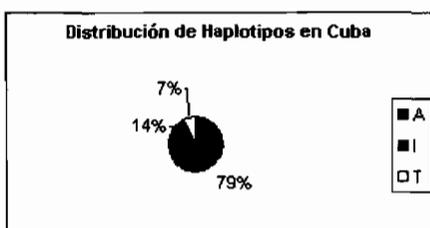
APÉNDICE D

Frecuencias de haplotipos mtDNA. Se observan seis diferentes gráficos con los porcentajes encontrados para cada haplotipo en cada una de las localidades analizadas A) Bahamas, B) Cuba, C) Puerto Rico, D) Quintana Roo, E) Tabasco-Veracruz y F) Sinaloa. A cada haplotipo diferente le corresponde una letra y un color.

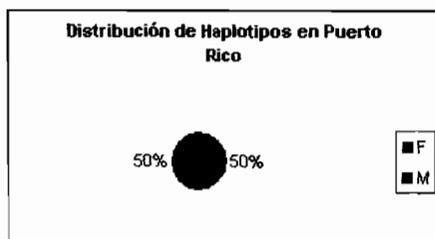
A)



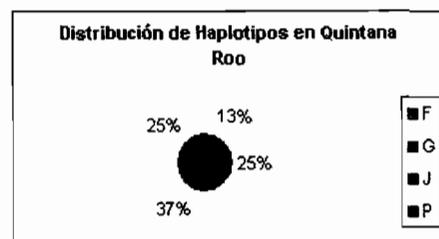
B)



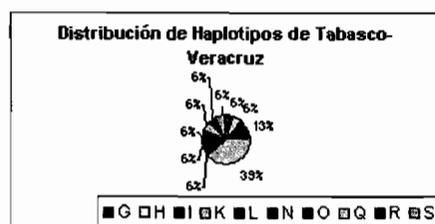
C)



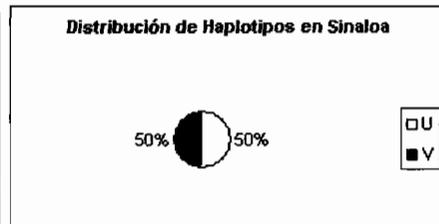
D)



E)



F)



APÉNDICE E

(Matriz GeoDis 2.2)

Tursiops mtDNA

6
1 Bahamas
6 24 15 00 N 76 00 00 W
2 Cuba
14 21 30 00 N 80 00 00 W
3 Puerto Rico
2 18 15 10 N 66 04 60 W
4 Quintana Roo
8 21 09 04 N 87 13 66 W
5 Tabasco-Ver
16 18 26 00 N 93 10 00 W
6 Sinaloa
6 27 02 00 N 109 28 00 W

11

Clade 1-2

5

VI XV VIII XIV XIX
0 1 1 1 0

4

1 3 4 5

1 1 1 0

0 0 0 1

0

0 0 1

0 0 0 1

0 0 0 1

Clade 1-3

2

VII XII

0 1

2

4 5

2 1

0 1

Clade 1-6

2

I II

0 1

2

1 2

1 11

1 0

Clade 1-7

3

IX XI XVIII

0 1 1

2

2 5

2 2

0 6

0 1

Clade

1-10

3

X XVI XX

1 1 0

2

2 4

0 3

0 2

1 0

```

Clade 2-1
3
1-1 1-2 1-3
 1  0  0
4
1 3 4 5
0 0 0 1
1 1 1 4
0 0 2 2
Clade 2-2
4
1-4 1-5 1-6 1-7
 1  1  1  0
3
1 2  5
2 0  0
1 0  0
2 11 0
0 2  9
Clade 2-5
2
1-10 1-11
   0  1
2
2 4
0 3
1 2
Clade 3-1
2
2-1 2-2
 1  0
5
1 2  3 4 5
1 0  1 3 7
5 13 0 0 9
Clade 3-2
3
2-3
2-4 2-5
  0  1  1
4
2 3 4 6
0 0 0 6
0 1 0 0
1 0 5 0

Total Cladogram
2
3-1 3-2

1  1
6
1 2  3 4 5  6
6 13 1 3 16 0
0 1  1 5 0  6
END

```