UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS DEL MAR

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA MARINA

POSGRADO EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS

**TESIS**

# IDENTIDAD POBLACIONAL DE LA BALLENA GRIS (*Eschrichtius robustus*) EN LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA
SERGIO MARTÍNEZ AGUILAR

DIRECCIÓN:
DR. JORGE URBÁN RAMÍREZ

LA PAZ, B. C. S., ENERO DE 2016

Agradecimientos.

A mi comité asesor: Dr. Jorge Urbán, Dra. Eleonora Romero, Dr. Hector Reyes, Dr. Ricardo Vázquez y Dr. Oscar Arizpe, por la asesoría para la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Baja California Sur, que ha sido mi casa por largos años y a quien le debo gran parte de mi formación profesional.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado; a la Alianza WWF-Telcel y a Ocean Foundation por el apoyo económico para la realización del trabajo de campo; al programa de Investigación de Mamíferos Marinos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur por el apoyo para la realización de este proyecto, al proyecto “Pacific Wide Study on Population Structure and Movement Patterns of North Pacific Gray Whales” de la Comisión Ballenera Internacional (IWC), por el apoyo y colaboración para la comparación de las foto-identificaciones.

A exportadora de Sal S.A., y al personal del Departamento de Ecología (Ing. Fabián Castillo, Joaquín Rivera, Antonio Zaragoza y M en C. Pedro Martín Domínguez) por su valioso apoyo para la realización del trabajo de campo en la Laguna Ojo de Liebre.

Al campamento ecoturístico Kuyimá y a todo su personal, por su gran colaboración en el trabajo de campo en La Laguna San Ignacio.

Al laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y en particular a la M. en C. Griselda Gallegos Simental y al Dr. Neftali Gutiérrez Rivera por su asesoría con la extracción y amplificación del ADN, así como por su tiempo y paciencia.

A la South West Fisheries Science Center; a la Dra. Aimeé R.Lang y el Dr. David Weller por su valiosa asesoría y tiempo durante mi estancia para realizar los análisis de datos.

Al Dr. Alejandro Gómez y al Dr. Eduardo Romero, por su valiosa colaboración durante el examen de candidatura.

A todas las personas que han colaborado en la comparación de las foto-identificaciones de ballena gris: Tabata Olavarrieta, Jessica Robles, Hiram Rosales, Carlos López, Anaid López, Hector Pérez, Erandi Calderón, Constanza Torres, Paulette Durazo, Diana López, Susana Tovar, Mauricio Rodríguez, Laura Rodríguez, Andrea Bonilla, Olga Tyurneva, Liria del Monte, Lizbeth Sánchez y Ludovic Tenorio.

A Lorena Viloria y Cristina González, por su asesoría en el procesamiento de las muestras y el análisis de datos.

Al Dr. Jorge Urbán, por todo su apoyo, confianza y por tomarme en cuenta para diversos proyectos durante estos años de la maestría y doctorado.

Al Dr. Steven Swartz por su amistad y colaboración durante tantos años de trabajo de campo juntos.

A mi familia (Gloria, Francisco, Marco, Cecilia, Erick, David, Javier, Eugenia, Gustavo y Rocío) por su eterno apoyo y motivación en cualquier nuevo proyecto que llevo a cabo.

A mis amigos y compañeros del PRIMMA: Tabata, Lorena, Hiram, Carlos, Mariana, Jessica, Lizbeth, Kenia, Constanza, Rocío, Natalia, Andrea no solo por su colaboración en campo y laboratorio, sino por la convivencia diaria y ser parte de esta familia paceña

A todas las personas que colaboraron de alguna manera en la elaboración de este trabajo, pero que por mi mala memoria olvidé mencionar.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN ..... 1
ABSTRACT ..... 2
ANTECEDENTES. ..... 4
*Distribución y ciclo migratorio.* ..... 5
*Situación Histórica.* ..... 8
*Situación actual.* ..... 9
*Movimientos migratorios de la Ballena Gris* ..... 9
PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN. ..... 10
*Justificación.* ..... 10
*Hipótesis.* ..... 11
*Objetivo general.* ..... 11
*Objetivos específicos.* ..... 11
ZONA DE ESTUDIO ..... 12
*Laguna Ojo de Liebre.* ..... 13
*Laguna San Ignacio.* ..... 14
*Complejo Lagunar Bahía Magdalena – Bahía Almejas.* ..... 16
MÉTODOS ..... 17
*Trabajo de campo.* ..... 17
*Registro General de avistamientos.* ..... 17
*Foto-identificación.* ..... 17
*Colecta de Biopsias* ..... 19
*Trabajo de escritorio.* ..... 20
*Movimientos entre lagunas.* ..... 20
*Relación entre las zonas de reproducción en México, con las zonas de alimentación en el Pacífico Noroeste.* ..... 22
*Extracción del ADN de las muestras de piel.* ..... 22
*Relación de la diversidad genética de las lagunas costeras de la Península de Baja California, con la diversidad genética de la Población Asiática* ..... 27
REFERENCIAS ..... 28

CAPITULO II. RELACIÓN ENTRE LAS BALLENAS GRISES DE LAS LAGUNAS OJO DE LIEBRE, SAN IGNACIO Y BAHÍA MAGDALENA CON BASE EN LA FOTO-IDENTIFICACIÓN ..... 35
ANTECEDENTES ..... 35

MÉTODOS ..... 37
RESULTADOS ..... 37
*Laguna San Ignacio vs Laguna Ojo de Liebre* ..... 39
*Laguna San Ignacio vs Bahía Magdalena* ..... 39
*Laguna Ojo de Liebre vs Bahía Magdalena* ..... 40
*Índice de Intercambio entre lagunas* ..... 40
*Prueba de* Ji-cuadrada *para determinar la probabilidad de recaptura de todas las ballenas grises pertenecientes a las tres congregaciones invernales* ..... 41
*Prueba de Ji-cuadrada con datos de todas las congregaciones para el año 2013.* 47
DISCUSIÓN ..... 50
CONCLUSIONES ..... 55
REFERENCIAS ..... 56

CAPITULO III. RELACIÓN DE LAS BALLENAS GRISES EN LAS LAGUNAS OJO DE LIEBRE, SAN IGNACIO Y BAHÍA MAGDALENA, CON BASE EN SU DIVERSIDAD GENÉTICA ..... 58
ANTECEDENTES ..... 58
MÉTODOS ..... 60
RESULTADOS ..... 61
DISCUSIÓN ..... 68
CONCLUSIONES ..... 71
REFERENCIAS ..... 72

CAPITULO IV. RELACION DE LAS BALLENAS GRISES DE LA POBLACIÓN ASIÁTICA CON LAS BALLENAS QUE VISITAN LAS LAGUNAS COSTERAS DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA CON BASE EN SU FOTO-IDENTIFICACIÓN. .. 74
ANTECEDENTES ..... 74
MÉTODOS ..... 76
RESULTADOS ..... 77
*Comparación entre los catálogos de ballena gris de la Población del Pacífico Noroeste o Población Asiática.* ..... 77
*Comparación entre los catálogos de ballena gris de la Población del Pacífico Noroeste y la Península de Baja California* ..... 77
DISCUSIÓN ..... 82
CONCLUSIONES ..... 84
REFERENCIAS ..... 85

CAPITULO V. RELACIÓN DE LAS BALLENAS GRISES DE LA POBLACIÓN ASIÁTICA CON LAS BALLENAS QUE VISITAN LAS LAGUNAS COSTERAS DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, CON BASE EN SU DIVERSIDAD GENÉTICA. 87

ANTECEDENTES ..... 87

MÉTODOS ..... 89

RESULTADOS ..... 90

DISCUSIÓN ..... 97

CONCLUSIONES ..... 99

REFERENCIAS ..... 100

CAPITULO VI. ARGUMENTOS FINALES ..... 102

# RESUMEN

La Ballena gris (*Eschrichtius robustus*) es una especie migratoria que se distribuye en el Pacífico Norte, donde se reconocen, con base en su distribución y diversidad genética, dos poblaciones: La Asiática (occidental) y la Americana (oriental). Debido a la cacería comercial durante el siglo XIX y principios del siglo XX, estas poblaciones se redujeron drásticamente, actualmente la Población del Noreste se ha recuperado satisfactoriamente, hasta cerca de 22,000 individuos, en cambio la Población occidental, se encuentra muy amenazada con una población de tan solo 155 individuos. Tradicionalmente se ha asumido que las costas de la Península de Baja California, en particular las lagunas costeras, constituyen las zonas de reproducción y crianza de la Población Americana, sin embargo, recientemente se han encontrado indicios de que algunas ballenas de la Población Asiática también podrían visitar la Península de Baja California con fines reproductivos. Por otra parte, estudios genéticos junto con la técnica de foto-identificación han revelado una subdivisión de la Población Americana con un grupo de ballenas que se alimentan en la zona de British Columbia y el estado de Washington, y otro grupo, mucho más numeroso, que se alimenta en los mares de Bering, Chukchi y Beaufort. El objetivo de este trabajo es determinar la identidad poblacional de las ballenas grises que se congregan en las lagunas costeras de la Península de Baja California: Ojo de Liebre, San Ignacio y Bahía Magdalena, con base en la foto-identificación y el análisis del ADN mitocondrial. Se plantea la hipótesis de que existe una diferencia en la diversidad genética de las ballenas en las diferentes lagunas costeras, debido a la segregación de las ballenas provenientes de diferentes zonas de alimentación, y que el movimiento de las ballenas entre diferentes lagunas está relacionado con el sexo y estado reproductivo. Para cumplir los objetivos de este trabajo, se realizó trabajo de campo en las tres lagunas costeras durante las temporadas invernales de 2012 a 2014. Se encontró que el movimiento de las ballenas entre lagunas es heterogéneo, para todos los tipos de agrupación, mientras que se registraron 21 animales de la Población Asiática en la Península de Baja California y que el movimiento entre las diferentes zonas de reproducción de la Península y las zonas de alimentación de la Población Asiática en homogéneo. Por otra parte se determinó que existe subestructura entre la laguna Ojo de Liebre y las Laguna San Ignacio-Bahía Magdalena y existen diferencia significativas en las frecuencias haplotípicas de las ballenas de cada una de las congregaciones Mexicanas con respecto a la ballenas de las zonas de alimentación (Sakhalin y Kamchatka) de la Población Asiática.

ABSTRACT

Gray whale (*Eschrichtius robustus*) is a migratory species found in the northern Pacific Ocean in which, based on its distribution and genetic diversity there are two populations: The Asian (Western) population and the American (Eastern) population. Due to the commercial whaling in the nineteenth and early twentieth century, these populations drastically reduced, into the risk of extinction. Now, the Eastern gray whales recovered well to near 22,000 individuals, whereas the western population, remain highly endangered with a population of just 155 individuals. Traditionally it has been assumed that the coast of Baja California, including coastal lagoons, constitute the breeding and rearing grounds of the American population. However, recent studies found evidence that some Western individuals could also visit the Baja California Peninsula for reproductive purposes. Moreover, genetic studies along with the photo-identification have revealed a subdivision of the Eastern gray whale's feeding grounds, divided into a group of roughly 200 individuals near British Columbia and Washington, and a larger group in the Bering, Chukchi and Beaufort seas. The objective of this study is to determine the population identity of the gray whales that congregate in the coastal lagoons of Baja California: Ojo de Liebre, San Ignacio and Bahía Magdalena lagoon complex, utilizing photo-identification method and mitochondrial DNA analysis. We proposed that there is a difference in genetic diversity of whales in the various lagoons, due to segregation of whales originating from different feeding grounds, and that the movement of whales between lagoons is related to sex and reproductive status. In fulfillment of this objective, field work was conducted in the three coastal lagoons during the winter seasons of 2012 to 2014. We found that the movement of whales between Mexican breeding grounds is heterogeneous, for all types of groups. We registered 21 individuals from the Western Population in Baja California and the whale movements between the Mexican breeding grounds and Western feeding grounds is in a uniform way. Furthermore, an existing substructure was determined between Ojo de Liebre Lagoon and Laguna San Ignacio and Magdalena Bay (this last two lagoons together); there are also significant differences in haplotype frequencies of whales from each Mexican congregations about the western feeding areas (Sakhalin and Kamchatka).

# CAPITULO I. MARCO TEÓRICO

La ballena gris, único representante de la familia *Eschrichtiidae*, es una especie ampliamente estudiada debido a sus hábitos costeros. Actualmente esta especie sólo se encuentra distribuida en el Pacífico Norte y está dividida genética y espacialmente en dos poblaciones. La Población del Pacífico Noroeste o Población Asiática y la Población del Pacífico Noreste o Población Americana. (Le Duc *et al*., 2002; Lang *et al*., 2010)

Debido a la explotación comercial de esta especie durante los siglos XIX y XX, la Población Asiática se redujo drásticamente, hasta quedar actualmente alrededor de 155 individuos (IUCN 2012), mientras que la Población Americana ha logrado una buena recuperación y actualmente cuenta con cerca de 22,000 individuos (Punt y Wade 2010).

Al igual que otras especies de Misticetos, las ballenas grises (*Eschrichtius robustus*) presentan movimientos estacionales entre sus áreas de alimentación en altas latitudes y sus áreas reproducción en latitudes bajas, (Rice y Wolman, 1971). La Población Asiática se alimenta al este de Rusia, en la costa noreste de la Isla Sakhalin y al sureste de la Península de Kamchatka y posteriormente utilizan la Península de Corea y ambas costas de Japón como corredores migratorios hacia sus zonas de congregación invernal, las cuales se sugiere se encuentran en el sur del mar de China de acuerdo a evidencias existentes (Weller *et al*., 2002).

Por otro lado, aunque la mayor parte de la Población Americana se alimenta en aguas de los mares de Bering, Chukchi y Beaufort durante el verano y migran al sur durante el otoño, hacia las lagunas costeras de Baja California. Existe una pequeña parte de la población (Aproximadamente 200 individuos), que se alimenta entre la parte norte de California y el sureste de Alaska, a estos animales se les conoce como el grupo de alimentación de la Costa de Pacífico (PCFG) (Calambokidis *et al*., 2010).

Durante las últimas dos décadas, se han realizado varios estudios para delimitar las unidades poblacionales existentes, empleandose a los análisis genéticos para determinar las relaciones o diferencias entre poblaciones y dentro de las poblaciones. Estos trabajos han dado como resultado la división de las poblaciones del Pacífico Noroeste y Noreste (Le Duc *et al*., 2002; Lang *et al*., 2010) y la subdivisión de la Población Noreste en dos unidades de manejo (Frasier *et al*., 2011 Lang *et al*., 2011, Lang *et al.,* 2014), sin embargo es poco lo que se sabe en relación a como es la mezcla o flujo de las ballenas provenientes de las diferentes zonas de alimentación, cuando estas se congregan en sus áreas de reproducción.

Por esta razón, este trabajo tiene como objetivo, determinar la identidad poblacional de las ballenas grises en sus áreas de reproducción mediante el uso de dos técnicas: la foto-identificación y el análisis de la región control del ADN mitocondrial.

## ANTECEDENTES.

La ballena gris *Eschrichtius robustus* (Lilljeborg, 1861), es la única especie viviente de la familia *Eschrichtiidae* (Figura 1). Aunque existen fósiles pertenecientes a la familia Eschrichtiidae desde el Plioceno medio y tardío (de hace 4.5 a 2.5 millones de años), Los fósiles de Eschrichtius posiblemente robustus provienen de mediados del pleistoceno (hace 220 mil años) (Deméré, 2008).

Esta especie puede llegar a crecer hasta los 14 metros y pesar hasta 35 toneladas, se caracteriza por carecer de aleta dorsal, su coloración va del gris claro al gris oscuro, en ocasiones con grades regiones de color blanco, y generalmente presenta balanos y piojos como parásitos de la piel. Posee de dos a cinco surcos gulares y de 130 a 180 barbas cortas en cada lado de la boca. (Reeves *et al*., 2002).

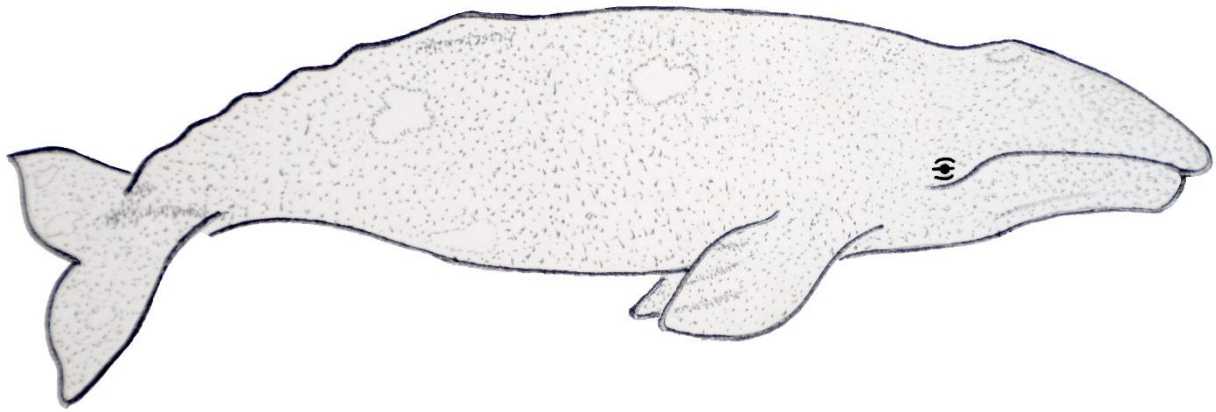


Figura 1. La ballena gris (dibujo del autor).

*Distribución y ciclo migratorio.*

Aunque la ballena gris alguna vez estuvo presente tanto en el Atlántico Norte como en el Pacífico Norte, esta se extinguió en el Atlántico hace varios cientos de años (Mead y Mitchell, 1984). Actualmente está representada por dos poblaciones en el Pacífico Norte: La Población del Oeste, también conocida como Asiática o Coreana y la Población del Este, también conocida como Americana o de California (Rice, 1981), (Figura 2).

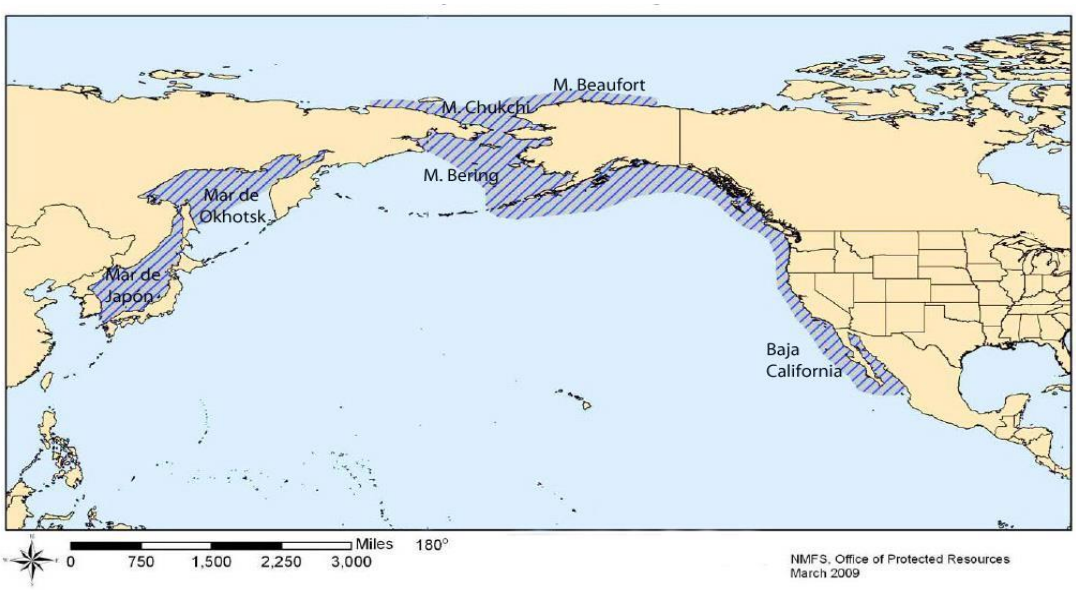



Figura 2. Mapa de la distribución de la ballena gris (modificado de la NMFS, 2009).

Las ballenas grises de la Población Asiática, se distribuyen a lo largo de las costas de Rusia, Japón, Corea y China (Henderson, 1990). Las ballenas migran anualmente de sus zonas de alimentación, hacia las zonas de congregación invernal que se sospecha que se encuentran en el sur del mar de China (Weller *et al*., 2002). Existe poca información sobre las antiguas rutas migratorias o zonas de invernación de las ballenas grises Asiáticas, pero se ha sugerido que existía más de una ruta y cualquier segregación de las ballenas durante el periodo de reproducción y crianza, pudo dar como resultado una subestructura poblacional (Brownell *et al*., 2010).

Las principales áreas de distribución (zonas de alimentación) durante el verano, se encuentran fuera de la costa Noreste de la Isla Sakhalin (52˚ 50’ N y 143˚ 20’ E) y al Sureste de la Península de Kamchatka. Mientras que las aguas costeras del Este de Rusia, la Península de Corea y ambas costas de Japón, han sido registrados como corredores migratorios durante los últimos 50 años (Weller *et al*., 2002), (Figura 3).

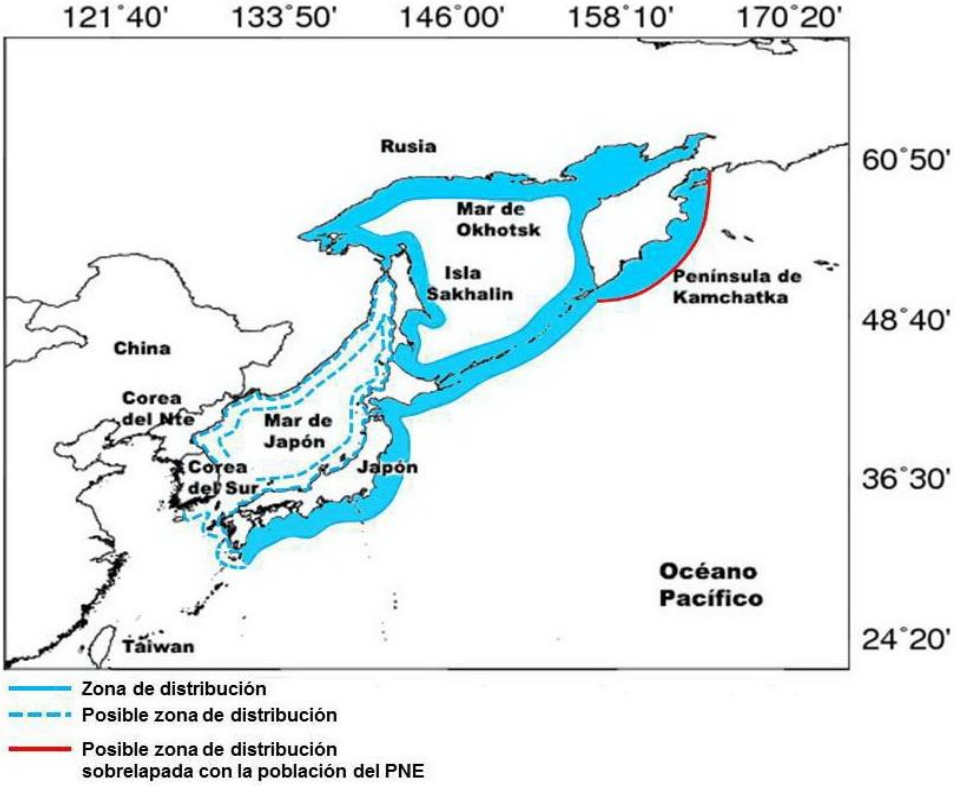



Figura 3. Distribución de la población de ballena gris del Pacífico Noroeste.

Por otra parte, las ballenas de la Población Americana, durante los meses de mayo a octubre se alimentan en las aguas del mar de Bering, Chukchi y Beaufort (Rice y Wolman, 1971). Sin embargo algunas ballenas grises (aproximadamente 200 individuos), se congregan en latitudes más bajas y pasan el verano a lo largo de las costas de California, Oregon, Washington, British Columbia y el sureste de Alaska (Darling, 1977; Calambokidis *et al*., 1991), a esta congregación se le conoce como grupo de alimentación de la costa del Pacífico (PCFG por sus siglas en inglés).

Durante el otoño la ballena gris comienza su migración hacia el sur a lo largo de la costa de Norte América, hacía las áreas de reproducción y crianza, que se extienden desde la parte central de California, hacia el sur a lo largo de la costa oeste de la Península de Baja California, principalmente en las lagunas; Ojo de Liebre, San Ignacio y Bahía Magdalena, así como en las aguas adyacentes desde el estero las Animas hasta Bahía Almejas y continua hacia el sureste en parte de la costa del Golfo de California (Rice y Wolman, 1971)(Figura 4).

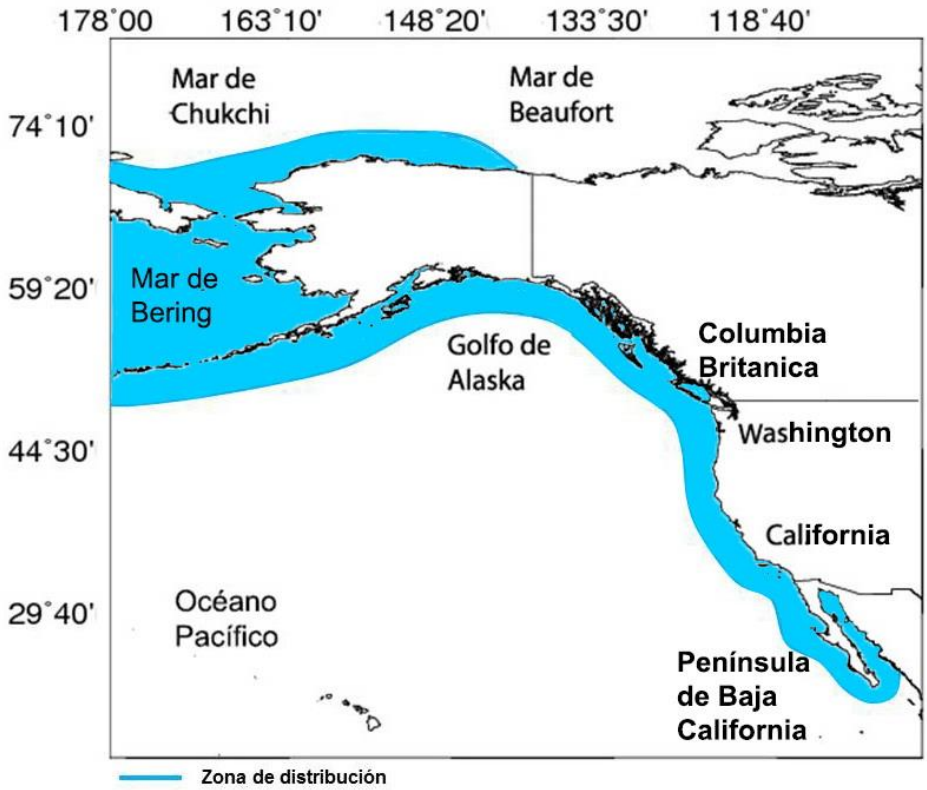



Figura 4. Distribución de la población de ballena gris del Pacífico Noreste.

*Situación Histórica.*

La ballena gris es una especie que históricamente estuvo sujeta a la caza desde tiempos remotos. Un análisis realizado por Reeves y Smith (2006), identificó que para finales del siglo XIX se habían realizado no menos de 22 “operaciones” de cacería que tenían como objetivo principal a la ballena gris. Estas actividades abarcaron desde la cacería aborigen realizada por los japoneses desde el siglo XVI, hasta la moderna cacería de ballenas realizada por franceses, alemanes, rusos y norteamericanos con ayuda de barcos fábrica. De igual forma, se sabe que los balleneros japoneses y coreanos continuaron capturando ballenas de la Población Asiática hasta 1966 (Omura, 1984).

Las ballenas grises Asiáticas posiblemente nunca fueron tan numerosas como su contraparte de América. Se ha especulado que alguna vez la población fue de entre 1500 a 10,000 individuos (Yablokov y Bogoslovskaya, 1984). Por otra parte, Berzin y Vladimirov (1981) estimaron que para 1910, únicamente había entre 1000 y 1500 ballenas grises, después de que alguna explotación comercial ya había ocurrido. Kato y Kasuya (2002) estimaron que entre 1800 y 2000 ballenas grises fueron capturadas entre 1861 y 1966, principalmente en Japón y Corea.

En México la primera captura de ballena gris documentada fue realizada en Bahía Magdalena, B.C.S., en 1845-1846, mientras que las lagunas de San Ignacio y Ojo de Liebre la cacería de ballenas comenzó en 1855, (Henderson, 1972; 1984). De acuerdo con los datos disponibles, hubo 657 visitas por parte de embarcaciones balleneras a las zonas de reproducción y crianza de ballena gris en México, entre 1846 y 1874 y se estima que se capturaron 5269 ballenas grises (Reeves *et al*., 2010).

Debido a la sobreexplotación, esta especie ha sido protegida de la cacería comercial desde 1946, por la Convención Internacional para la regulación de la Cacería de Ballenas (precursora de la Comisión Ballenera Internacional). Sin embargo, durante

2008 a 2012 se otorgó un permiso de caza de subsistencia a la Federación Rusa, para capturar 600 ballenas grises en la Región Autónoma de Chukotka (Ilyashenko, 2013)

*Situación actual.*

A pesar de que ambas poblaciones del Pacífico fueron reducidas por la cacería comercial, únicamente la Población del Pacífico Noreste se ha recuperado, hasta niveles anteriores a la explotación comercial, sus números actuales, basados en investigaciones son de 21,911 individuos (Punt y Wade, 2010). Mientras que la Población Asiática, que a principios de 1970 se pensaba que estaba extinta (Bowen, 1974), tiene una población remanente (Weller *et al*., 2002), que se encuentra en peligro crítico. Las estimación poblacional para el año 2008 fue de 130 individuos (Cooke *et al*., 2008) y para el 2012 de 155 individuos (IUCN), con una tasa de crecimiento anual de 2.5% (Brownell *et al*., 2010).

*Movimientos migratorios de la Ballena Gris*

Para conocer los movimientos migratorios que realizan las ballenas grises, se han utilizado varías técnicas de estudio: la foto-identificación, el uso de marcas satelitales y en menor grado la comparación del ADN nuclear por medio de microsatélites. La foto-identificación es una técnica no invasiva y relativamente económica, la cual brinda gran cantidad de información de los animales así como de sus rutas migratorias. En el caso de las ballenas grises Asiáticas, estudios apoyados en la técnica de foto-identificación han documentado la fidelidad a un sitio de alimentación (Weller *et al.,* 1999) y el flujo de animales entre las dos principales zonas de alimentación del Pacífico Noroeste (Tyurneva *et al*., 2010; Burdin *et al*., 2011).

Mientras que en México, mediante la foto-identificación, se ha demostrado la existencia de fidelidad interanual por parte de las ballenas grises a la laguna de San Ignacio B.C.S. (Swartz y Jones, 1983; Jones 1990, Urbán y Gómez-Gallardo 2000) y se han calculado los tiempos de residencia en esta laguna (Urbán *et al*., 1999).

Recientemente, en octubre de 2010, un equipo de científicos de Rusia y Estados Unidos, colocaron una marca satelital en una ballena gris afuera de la costa de la isla Sakhalin (Rusia). Esta ballena fue seguida durante cuatro meses, tiempo durante el cual, viajó de la zona de alimentación fuera de la isla Sakhalin, hacía la costa Oeste de los Estados Unidos (Mate *et al*., 2011). Subsecuentes comparaciones de la foto-identificación de esta ballena (llamada Flex) fueron hechas con el catálogo de la institución Cascadia Research Collective, revelando que esta ballena había sido previamente identificada fuera de la costa de Vancouver en abril de 2008 (Weller *et al*., 2011). Posteriormente, en el 2012, a otra ballena (Varvara) se le colocó otra marca satelital cerca de la Isla Sakhalin en Rusia y fue rastreada migrando hacia la Península de Baja California, llegando hasta la zona de Los Cabos, e ingresando a la laguna San Ignacio en su camino de regreso a Rusia. Las marcas satelitales, así como los registros fotográficos han renovado la pregunta: ¿cuál es el potencial de movimiento de las ballenas grises entre en Pacifico Noreste y Noroeste?

## PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

### *Justificación.*

Tradicionalmente se ha considerado que actualmente existen dos poblaciones de ballena gris en el Océano Pacífico: la Población Asiática, en un estado de conservación muy pobre y la Población Americana, posiblemente recuperada después de su cacería comercial. Hallazgos recientes muestran una posible mezcla de estas poblaciones en las lagunas costeras de la Península de Baja California, durante la época de reproducción. Por lo que es necesario determinar la identidad poblacional de las ballenas grises que utilizan las lagunas costeras de la Península de Baja California, así como los destinos migratorios de los que provienen y determinar la importancia que estas lagunas tienen en la recuperación de la especie en ambas poblaciones.

*Hipótesis.*

En las lagunas costeras de la Península de Baja California existe una segregación de las ballenas grises provenientes de las diferentes zonas de alimentación, entonces se observaran diferencias en la diversidad genética (subestructura poblacional) para cada una de estas congregaciones.

*Objetivo general.*

Determinar la Identidad Poblacional de la ballena gris (*Eschrichtius robustus*) en la Península de Baja California, México.

*Objetivos específicos.*

- Determinar la relación entre las ballenas grises de las lagunas; Ojo de Liebre, San Ignacio y Bahía Magdalena con base en la foto-identificación

- Determinar la relación entre las ballenas grises de las lagunas de Ojo de Liebre, San Ignacio y Bahía Magdalena con base en su diversidad genética.

- Determinar la relación entre las ballenas grises de la Población Asiática con las ballenas que visitan las lagunas costeras de la Península de Baja California, con base en la foto-identificación

- Determinar la relación entre las ballenas grises de la Población Asiática con las ballenas que visitan las lagunas costeras de la Península de Baja California, con base en su diversidad genética.

ZONA DE ESTUDIO

La zona de estudio para la realización de este trabajo, está compuesta por las tres lagunas costeras que se encuentran ubicadas en la costa Occidental de la Península de Baja California. Estas lagunas son de Norte a Sur: Laguna Ojo de Liebre, Laguna San Ignacio y Complejo lagunar Bahía Magdalena - Bahía Almejas (Figura 5).

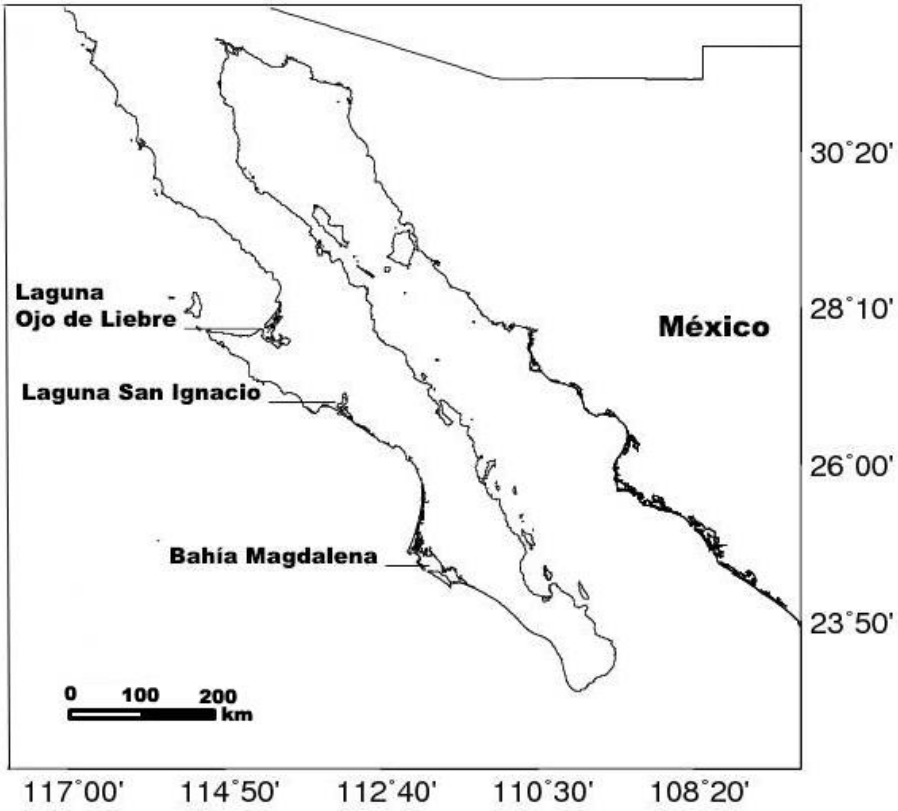



Figura 5. Localización de las tres lagunas costeras donde se congregan las ballenas grises en México.

En México, en el año de 1972, se estableció a la laguna Ojo de Liebre como el primer refugio de ballenas del mundo, mientras que en 1988 se declaró a la laguna San Ignacio como parte de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno, junto con la laguna de Guerrero Negro, finalmente en 1993 la UNESCO nombró a las lagunas Ojo de Liebre y San Ignacio como sitios patrimonio de la humanidad.

*Laguna Ojo de Liebre.*

La laguna Ojo de Liebre se localiza en el noroeste de Baja California Sur, entre los 27˚ 35’ y 27˚55’ de latitud Norte y los 113˚58’ y los 114˚20’ de longitud W (Figura 6), tiene un área Aproximada de 446 km$^2$ y presenta una batimetría irregular, con una gran cantidad de bajos e islas planas que se hacen evidentes durante las mareas bajas (Álvarez y Granados, 1992).

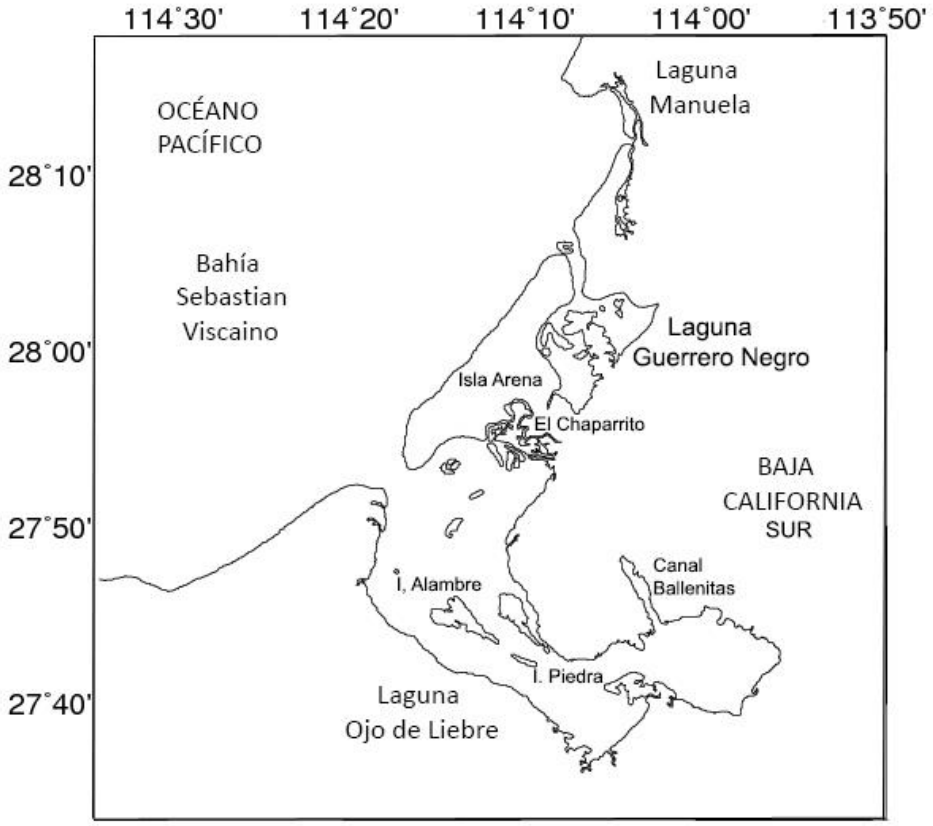



Figura 6. Lagunas Ojo de Liebre y Guerrero Negro

Esta laguna, que desemboca en la Bahía Sebastián Vizcaíno, en general es somera, pero presenta canales de más de 20 metros de profundidad cerca de la boca. Se caracteriza por ser una laguna de tipo hiperhalino, debido a que no recibe ningún aporte de agua dulce y porque presenta un alto grado de evaporación, por efecto del viento y la insolación (Alvarado *et al*., 1986). La temperatura y la salinidad promedio

máximas ocurren en verano con valores de 25.5˚C y 39 ‰ respectivamente, mientras que los mínimos en invierno con valores de 18˚C y 35 ‰ (Acevedo, 1997). La amplitud de marea es de uno a tres metros. Las corrientes en la parte baja muestran velocidades aproximadas de 2.5 nudos, en la parte media de 1.5 a 2 nudos y en el interior de 0.3 a 1.5 nudos (Contreras, 1985).

*Laguna San Ignacio.*

La laguna San Ignacio, se encuentra ubicada en la costa occidental de la Península de Baja California, entre los 26˚43' y los 27˚00' de latitud N y de los 113˚16' a los 113˚08' de longitud W (Figura 7). Esta laguna forma parte de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno y está localizada dentro de una planicie costera, rodeada por tres cadenas montañosas. Al suroeste su boca se abre hacía la Bahía de Ballenas.

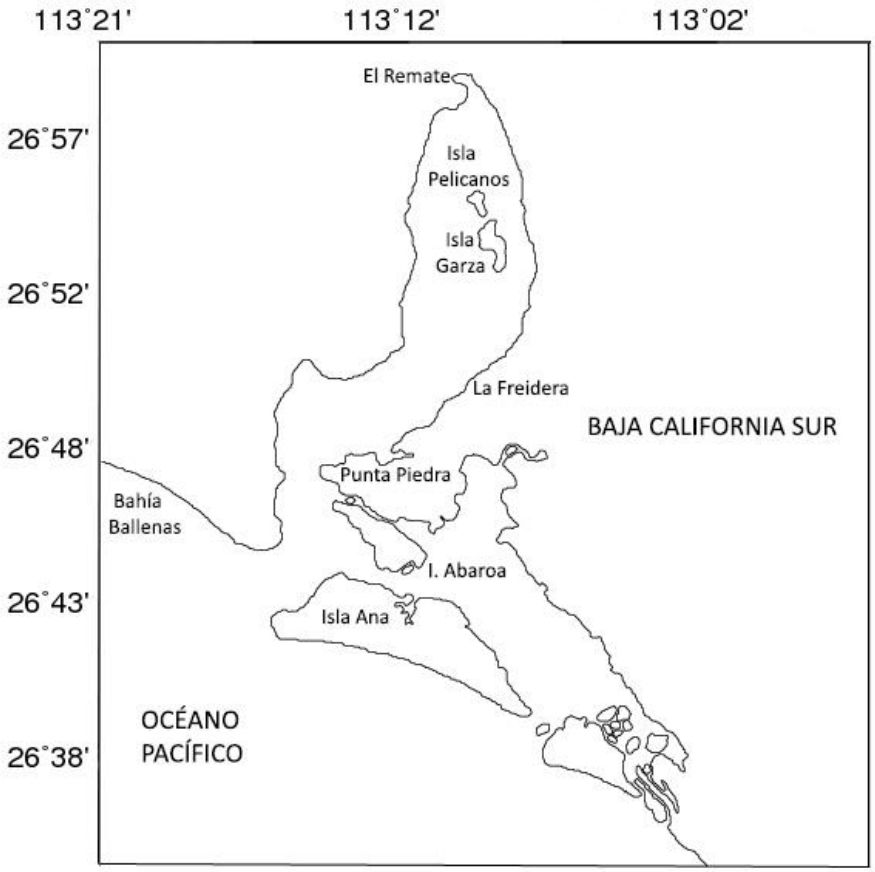



Figura 7. Laguna San Ignacio, B.C.S.

Es una laguna costera semi estuarina, la cual tiene una longitud máxima, de norte a sur de 30 km y un ancho máximo de 6.5 km. Se encuentra protegida del océano abierto por la Isla Ana, sin embargo se comunica con el océano mediante una red de canales, los cuales son mantenidos por la acción de fuertes corrientes de marea y ésta es la razón por la cual las propiedades de las aguas de la laguna son diferentes de las propiedades del océano abierto. (Winant y Gutiérrez, 1999).

El interior de la laguna hay una cuenca y un sistema de canales separados por bajos, muchos de los cuales afloran durante las mareas bajas. La mayor parte de la laguna es somera y su profundidad varía desde los 20 metros cerca de la boca, hasta los 2 metros en su porción más interna. En el extremo norte de la laguna, denominado el Remate, el viento sopla persistentemente hacia el sur y genera patrones de circulación, los cuales son responsables de la mezcla del agua y los nutrientes. Los vientos dominantes en el invierno son del noroeste y suroeste.

El clima de la región es semi cálido, muy seco, con una temperatura media anual entre 18 y 22°C, con una precipitación anual de 56 mm (Contreras, 1993); sin embargo no existen escurrimientos o arroyos de agua dulce alrededor de la laguna (Jones *et al*., 1984). Las mareas semi-diurnas varían de 0.9 a 2.4 m, causando fuertes corrientes turbulentas en la cuenca y los canales (Swartz y Jones, 1981). Su costa está compuesta por playas arenosas, conglomerados de roca, conchas, manglares, pantanos y planicies de lodo y sal (Dedina y Young, 1995).

La laguna San Ignacio provee el hábitat para un número importante de plantas y animales terrestres y marinos (Galina *et al,.* 1991). La vegetación principalmente es halófila (se desarrolla en zonas de acumulación de sales), además, podemos encontrar mangles como *Laguncularia racemosa* (mangle blanco) y *Rhizophora mangle* (mangle rojo). Sin embargo, existen áreas dentro de la laguna que carecen de vegetación debido a que presentan un alto grado de salinidad (Dedina y Young 1995).

*Complejo Lagunar Bahía Magdalena – Bahía Almejas.*

La Bahía Magdalena se localiza entre los 24°30’ y los 24°48’ de latitud N y los 111°51’ y los 112°09’ de longitud W (Figura 8). Cubre un área de 883 $km^2$ cuadrados y se caracteriza, en el sector norte, por una zona somera con canales de una profundidad inferior a 10 m. En la parte central la profundidad es mayor de 20 m, con un canal profundo de hasta 38 m, que comunica a la bahía con el océano a través de una amplia boca de 5.6 km de ancho, ubicada entre Punta Entrada (Isla Magdalena) y Punta Redonda (Isla Margarita). La profundidad de la parte central disminuye hacia el oriente, con una pendiente suave hacia la costa, quedando expuestos extensos bancos de arena durante períodos de bajamar, hacia el este y noreste de la bahía (Álvarez-Borrego *et al*., 1975).

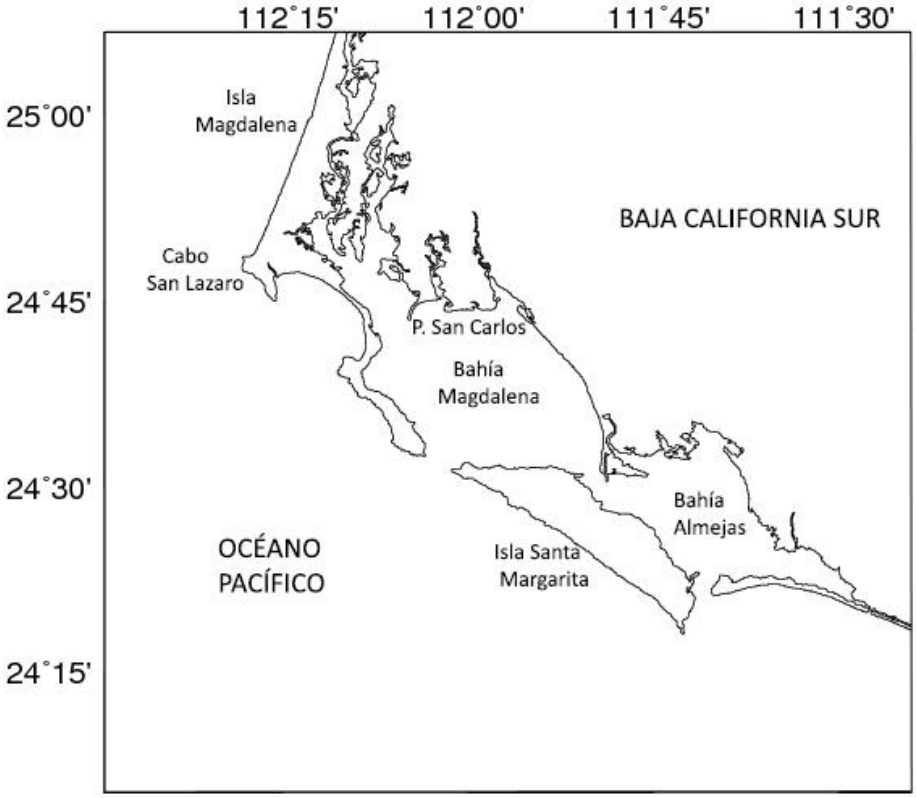



Figura 8. Complejo Lagunar Bahía Magdalena-Bahía Almejas.

El clima es seco, semi-cálido, con una temperatura promedio anual superior a los 18°C, una temperatura mínima en enero de14.5°C y máxima en agosto-septiembre de 32°C. La bahía presenta condiciones anti-estuarinas como resultado de una reducida tasa de precipitación y escasa afluencia de agua dulce, así como de una elevada tasa de evaporación. Sus principales recursos hídricos continentales son de origen lotico (arroyos temporales, estuarios y canales). Esta región presenta una precipitación anual promedio que fluctúa entre 48 y 153 mm (Álvarez-Borrego *et al*., 1975).

## MÉTODOS

*Trabajo de campo.*

El trabajo de campo, se realizó durante las temporadas invernales (de enero a abril) de los años 2012 a 2014, en la laguna de San Ignacio, de 2012 y 2013 en la Bahía Magdalena, y durante el 2013 y 2014 en la laguna Ojo de Liebre. El trabajo de campo estuvo dividido en tres partes: Registro General de Avistamientos (RGA), Foto-identificación y toma de biopsias de piel de las ballenas grises.

*Registro General de avistamientos.*

En cada avistamiento de ballena gris se registraron los datos correspondientes a las características del avistamiento de estos cetáceos (fecha, hora de inicio y fin del esfuerzo del día, hora de inicio y fin del avistamiento, número de avistamiento, tipo de agrupación, número de animales en la agrupación, número de fotografías tomadas) y las condiciones climáticas de la localidad (Nubosidad, visibilidad, dirección del viento, temperatura superficial del agua, profundidad, beaufort), así como las notas relacionadas con las fotografías de los individuos y la toma de biopsias.

*Foto-identificación.*

Se tomaron fotografías de la parte dorsal de las ballenas grises, tanto del lado derecho, como del lado izquierdo, esto se realizó con la ayuda de una cámara digital reflex

(Canon 50N), con  un lente de 70 a 300 mm, una velocidad de disparo de la cámara de 1/1000 segundo y una sensibilidad a la luz de 200 ISO.

Para tomar dichas fotografías se aproximó la embarcación paralelamente a las ballenas a una distancia entre los 5 y 20 metros con la finalidad de tener una fotografía de buen tamaño y resolución. Las fotografías se tomaron con la finalidad de registrar individualmente a cada ballena por medio de su coloración distintiva y de sus marcas (Figura 9).

Figura 9. Foto-identificación del costado derecho de una ballena gris

Los datos de cada ballena se registraron en un formato de foto-identificación por avistamiento, en el cual se registraron las fotografías tomadas a cada individuo en cada uno de los avistamientos.

Todos los días, durante el trabajo de campo, los datos obtenidos en el registro general de avistamientos así como los formatos de foto-identificación por avistamiento, fueron pasados a un archivo de Excel, y de igual forma, todos los días se revisaron cada una de las fotografías tomadas para determinar con exactitud el número de individuos observados y seleccionar de cada uno de ellos, la mejor foto-identificación para ese día. Posteriormente, al día siguiente, las mejores foto-identificaciones seleccionadas del día anterior, fueron comparadas visualmente (utilizando el programa ACDSee 2.5)

con todas las fotografías obtenidas hasta ese momento, con la finalidad de seleccionar las mejores fotos de cada individuo y hacer los catálogo de foto-identificación por año y por área de congregación.

*Colecta de Biopsias*

Para la colecta de biopsias se utilizó una ballesta (Marca Barret, de 180 libras de tensión), así como una flecha de aluminio o fibra de carbono, con un flotador y con una punta modificada. El flotador esta hecho de espuma de sílice, lo que le permite flotar y le da ligereza a la flecha, mientras que la punta de la flecha está hecha de acero inoxidable y es un cilindro de aproximadamente dos centímetros de largo por ocho milímetros de diámetro, con tres pequeñas puntas en su interior que sirven para retener la muestra dentro del cilindro. En su parte posterior, el cilindro presenta una rosca o cuerda que la une a la flecha, mientras que en la parte anterior el cilindro esta rebajado en forma de bisel.

Las flechas son disparadas con la ballesta a una distancia de entre 15 y 25 metros. Al insertarse la punta en la piel y parte de la grasa y pegar el flotador con el dorso de la ballena, éste impulsa de regreso la flecha, quedando la flecha con la muestra en la superficie del mar (figura 10).

Figura 10. Procedimiento para colectar las biopsias de piel de ballena gris.

Una vez colectada la biopsia, la piel fue separada de la grasa con la ayuda de un bisturí y pinzas estériles y esta piel fue almacenada en etanol absoluto, en viales también estériles. Cada biopsia fue rotulada con los datos del avistamiento y a su vez, ésta fue anotada en el registro general de avistamientos, con el número de biopsia, individuo, avistamiento y foto-identificaciones del animal. El objetivo propuesto fue colectar 50 biopsias en cada una de las lagunas costeras, por cada año de muestreo, es decir un total de 100 muestras por cada laguna.

*Trabajo de escritorio.*

Después de finalizar el trabajo de campo, y revisar todas las foto-identificaciones entre sí, a cada uno de los individuos foto-identificados se le asignó una clave de identificación con los siguientes datos: primero dos dígitos para el año en el que fue registrado, seguido de cuadro dígitos correspondientes a un número serial, posteriormente la letra D o I de acuerdo al lado del dorso que fue fotografiado, seguido de las iniciales de la laguna donde se registró (LSI para laguna de San Ignacio, LOL para laguna Ojo de Liebre y BM para Bahía Magdalena) y finalmente la letra M en caso de ser una hembra con cría). Ejemplo: 12-0001-D-LSI-M.

*Movimientos entre lagunas.*

Una vez completados los catálogos de foto-identificación de las lagunas, para los años 2012, 2013 y 2014, todos los individuos foto-identificados desde el año 2001 hasta el 2014 fueron comparados visualmente entre sí, utilizando el programa ACDSee 2.5. Los datos obtenidos de las comparaciones fueron analizados para determinaran el índice de intercambio (movimientos) entre las lagunas de congregación.

Para obtener este parámetro se utilizó la siguiente ecuación:

$$Nc = (nXY/nX * nY) * 1000$$

Donde $Nc$ es el valor de intercambio o de recapturas entre zonas, $nXY$ es igual al número de recapturas entre las zonas $X$ y $Y$. El valor de $nX$ representa el número total de individuos identificados en la zona 1 y $nY$ es el número total de individuos identificados en la zona 2 y finalmente el valor obtenido se multiplicó por mil, para hacerlo un dato más manejable. El índice de intercambio es el inverso del estimador de Petersen para estimar el tamaño poblacional y puede tener valore entre 0 y 1. Un valor alto (cercano a 1) del índice de intercambio ($Nc$) ocurre como consecuencia de la presencia de una población pequeña o una alta probabilidad de que el mismo individuo sea recapturado en ambas congregaciones, mientras que un valor bajo (cercano a 0) indica una baja probabilidad de recaptura como consecuencia de una población muy grande o que no haya intercambio de animales entre las dos congregaciones (Urbán, 2001).

Para determinar si la distribución de las ballenas grises es homogénea entre las lagunas, se realizó una prueba de *Ji*-cuadrada.

$$x^2 = \sum_{i=1}^{3} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Donde *O* es el número de recapturas observadas para cada par de congregaciones y *E* es igual al número de recapturas esperadas en ese mismo par de congregaciones.

Para determinar el número de recapturas esperadas (*E*), es necesario conocer el número total de comparaciones pareadas (que es la sumatoria de las comparaciones realizadas entre las tres zonas de congregación), así como la proporción de comparaciones pareadas aportadas por cada par de zonas de congregación, es decir, que parte del total fue aportada por cada par de zonas.

Una vez obtenidos estos resultados, el valor de recapturas esperado (*E*) será el producto del número total de comparaciones pareadas, por la proporción de comparaciones entre dos zonas de congregación determinadas. Mientras que, en el

caso de las recapturas observadas (*O*), éstas son las obtenidas de la comparación directa de las foto-identificaciones de las mismas dos zonas de congregación.
Si existe la misma probabilidad de encontrar a un animal, en cualquier zona, entonces el número de recapturas debe ser proporcional a las comparaciones pareadas que se hagan entre las diferentes regiones (Urbán, 2001)

Finalmente, se suman los valores obtenidos de los tres pares de congregaciones (lagunas) y se obtiene el valor de *Ji*-cuadrada. Este valor obtenido es evaluado en la tabla de *Ji*-cuadrada de acuerdo a sus grados de libertad (gl= número de grupos -1) y si el valor obtenido de la prueba es mayor al encontrado en la tabla de *Ji*-cuadrada, se dice que el valor de la prueba es estadísticamente significativo y por lo tanto las probabilidades de recapturas entre congregaciones, para cada par de regiones, son diferentes.

*Relación entre las zonas de reproducción en México, con las zonas de alimentación en el Pacífico Noroeste.*

Para determinar qué proporción de las ballenas de la Población Asiática se reproducen en México, se compararon las foto-identificaciones obtenidas entre 2001 y 2013 en México, contra las registradas en las aguas de la Isla Sakhalin y la Península de Kamchatka Rusia de los años 2004 a 2011 y al igual que para los movimientos entre lagunas, se estimó el índice de intercambio y se realizó una prueba de Ji-cuadrada.

*Extracción del ADN de las muestras de piel.*

El proceso de extracción y amplificación del ADN fue llevado a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Se realizó la extracción del ADN siguiendo el protocolo de Miller *et al*. (1998), con la técnica de cloruro de sodio. Para llevar a cabo la lisis para liberar al ADN del interior celular, como primer paso, una pequeña parte de la muestra de piel fue cortada en trozos muy pequeños en un espacio estéril, en seguida se le agregaron 20µl de

proteinasa (*K*), la cual degrada las proteínas o enzimas. También se le agregaron 400µl de un buffer de extracción o de lisis que contiene sales (*NaCl* a 100mM), las cuales forman una capa iónica suave que recubre al ADN, protegiéndolo y ayudando a evitar su degradación; Tris pH 8 a 50mM, para mantener el pH estable; ácido etileno amino tetra acético (EDTA pH 8 a 100mM), el cual desestabiliza la membrana celular e inhibe a las ADNasas; detergentes, como sodio dodecilo sulfato (SDS al 1%) y agua des-ionizada. Posteriormente se incubaron las muestras a 60°C por 24 horas, esto facilitó la ruptura de los lípidos en la membrana celular, permitiendo la liberación del ADN de la estructura celular; en seguida se maceraron manualmente con la ayuda de unos pistilos y nuevamente se incubaron por 30 minutos más a 65°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se le agregaron 200µl de cloruro de sodio saturado (*NaCl* 6M), se agitó vigorosamente por un minuto y se incubó en hielo por 10 minutos. Con la adición de la sal, el ADN que está cargado negativamente, obtiene una capa iónica positiva que permite su precipitación. Se centrifugó la mezcla por 10 minutos a 10,000 RPM y de 500 a 600µl del sobrenadante fueron trasferidos a un tubo con 1ml de etanol absoluto, centrifugando por 5 minutos más a 13,000 RPM. Se eliminó el sobrenadante y la parte decantada se lavó con 500 µl de etanol al 70% para eliminar todas las sales que permanecieron en la solución, nuevamente se centrifugó por 5 minutos a 13,000 RPM y se eliminó el sobrenadante. El botón de ADN se centrifugo al vacío por aproximadamente 3 minutos, para extraer los residuos de etanol y finalmente el material obtenido se resuspendió con agua grado molecular (de 30 a 100 µl, según el tamaño del pelet de ADN). En seguida, se cuantificó la concentración del ADN presente en la muestra, previa homogenización utilizando un Nano fotómetro (marca IMPLEN). Una vez cuantificada la concentración de ADN, se hicieron diluciones para obtener una concentración de 100 *ng/µl* de ADN en la muestra.

Posteriormente, se amplificó el fragmento de la región control del ADN mitocondrial, vía reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR creada por Mullis y colaboradores en 1985, es una técnica utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN, cuya secuencia se conoce.

La reacción se hizo en un volumen de 17 µl de una mezcla maestra por cada muestra que se deseaba amplificar. La solución para cada muestra, está formada por; 11 µl de agua grado molecular libre de nucleasas, 0.7 µl de 50mM $MgCl_2$, el cual crea las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente, 1 µl de deoxinucleotidos (dNTPs), 1.7 µl de solución buffer (10x), 0.1 µl de la enzima (taq platinum de Invitrogen) y 0.9 µl de oligonucleótidos (primers forward y reverse) necesarios para que se inicie la transcripción; inicialmente se usaron primer universales (18s) y posteriormente se utilizaron los primers “B” 5’-TACCAAATGTATGAAACCTCAG-3’ (Rosel *et al*., 1995), y el “TRO” 5’-CCTCCCTAAGACTCAAGG-3’ (SWFSC). Es necesario que uno de los oligonucleótidos o primers tenga la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del ADN y el otro deberá llevar la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se quiere amplificar (por lo cual se les llama primers *forward* y *reverse*). A esta mezcla (17 µl) se le agregó 1 µl de ADN con una concentración de 100ng/µl, posteriormente las muestras se colocaron en un termociclador (Eppendorf Mastercicler-Pro), el cual se programó con valores probados y seleccionados previamente.

El termociclador para llevar a cabo la síntesis, requiere de tres fases, es decir que calienta o enfría los tubos a tres temperaturas distintas, que se repiten una y otra vez, lo que se conoce como ciclos de reacción. En la primera fase, que es la desnaturalización, los fragmentos de ADN fueron calentados 94°C por 45 segundos, lo cual reduce la doble hélice a una cadena sencilla, y esta hebra entonces es accesible para los primers. En la segunda fase, que es el alineamiento, la mezcla fue enfriada por 45 segundos a 60°C, a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrogeno entre los oligonucleótidos y el ADN, y aquellas uniones más estables (las que son complementarias) duraran mayor tiempo, quedando los oligonucleótidos “alineados” formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5’ a 3’; al agregar unas bases más, los puentes de hidrogeno que se forman entre las bases estabilizan más la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio.

En la tercera fase, que es la extensión, la temperatura fue subida a 72°C por 45 segundos. A esta temperatura la polimerasa alcanza su máxima actividad. La polimerasa continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado. El ciclo de reacción (calentamiento y enfriamiento) se repitió 35 veces, estimulando a los primers para unirse a las secuencias originales para sintetizar secuencias nuevas. Finalmente se le dio un período de extensión por 7 minutos a 72°C.

Los productos obtenidos de la PCR fueron determinados mediante un gel de electroforesis. La electroforesis, permite separar los fragmentos obtenidos por la PCR, de acuerdo al tamaño de cada uno. La agarosa del gel forma una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, por la cual se obliga a que pasen los fragmentos de ADN, “jalándolos” por medio de corriente eléctrica, hacia el polo positivo, ya que la carga de una molécula de ADN es negativa por la presencia de grupos fosfato (P-). Para la elaboración del gel se mezclaron dos gramos de agarosa al 2% con 100 ml de agua destilada, esto se mezcló y se calentó en un horno de microondas por aproximadamente 45 segundos, en seguida se le agregó una gota de bromuro de etidio por cada 30 ml de agarosa y se vertió en la placa de acrílico, para que polimerizara el gel por aproximadamente 20 minutos.

Una vez polimerizado el gel, se colocó en la caja de electroforesis (BIO-RAD Subcell GT), la cual se rellenó con Buffer TAE (Tris Acetatos EDTA). Se colocaron 3 µl de los productos de la PCR en cada uno de los pocillos, colocando al final un estándar (escalera) que indica el tamaño de pares de bases y una mezcla (control positivo y un control negativo). Se dejó correr el gel por 45 minutos a 90 volts y una vez finalizado esto, los productos fueron visualizados colocándolos bajo luz UV en un lector de geles (Alphaimagen HP).

Posteriormente los fragmentos amplificados, fueron enviados a secuenciar a los laboratorios GENEWIZ y una vez obtenidas las secuencias, estas se alinearon y se revisaron mediante el programa MEGA (5.2).

Con los haplotipos obtenidos de las tres lagunas para los dos años de muestreo, se determinaron la diversidad nucleotídica($\pi$), que es la probabilidad de que dos sitios homólogos elegidos aleatoriamente (nucleótidos) sean diferentes (Tajima, 1983) y la diversidad haplotípica, que se define como la probabilidad de que dos haplotipos elegidos aleatoriamente sean distintos, la cual se calcula mediante la formula $h = 1 - \Sigma p_I^2$, donde $p_i$ es la frecuencia del I-ésimo haplotipos (Nei, 1987). La diversidad haplotípica es afectada, tanto por el número de haplotipos presentes en una población, así como por su frecuencia relativa. Si existen una gran cantidad de haplotipos y sus frecuencias relativas son iguales, entonces el valor de la diversidad haplotípica (*h*) será alto (cercano a 1), mientras que si existen pocos haplotipos o sus frecuencias relativas son desiguales (es decir, que predomina un haplotipo en la mayoría de las muestras), el valor de la diversidad haplotípica será bajo (Le Duc *et al*., 2002).

Se estimó la diferenciación genética entre las lagunas, mediante un análisis de varianza para datos moleculares (AMOVA, Excoffier *et al*., 1992), con la ayuda del programa Arlequin (Schneider *et al*., 2000). El programa Arlequin, calcula la divergencia entre poblaciones mediante el índice de Fst.

El estadístico $F$ es una herramienta para describir la separación de la diversidad genética dentro y entre poblaciones. Wright en 1951, mostró que la cantidad de diferenciación genética dentro de una especie o población, representa un balance entre las fuerzas evolutivas. La diversidad genética, es generada por las mutaciones, modificada por el efecto de la selección natural (eficacia biológica), la deriva génica (estocastisidad, genética y demográfica) y la migración. El balance entre la selección y la deriva génica depende del tamaño poblacional y de la intensidad de la selección. Cuando ambos factores están actuando, la selección predomina en las poblaciones grandes y la deriva en las poblaciones pequeñas. Las poblaciones grandes que presentan mucha migración entre ellas, tienden a ser poco diferenciadas, mientras que poblaciones pequeñas, con poca migración tiende a ser muy diferentes. El índice Fst es la medida más usada para esta diferenciación (Frankham *et al*. 2009).

Fst es la proporción de la diversidad genética debido a las diferentes frecuencias alélicas entre poblaciones o la correlación entre alelos dentro de las poblaciones con respecto a la población entera. El índice Fst, está relacionado directamente con la varianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones e inversamente con la similitud entre individuos de una misma población; si Fst es pequeña, entonces las frecuencias alélica dentro de cada población son muy similares y si es grande, entonces las frecuencias alélicas son muy diferentes.

*Relación de la diversidad genética de las lagunas costeras de la Península de Baja California, con la diversidad genética de la Población Asiática*

Una vez conocidas las relaciones entre las ballenas de las tres lagunas, se compararon los haplotipos y las frecuencias haplotípicas de las ballenas grises de las lagunas Mexicanas con los de las ballenas grises del Pacifico Noroeste de los trabajos de Le Duc *et al*., 2002 (muestras disponibles en el GenBank #AF326789-AF326824) y Lang 2010 (muestras pertenecientes a la South West Fisheries Science Center y solicitadas a los autores). Para ellos se realizaron las mismas pruebas efectuadas entre las lagunas.

REFERENCIAS

Acevedo, C.A., 1997. Caracterización ecológica de la comunidad íctica de la laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 108 p.

Alvarado, B.J., Galindo, J., Iwadane M., Migoya, K.R. y Vázquez, M. 1986. Evaluación de los parámetros ambientales y su relación con la distribución y movimientos de la ballena gris Eschrichtius robustus en la laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. Ciencias Pesqueras- IPN (5): 33-49.

Álvarez-Borrego, S., Galindo-Bect, L. y Chee-Barragan A. 1975. Características hidroquímicas de Bahía Magdalena, B.C.S. Cienc. Mar., 2: 94-110.

Álvarez, B. y Granados, A. 1992. Variación espacio temporal de temperatura en un hábitat de invierno de la ballena gris: laguna Ojo de Liebre. Ciencias Marinas 18(1):151-165.

Berzin, A.A y Vladimirov, V.L, 1981 Changes in the abundance of whalebone whales in the Pacific and Antartic since the cessation of their exploitation. Rep INt whal. Commn.31, 495-498

Bowen, S.L., 1974. Probable extinction of the Korean Stock of the gray whale (*Eschrichtius robustus*). J. Mammal. 55(1): 208-9

Brownell, R.L, Donovan, G.P., Kato, H., Larsen, F., Mattila, D., Reeves, R.R., Rock, Y., Vladimirov, V., Weller, D y Zhu, Q. 2010. Conservation Plan for Western North pacific Gray Whale, WGW Conservation Plan, SC/62/BRG 24

Burdin, A.M., Bradford, A. L., Tsidulko, G.A. y Sidorenko, M. 2011. Status of western gray whales off northeastern Sakhalin Island and eastern Kamchatka, Russia in 2010. Paper SC/63/BRG8 presented to the IWC Scientific Committee. 10 pp.

Calambokidis, J., Steigner, G.H., Evenson, J.R., Cubbage, J.C. y Osborne, R.W. 1991. Gray whales in Puget Sound and the Strait of Juan de Fuca. Proceeding of Puget Sound Research, 91, Seattle Washington: 414-422 pp.

Calambokidis, J., Laake, J.L. y Klimek, A. 2010. Abundance and population structure of seasonal gray whales in the Pacific Northwest, 1998-2008. Paper SC/62/BRG32 presented to the IWC Scientific Committee, May 2010. 50 pp.

Contreras, E. F. 1985. Ecosistemas Costeros Mexicanos. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México. 253 pp.

Contreras, E. F. 1993. Ecosistemas Costeros Mexicanos. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Mexico. 415pp.

Cooke, J., Weller, D.W., Bradford, A.L., Burdin, A.M. y Brownell, R.L, Jr. 2008. Population assessment of western gray whales in 2008. Paper SC/60/BRG11 presentado en el Comité Cuientífico de la IWC. 10pp

Darling, J. 1977. Aspects of the behavior and ecology of Vancouver islands gray whales. Eschrichtius glaucus Cope M.Sc. Thesis University of Victoria, Victoria British Columbia.

Dedina, S. y Young, E. 1995. Conservation and development in the Gray Whale lagoons of Baja California Sur, México. *Report to the U. S. Marine Commission*. Contract No. T 10155592.

Deméré, A. T., 2008 Evolutionary Biogeography and Paleontology of Eschricthtiid Whales, Gray Whales and Climate Change Workshop.

Excoffier, L., Smouse, P.E. y Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.

Frankham, R., Ballou, J.D. and Briscoe, D.A. 2009. Introduction to Conservation Genetics, 2nd edn. Cambridge University Press: Cambridge, UK.

Frasier, R. T., Koroscil, S.M., White, N.B. y Darling, J.D. 2011. Assessment of population structure in relation to summer feeding ground use in the eastern North Pacific gray whale

Galina, P.S., Álvarez, A., González, R. y Gallina, S. 1991. Aspectos generales sobre la fauna de vertebrados. pp. 177-209 En: A. Ortega y L. Arriaga (Eds.) La reserva de la biosfera el Vizcaíno en la Península de Baja California. CIB. La Paz, B.C.S. 317 pp.

Henderson, D.A. 1972. *Men and Whales at Scammon's Lagoon*. Libreria Dawson, E.U. 313pp.

Henderson, D.A. 1984. Nineteenth century gray whaling: grounds, catches and kills, practices and depletion of the whale population. pp. 159-86. *In:* M.L. Jones, S.L. Swartz and S. Leatherwood (eds.) *The Gray Whale, Eschrichtius robustus*. Academic Press, Inc., Orlando, Florida. XXIV 600pp.

Henderson, D. 1990. Gray whales and whalers on the China coast in 1869. *Whalewatcher* 24(4):14-16.

Ilyashenko Y.V. 2013 Aboriginal Harvest of Gray and Bowhead Whales in the Russian Federation in 2008 – 2012. Sc/65a/BRG24. IWC Meeting Report.

IUCN 2012. Report of the 11th Meeting of the Western Gray Whale Advisory Panel. Geneva, Switzerland. (www.iucn.org/wgwap/publications_and_reports/)

Jones, M.L., S.L. Swartz, y Dahlheim, M.E. 1984. Census of gray whale abundance in San Ignacio Lagoon: a follow-up study in response to low whale counts recorded during an acoustic playback study of noise-effects on gray whales. U.S. Department of Commerce N.T.I.S. Publication PB 86-2190778, 69 pp.

Jones, M.L. 1990. The reproductive cycle in gray whales based on photographic resightings of females in the breeding grounds from 1977-82. Rep Int Whal Commn. 12(special issue):177–182.

Kato, H. y T. Kasuya. 2002. Some analyses of the modern whaling catch history of the western North Pacific stock of gray whales (*Eschrichtius robustus*), with special reference to the Ulsan whaling ground. J. Cetacean Res. Manage. 4:277–282.

Lang, A.R., Weller, D.W., LeDuc, R., Burdin, A.M., Pease, V.L., Litovka, D., Burkanov, V. y Brownell, Jr. R.L. 2010. Genetic analysis of stock structure and movements of gray whales in the eastern and western North Pacific. Rep CBI. SC/63/BRG 10.

Lang, A.R., Taylor, B.L., Calambokidis, J.C., Pease, V.L., Klimek, A., Scordino, J., Robertson, K.M., Litovka, D., Burkanov, V., Gearin, P., George, J.C. y Mate, B. 2011. Assessment of stock structure among gray whales utilizing feeding grounds in the eastern North Pacific. Paper SC/M11/AWMP4 presented to the IWC Scientific Committee, 22 pp.

Le duc, R.G., Weller, D.W., Hyde, J., Burdin, A.M., Rosel, P.E., Brownell, R.L., Würsing, B. y Dizon, A.E., 2002. Genetic differences between western and Eastern gray whales (*Eschrichtius robustus*). J. Cetacean Res. Manage. 4(1): 1-5.

Mate B., Bradford A., Tsidulko G., Vertyankin V., and Ilyashenko V. 2011. Late-Feeding Season Movements of a Western North Pacific Gray Whale off Sakhalin Island, Russia and Subsequent Migration into the Eastern North Pacific. Paper SC/63/BRG23 presented to IWC Scientific Committee, Tromsö, Norway, june 2011.

Mead, J.G y Mitchell, E.D. 1984. Atlantic gray whales. Pp 33-53 en: Jones, M.L., Swartz S.L. y Leatherwood S. (eds.) The gray whale, (*Eschrichtius robustus*). Academic Press, Orlando Fl. XXIV, 600 pp.

Miller, S.A., Dykes, D.D. y Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research. 16 (3): 1225.

Nei, M. (ed). 1987. Molecular evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. 12 pp.

Nielsen, R. y Wakeley, J. 2001. Distinguishing migration from isolation: a Markov Chain Monte Carlo Approach. Genetics. 158: 885-896.

Omura, H. 1984. History of gray whale in Japan. en: Jones, M.L., S.L. Swartz y Leather Wood eds S. The gray whale, Eschrichtius robustus. pp. 57-77. Academic Press Inc. Ontario Florida.

Punt, E.A. y Wade P.R, 2010. Population Status of the Eastern North Pacific Stock of Gray Whales in 2009. NOAA Technical Memorandum NMFS-AFSC-207

Reeves, R., Stewart, S.B., Clapham, J.P y Powell, A.J. 2002. Guide to Marine Mammals of the world, National Audubon Society. 527 pp.

Reeves, R. y Smith. 2006. A taxonomy of world whaling: operations and eras. *In* J.A. Estes, D. P. DeMaster, D. F. Doak, T. M. Williams, and R. L. Brownell, Jr. (Editors), Whales, whaling, and ocean ecosystems, p. 82–101. Univ. Calif. Press, Berkeley.

Reeves, R.R., Smith, T.D., Lund, J.N, Lebo, A.S. y Josephson, A.E., 2010. Nineteenth-century ship-based catches of gray whales *Eschrichtius robustus*, in the Eastern North Pacific. Marine Fisheries Review. Vol 72. No. 1.

Rice, D.W. y Wolman, A.A. 1971 The Life History and Ecology of gray whale (Eschrichtius robustus). American Society of Mammalogists. Special Publication No. 3: 1-142 pp

Rice, D.W., 1981. Status of the eastern Pacific (California) stock of the gray whale. Pp. 181-187 *In* Food and Agriculture Organization. 1981. Mammals in the Seas. Vol. III. General Papers and Large Cetaceans. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Rosel, P.E., Dizon, A.E. y haygood, M.G. 1995. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbor porpoises, Phocoena Phocena, on interoceanic and regional scales. Can. J. Fish Aquat. Sci. 52: 1210-9.

Swartz, S.L. y Jones, M. L. 1981. Demographic studies and habitat assessment of gray whales (*Eschrichtius robustus*) in laguna San Ignacio, Baja California Sur, Mexico. U.S. Dept. of Commerce, N.T.I.S. PB 82-1233773, 56 pp.

Swartz SL, Jones ML. 1983. Gray whale (*Eschrichtius robustus*) calf production and mortality in the winter range. Rep Int Whal Commn. 33:503–507

Tyurneva, O.Y., Yakovlev, Y. M., Vertyankin, V. V., Gailey, G., Sychenko, O. y Muir, J.E. 2010. Photographic identification of the Korean-Okhotsk gray whale (Eschrichtius robustus) offshore northeast Sakhalin Island and southeast Kamchatka Peninsula (Russia), 2009. Paper SC/62/BRG9 presented to the IWC Scientific Committee, 12 pp.

Urban, R.J., Sumich, J., Culik, B.M., Ludwig, S., Gómez-Gallardo, U.A. y Palmeros, R.M. 1999. Demografía y ecología de la ballena gris en la Laguna San Ignacio, B.C.S. México, 1999. Reporte presentado al Instituto Nacional de Ecología (SEMARNAP). 46 pp.

Urbán, R.J. y Gómez-Gallardo, U.A. 2000. Whale watching and gray whales at Laguna San Ignacio, B.C.S. SC/52/WW12. Cambridge (UK): Scientific Committee of the International Whaling Commission.

Urban, R. J., 2001. Estructura Poblacional, abundancia y destinos migratorios de las ballenas jorobadas que inviernan en el Pacifico Mexicano. Tesis de Doctorado. U.N.A.M., 84 pp.

Weller, D.W., Wursig, B., Bradford, A.L., Burdin, A.M., Blokhin, S.A., Minakuchi, H. y Brownell, R.L. Jr. 1999. Gray whales (*Eschrichtius robustus*) off Sakhalin Island, Russia: Seasonal and annual patterns of occurrence. Marine Mammal Science 15:1208-1227.

Weller, D.W., Burding, A.M., Würsing, B., Taylor, B.L. y Brownell, R.L. Jr, 2002. The western gray whale: a review of past exploitation, current status and potential threats. J. Cetacean Res. Manage. 4(1): 7-12

Weller. W.D., Klimek, A., Bradford, A.L., Calambokidis, J., Lang A.R., Gisborne B., Burdin, A.M., Szanizlo W. and Brownell, R.L. Jr 2011. Movements of western gray whales from the Okhotsk Sea to the eastern North Pacific. Paper SC/63/BRG6 presented to the IWC Scientific Committee.

Winant, C.D. y Gutiérrez de Velasco G. 1999. Impacto del desarrollo de los Salitrales de San Ignacio sobre las corrientes y propiedades del agua de la Laguna San Ignacio, B.C.S. Reporte Técnico Final. Convenio con la UABCS No. 971343. Center for Coastal Studies, Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego. 59 pp.

Yablocov, A.V. y Bogoslovskaya, L.S. 1984. A review of Russian research on the biology and commercial whaling of the grey whale pp 465-85.

# CAPITULO II. RELACIÓN ENTRE LAS BALLENAS GRISES DE LAS LAGUNAS OJO DE LIEBRE, SAN IGNACIO Y BAHÍA MAGDALENA CON BASE EN LA FOTO-IDENTIFICACIÓN

## ANTECEDENTES

En México se han realizado diferentes estudios sobre parámetros biológicos de la ballena gris, utilizando la foto-identificación como herramienta principal. En la laguna San Ignacio, el primer estudio sistemático utilizando la foto-identificación fue conducido por Jones y Swartz entre 1978 y 1982 (Jones y Swartz, 1984). Posteriormente entre 1996 y el año 2000, Urbán y colaboradores (Urbán *et al.*, 1997; 1998; 1999; 2001; Urbán and Gómez-Gallardo, 2000) continuaron los estudios demográficos de las ballenas grises dentro de la laguna San Ignacio, siguiendo los métodos de Swartz y Jones. A partir del año 2006 y hasta la actualidad, Urbán, Swartz y colaboradores han continuado con este trabajo, durante los meses en que las ballenas grises se congregan en la laguna. Esto ha dado como resultado el tener el catálogo con el mayor número de foto-identificaciones de ballena gris que existe en cualquier institución.

Por otra parte, en la laguna Ojo de Liebre, en el año 2000, la Universidad Autónoma de Baja California Sur comenzó un proyecto para documentar la abundancia, distribución, tiempo de residencia y mortalidad de las ballenas grises dentro de la laguna (Urbán *et al*, 2001), este proyecto concluyó en el año 2003.

En la Bahía Magdalena se han llevado a cabo diversas investigaciones; Rice y colaboradores (1981), realizaron conteos aéreos para determinar el número de ballenas grises presentes en la laguna, mientras que Fleischer y Contreras (1986), hicieron comparaciones de los conteos, utilizando diferentes plataformas. Posteriormente Pérez-Cortes y colaboradores (2004), determinaron la distribución y abundancia de las ballenas grises en el complejo lagunar de Bahía Magdalena para el año 1997.

Entre los años 1998 y el 2010, Laura Conner y Eduardo Hillman formaron un catálogo de foto-identificación con todas las fotografías colectadas por el Center for Coastal Studies, School for Field Studies, ubicado en puerto San Carlos. Finalmente Urbán, Swartz y colaboradores en el año 2012 comenzaron a investigar la distribución, abundancia y tiempo de residencia de las ballenas grises en esta laguna.

A pesar de que la ballena gris es una de las especies de cetáceos mejor estudiada, es poco lo que se sabe hasta ahora sobre los movimientos que realiza entre sus zonas de congregación invernal (lagunas costeras de la Península de Baja California). Sólo existe un trabajo no publicado sobre este tema, el cual fue realizado por Jones y Swartz en 1982. En este trabajo se compararon 434 foto-identificaciones obtenidas por Jones y Swartz en la laguna San Ignacio entre 1978 y 1982, contra las 459 foto-identificaciones obtenidas por Bryant P. y S. Lafferty en la laguna Ojo de Liebre (1980 y 1981) y Guerrero Negro (1980-1982), las 200 foto-identificaciones obtenidas por S. Lawson en el estero de la soledad (Bahía Magdalena) en 1982 y las 8 foto-identificaciones obtenidas por Finley y Vidal en Yavaros, Sonora y Bahía Reforma, Sinaloa, entre 1981 y 1982. Se encontraron 18 recapturas entre la laguna San Ignacio y las otras áreas de congregación: 3 con Guerrero Negro, 4 con laguna Ojo de Liebre y 11 con el Estero Soledad, pero debido al reducido número de recapturas, no se pudo discutir a fondo la relación entre las lagunas costeras, por lo que el presente capitulo tiene ese objetivo.

## MÉTODOS

La metodología para la toma de datos (Registro general de avistamientos), el trabajo de foto-identificación y el procesamiento de las imágenes, se encuentran descritas en el capítulo I de este trabajo. Una vez obtenidos los catálogos de foto-identificación de las tres zonas de congregación (2012-2014), se procedió a compararlos con todos los catálogos de ballena gris existentes desde el año 2001. Y una vez obtenidos los números totales de foto-identificaciones, se procedió a calcular el índice de intercambio entre lagunas y se compararon los resultados mediante pruebas de *Ji-cuadrada* (análisis descritos en el capítulo I).

Es importante mencionar que las comparaciones de las foto-identificaciones fueron llevadas a cabo con la colaboración de tesistas del Programa de Investigación de Mamíferos Marinos de la UABCS y estudiantes que participaron en el proyecto Laguna San Ignacio Ecosystem Science Program.

## RESULTADOS

El trabajo de campo (foto-identificación), se realizó en la Bahía Magdalena entre el 25 de enero y el 20 de marzo de 2012 y entre el 17 de enero y el 17 de marzo de 2013, teniendo 18 días de esfuerzo durante el primer año y 28 días durante el segundo. En la laguna San Ignacio la foto-identificación se realizó del 18 de enero al 14 de abril de 2012, del 16 de enero al 11 de abril del 2013 y del 16 de enero al 18 de abril del 2014 con 64, 57 y 66 días de esfuerzo respectivamente y finalmente en la laguna Ojo de Liebre el esfuerzo de foto-identificación tuvo lugar del 11 al 23 de abril del 2013, y del 10 de enero al 12 de abril de 2014, con 11 y 18 días respectivamente.

De las 40906 fotografías tomadas en las tres localidades en los años 2012 a 2014, se seleccionaron y compararon las mejores, para elaborar los catálogos de foto-identificación por zona de congregación y por año, estos catálogos se juntaron con lo ya existentes para la Laguna Ojo de Liebre (2001, 2002 y 2003), y los de la Laguna

San Ignacio, realizados entre el 2005 y el 2011, obteniendo un total de 7637 foto-identificaciones. Pero debido a que entre el 2001 y el 2007 solo se tenían registros fotográficos del costado derecho de los individuos y al gran número de foto-identificaciones recopiladas, para este trabajo se utilizaron únicamente las foto-identificaciones del lado derecho, para realizar las comparaciones (Tabla 1).

El número total de foto-identificaciones utilizadas para determinar los movimientos entre lagunas (eliminando las recapturas entre años de una misma zona) fue de 5822, de las cuales, 1494 pertenecen a la laguna Ojo de Liebre, 3806 de la Laguna San Ignacio y de 522 de la Bahía Magdalena.

Tabla 1. Esfuerzo de foto-identificación por zonas y por años de muestreo en las diferentes localidades (LOL-Laguna Ojo de liebre, LSI-Laguna San Ignacio y BM-Bahía Magdalena).

| AÑO | Localidad | Horas de Esfuerzo | Número de Avistamientos | Número de fotos | Núm. de individuos Solitarios | Núm. de Mc | Núm. total de adultos | Núm. de Id lado derecho |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2001 | LOL | sin datos | sin datos | sin datos | 191 | 205 | 396 | 396 |
| 2002 | LOL | sin datos | sin datos | sin datos | 100 | 349 | 449 | 449 |
| 2003 | LOL | sin datos | sin datos | sin datos | 92 | 186 | 278 | 278 |
| 2013 | LOL | 49.2 | 110 | 1638 | 4 | 110 | 114 | 106 |
| 2014 | LOL | 103.6 | 230 | 2305 | 117 | 176 | 293 | 275 |
| 2005 | LSI | sin datos | sin datos | sin datos | 287 | 118 | 405 | 405 |
| 2006 | LSI | 66.38 | 107 | 924 | 193 | 54 | 247 | 247 |
| 2007 | LSI | 155.16 | 261 | 3171 | 396 | 88 | 484 | 356 |
| 2008 | LSI | 135.75 | 249 | 2590 | 245 | 110 | 355 | 248 |
| 2009 | LSI | 300.75 | 540 | 7456 | 582 | 78 | 660 | 525 |
| 2010 | LSI | 366.83 | 630 | 8371 | 708 | 38 | 746 | 563 |
| 2011 | LSI | 319.28 | 686 | 10643 | 410 | 195 | 605 | 505 |
| 2012 | LSI | 359.3 | 863 | 9508 | 434 | 235 | 669 | 547 |
| 2013 | LSI | 290 | 607 | 9263 | 360 | 192 | 552 | 477 |
| 2014 | LSI | 348.3 | 906 | 11514 | 580 | 209 | 789 | 659 |
| 2012 | BM | 115.4 | 146 | 3198 | 228 | 41 | 269 | 233 |
| 2013 | BM | 232.1 | 143 | 3480 | 282 | 45 | 327 | 296 |

Los resultados de las comparaciones de las foto-identificaciones entre las zonas de congregación son:

*Laguna San Ignacio vs Laguna Ojo de Liebre*

Al comparar las 3806 foto-identificaciones de laguna San Ignacio, con las 1494 de la laguna Ojo de Liebre, se realizaron 5,686,164 comparaciones totales, de las cuales se obtuvieron 64 recapturas entre ambas congregaciones, 43 corresponden a hembras y 21 a individuos solitarios (machos o hembras que no están acompañado por una cría). Es importante mencionar que 24 de los individuos fueron registrados en una de las dos zonas en al menos dos ocasiones (en años diferentes) (Tabla 2).

Tabla 2. Número de individuos registrados entre LOL y LSI con sus números de recapturas para cada congregación (años diferentes).

| Número de individuos Registrados en LSI y LOL | Registros en la Laguna San Ignacio | Registros en la Laguna Ojo de Liebre |
|---|---|---|
| 40 | 1 vez | 1 vez |
| 3 | 1 vez | 2 veces |
| 11 | 2 veces | 1 vez |
| 1 | 2 veces | 2 veces |
| 1 | 2 veces | 3 veces |
| 7 | 3 veces | 1 vez |
| 1 | 4 veces | 1 vez |

*Laguna San Ignacio vs Bahía Magdalena*

De la comparación de las 3806 foto-identificaciones de laguna San Ignacio, con las 522 de la Bahía Magdalena, se realizaron un total de 1,986,732 comparaciones, en las cuales se obtuvieron 96 recapturas entre ambas congregaciones, de estas 53 fueron hembras y 43 individuos solitarios (Tabla 3). Es decir que el 66% de todas las hembras que han sido registradas en Bahía Magdalena, también han estado presentes en la Laguna San Ignacio.

Tabla 3. Número de individuos registrados entre LSI y Bahía Magdalena, con sus números de recapturas para cada congregación (años diferentes).

| Número de individuos Registrados en LSI y BM | Registros en la Laguna San Ignacio | Registros en Bahía Magdalena |
|---|---|---|
| 63 | 1 vez | 1 vez |
| 20 | 2 veces | 1 vez |
| 4 | 1 vez | 2 veces |
| 7 | 3 veces | 1 vez |
| 2 | 4 veces | 1 vez |

*Laguna Ojo de Liebre vs Bahía Magdalena*

Al comparar las 1495 foto-identificaciones de laguna Ojo de Liebre, con las 522 de la Bahía Magdalena, se realizaron 779,868 comparaciones totales, encontrando únicamente seis recapturas entre ambas congregaciones, de las cuales cuatro corresponden a hembras y dos a individuos solitarios. Todas las recapturas fueron registradas sólo una vez en cada zona.

Con los datos antes mencionados, se llevaron a cabo los análisis (índice de intercambio y prueba de Ji-cuadrada), para determinar su probabilidad de recaptura y determinar si el movimiento de las ballenas grises entre estas zonas de congregación es homogéneo o heterogéneo.

*Índice de Intercambio entre lagunas*

Al cuantificar el índice de intercambio entre las tres zonas de congregación, se obtuvo que el índice de intercambio más alto es entre la Laguna San Ignacio y la Bahía Magdalena y el más bajo entre la Laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena (Tabla 4). A pesar de que el número de foto identificaciones para la Laguna Ojo de Liebre es el triple que el de la Bahía Magdalena.

Tabla 4. Índice de intercambio entre la Laguna Ojo de liebre, Laguna San Ignacio y la Bahía Magdalena.

| Localidades | No. de foto-id. totales | número de comparaciones | Recapturas | Índice de intercambio |
|---|---|---|---|---|
| LSI-LOL | 3806 vs 1494 | 5686164 | 64 | 0.011 |
| LSI-BM | 3806 vs 522 | 1986732 | 96 | 0.048 |
| LOL-BM | 1494 vs 522 | 779868 | 6 | 0.007 |

*Prueba de* Ji-cuadrada *para determinar la probabilidad de recaptura de todas las ballenas grises pertenecientes a las tres congregaciones invernales*

Al igual que con el índice de intercambio, las pruebas de Ji-cuadrada, se realizaron utilizando los datos totales de las comparaciones realizadas (Tabla 5), se encontraron 166 recapturas divididas de la siguiente forma: 64 recapturas entre laguna San Ignacio y la Laguna Ojo de Liebre (43 hembras y 21 individuos solitarios). En el caso de la comparación entre la laguna San Ignacio y Bahía Magdalena, se encontraron 93 recapturas (53 hembras y 43 individuos solitarios) y por último entre la laguna Ojo de Liebre y la Bahía Magdalena, únicamente se encontraron seis recapturas 4 hembras y 2 individuos solitarios). Es importante aclarar que el número total de las recapturas, incluye a aquellos individuos encontrados en dos zonas de congregación durante el mismo año o en años diferentes, sin importar en cuál de las dos zonas se observó primero. Así mismo el 34% de los individuos recapturados entre zonas, fueron registrados en alguna de las zonas en al menos dos ocasiones diferentes (años diferentes).

Tabla 5. Prueba de Ji-cuadrada, para determinar la homogeneidad del movimiento de las ballenas grises entre las lagunas (2001 a 2014).

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. San Ignacio - L. Ojo de Liebre | 5686164 | 0.672 | 64 | 111.55 | 20.27 |
| L. San Ignacio - Bahía Magdalena | 1986732 | 0.235 | 96 | 39.01 | 83.26 |
| L. Ojo de Liebre – B.Magdalena | 779868 | 0.093 | 6 | 15.44 | 5.77 |
| Total | 8452764 | 1.000 | 166 | 166 | 109.3 |
| **$Xi^2$=109.3 $\chi^2_{0.95,2}$=5.99** | | | | | |

El valor obtenido de la prueba de Ji-cuadrada, fue estadísticamente significativo, lo que nos indica que la probabilidad de recaptura entre cada par de congregaciones, es diferente. Pero para determinar si esto era cierto para todos los pares de congregaciones, se realizaron pruebas de Ji-cuadrada entre cada par de congregaciones, utilizando la totalidad de los datos. Los resultados fueron los siguientes (Tablas 6 a,b y c).

Tabla 6. Prueba de Ji-cuadrada, para determinar la heterogeneidad del movimiento de las ballenas grises entre: *a*) LOL y LSI Vs LOL y BM; *b*) LSI y LOL Vs LSI y BM; *c*) BM y LSI Vs BM y LOL.

a) LOL-LSI Vs LOL-BM

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. Ojo de Liebre – L. San Ignacio | 5686164 | 0.879 | 64 | 61.53 | 0.10 |
| L. Ojo de Liebre – B. Magdalena | 779868 | 0.121 | 6 | 8.47 | 0.72 |
| Total | 6466032 | 1.0 | 70 | 70 | 0.82 |
| **$Xi^2$= 0.82 $\chi^2_{0.95,1}$=3.84** | | | | | |

b) LSI-LOL Vs LSI-BM

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. San Ignacio - L. Ojo de Liebre | 5686164 | 0.741 | 64 | 118.56 | 25.11 |
| L. San Ignacio - Bahía Magdalena | 1986732 | 0.259 | 96 | 41.44 | 71.83 |
| Total | 7672896 | 1.0 | 160 | 160 | 96.94 |
| **$Xi^2$=96.94 $\chi^2_{0.95,1}$=3.84** | | | | | |

c) BM-LSI Vs BM-LOL

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Bahía Magdalena – L. San Ignacio | 1986732 | 0.718 | 96 | 73.24 | 7.07 |
| B. Magdalena – L. Ojo de Liebre | 779868 | 0.282 | 6 | 28.76 | 18.01 |
| Total | 2766600 | 1.0 | 102 | 102 | 25.08 |
| **$Xi^2$=25.8 $\chi^2_{0.95,1}$=3.84** | | | | | |

No fueron significativos los resultados pareados encontrados entre la Laguna Ojo de Liebre y las otras dos lagunas, es decir que la probabilidad de recaptura entre la laguna Ojo de Liebre y la Laguna San Ignacio es igual a la probabilidad de recaptura que hay

entre la Laguna Ojo de Liebre y la Bahía Magdalena. Mientras que para los demás casos al ser la prueba significativa, las probabilidades de recapturas son heterogéneas. Los resultados de las tres pruebas de Ji-cuadrada vistos gráficamente se muestran a continuación (figura 11).

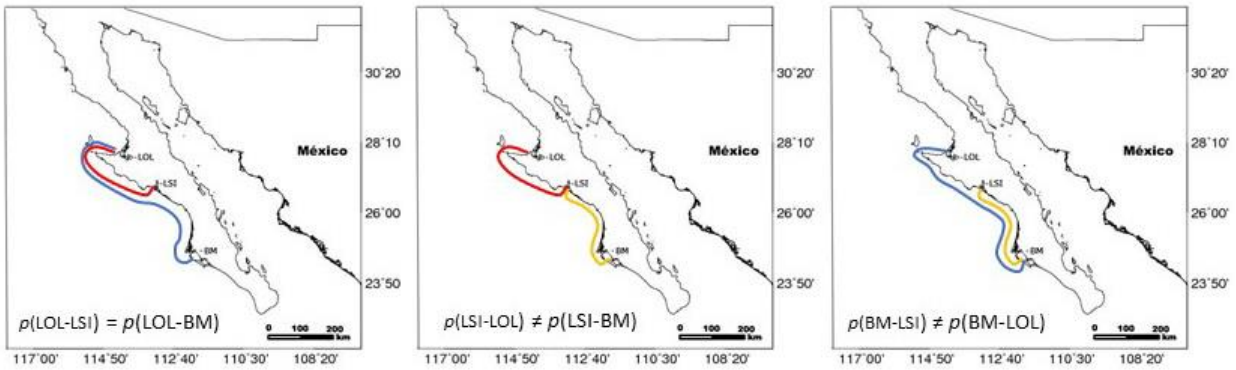



Figura 11. Probabilidad de recaptura entre pares de congregaciones, pertenecientes a las tres zonas de congregación invernal de la ballena gris.

*Prueba de Ji-cuadrada para determinar la probabilidad de recaptura de las ballenas grises (hembras) pertenecientes a las tres congregaciones invernales*

Para determinar si la homogeneidad o heterogeneidad de la probabilidad de recaptura, y por lo tanto la heterogeneidad u homogeneidad de los movimientos entre lagunas, tenía relación con el tipo de agrupación, esta misma prueba se realizó separando a las hembras (Tabla 7) y a los individuos solitarios (machos o hembras sin cría) (Tabla 9). El número de hembras registradas en cada congregación fue de 916 para la Laguna San Ignacio, 994 para la Laguna Ojo de Liebre y 80 para la Bahía Magdalena.

Tabla 7. Prueba de Ji-cuadrada, para determinar la homogeneidad del movimiento de las hembras de ballena gris entre las lagunas Ojo de Liebre, San Ignacio y la Bahía Magdalena (2001 a 2014).

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. San Ignacio - L. Ojo de Liebre | 910504 | 0.856 | 43 | 85.6 | 21.20 |
| L. San Ignacio - Bahía Magdalena | 73280 | 0.069 | 53 | 6.9 | 308.00 |
| L. Ojo de Liebre – B. Magdalena | 79520 | 0.075 | 4 | 7.5 | 1.63 |
| Total | 1063304 | 1.000 | 100 | 100 | 330.84 |
| **$Xi^2$=330.84 $\chi^2_{0.95,2}$=5.99** | | | | | |

El valor de la prueba de Ji-cuadrada obtenido, también fue estadísticamente significativo, es decir que la probabilidad de recaptura de las hembras, entre cada par de congregaciones es diferente, por lo tanto el movimiento de los animales es heterogéneo. De igual forma, se realizaron pruebas pareadas para determinar si la heterogeneidad en el movimiento de las hembras se lleva a cabo entre todas las lagunas o si existe algunos pares de localidades donde el movimiento sea homogéneo (Tabla 8a, b y c).

Tabla 8. Prueba de Ji-cuadrada, para determinar la heterogeneidad del movimiento de las ballenas grises (hembras) entre: *a*) LOL y LSI Vs LOL y BM; *b*) LSI y LOL Vs LSI y BM; *c*) BM y LSI Vs BM y LOL.

a) hembras de LOL y hembras de LSI Vs hembras de LOL y hembras de BM

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. Ojo de Liebre – L. San Ignacio | 910504 | 0.920 | 43 | 43.24 | 0.00 |
| L. Ojo de Liebre – B.Magdalena | 79520 | 0.080 | 4 | 3.76 | 0.02 |
| Total | 990024 | 1.0 | 47 | 47 | 0.02 |
| **$Xi^2$=0.02 $\chi^2_{0.95,1}$=3.84** | | | | | |

b) hembras de LSI y hembras de LOL Vs hembras de LSI y hembras de BM

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. San Ignacio - L. Ojo de Liebre | 910504 | 0.925 | 43 | 88.8 | 23.62 |
| L. San Ignacio – B.Magdalena | 73280 | 0.075 | 53 | 7.2 | 291.34 |
| Total | 983784 | 1.000 | 96 | 96 | 314.96 |
| **$Xi^2$=314.9 $\chi^2_{0.95,1}$=3.84** | | | | | |

c) hembras de BM y hembras de LOL Vs hembras de BM y hembras de LSI

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| B. Magdalena - L. San Ignacio | 73280 | 0.480 | 53 | 27.36 | 24.03 |
| B. Magdalena - L. Ojo de Liebre | 79520 | 0.520 | 4 | 29.64 | 22.18 |
| Total | 152800 | 1.000 | 57 | 57 | 46.21 |
| **$Xi^2$=46.21 $\chi^2_{0.95,1}$=3.84** | | | | | |

Al igual que en el caso de todos los individuos (hembras y solitarios juntos) analizados, únicamente la probabilidad de recaptura entre las hembras de la Laguna Ojo de Liebre y las hembras de la Laguna San Ignacio es igual a la probabilidad de recaptura de las hembras entre la Laguna Ojo de Liebre y las hembras de la Bahía Magdalena. Mientras que la probabilidad de recapturas entre los demás pares de congregaciones es diferente al obtenerse valores significativos en la prueba de Ji-cuadrada (figura 12).

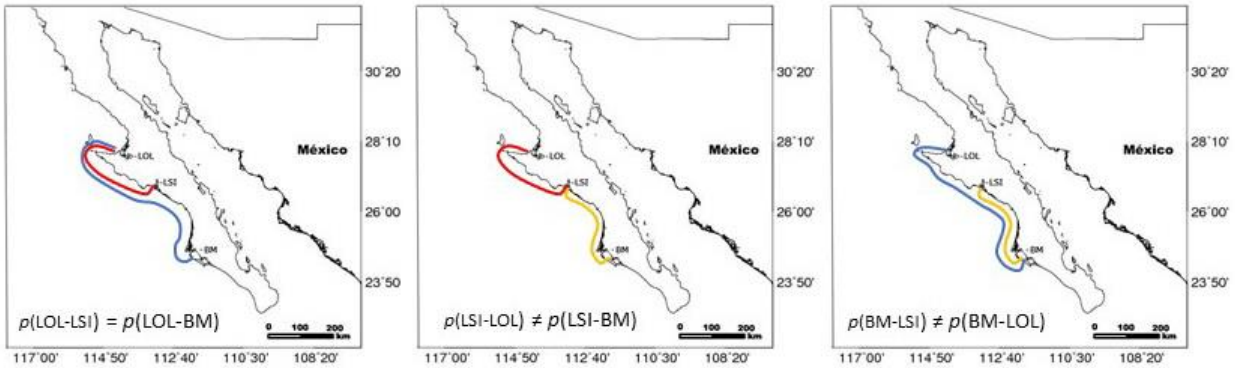



Figura 12. Probabilidad de recaptura de las hembras entre pares de congregaciones, pertenecientes a las tres zonas de congregación invernal de la ballena gris.

*Prueba de Ji-cuadrada para determinar la probabilidad de recaptura de las ballenas grises (individuos solitarios) pertenecientes a las tres congregaciones invernales*

En el caso de los individuos solitario, el número de individuos foto-identificados para cada una de las congregaciones fue de 2890 para la Laguna San Ignacio, 500 para la Laguna Ojo de Liebre y 442 par Bahía Magdalena. El resultado de la prueba de Ji-cuadrada fue estadísticamente significativo (tabla 9), por lo que la probabilidad de recaptura (de los individuos solitarios) entre congregaciones es diferente.

Tabla 9. Prueba de Ji-cuadrada, para determinar la homogeneidad del movimiento de los individuos solitarios de ballena gris entre las lagunas (2001 a 2014).

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. San Ignacio - L. Ojo de Liebre | 1445000 | 0.491 | 21 | 32.4 | 4.01 |
| L. San Ignacio - Bahía Magdalena | 1277380 | 0.434 | 43 | 28.65 | 7.19 |
| L. Ojo de Liebre – B. Magdalena | 221000 | 0.075 | 2 | 4.95 | 1.76 |
| Total | 2943380 | 1.000 | 66 | 66 | 12.96 |
| **$Xi^2$=12.96 $\chi^2_{0.95,2}$=5.99** | | | | | |

Separando el análisis de los individuos solitarios, por pares de congregaciones encontramos los siguientes resultados (Tabla 10 a, b y c).

Tabla 10. Prueba de Ji-cuadrada, para determinar la heterogeneidad del movimiento de las ballenas grises (individuos solitarios) entre: *a*) LOL y LSI Vs LOL y BM; *b*) LSI y LOL Vs LSI y BM; *c*) BM y LSI Vs BM y LOL.

a) solitarios LOL-solitarios LSI Vs solitarios LOL-solitarios BM

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. Ojo de Liebre - L. San Ignacio | 1445000 | 0.867 | 21 | 19.94 | 0.06 |
| L. Ojo de Liebre – B. Magdalena | 221000 | 0.133 | 2 | 3.06 | 0.37 |
| Total | 1666000 | 1.000 | 23 | 23 | 0.43 |
| **$Xi^2$=0.43 $\chi^2_{0.95,1}$=3.84** | | | | | |

b) solitarios LSI-solitarios LOL Vs solitarios LSI-solitarios BM

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. San Ignacio - L. Ojo de Liebre | 1445000 | 0.530 | 21 | 33.92 | 4.92 |
| L. San Ignacio – B. Magdalena | 1277380 | 0.470 | 43 | 30.08 | 5.55 |
| Total | 2722380 | 1.000 | 64 | 64 | 10.47 |
| **$Xi^2$=10.47 $\chi^2_{0.95,1}$=3.84** | | | | | |

c) solitarios BM-solitarios LSI Vs solitarios BM-solitarios LOL

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| B. Magdalena -L. San Ignacio | 1277380 | 0.852 | 43 | 38.34 | 0.57 |
| B. Magdalena - L. Ojo de Liebre | 221000 | 0.148 | 2 | 6.66 | 3.26 |
| Total | 1498380 | 1.0 | 45 | 45 | 3.83 |
| **$Xi^2$=3.83 $\chi^2_{0.95,1}$=3.84** | | | | | |

En el caso de los individuos solitarios únicamente la Laguna San Ignacio y Laguna Ojo de Liebre Vs Laguna San Ignacio y Bahía Magdalena, presentaron un valor significativo en la prueba de Ji-cuadrada, por lo que esta probabilidad de recaptura diferente, es la que determina la heterogeneidad en la probabilidad de recaptura de todos los individuos solitarios como agrupación y por lo tanto la heterogeneidad en su movimiento (figura 13).

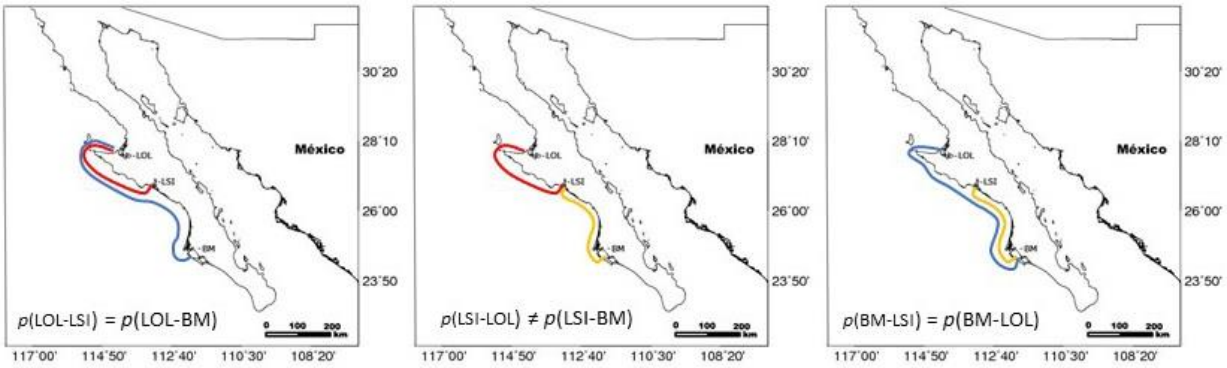



Figura 13. Probabilidad de recaptura de los individuos solitarios entre pares de congregaciones, pertenecientes a las tres zonas de congregación invernal de la ballena gris.

*Prueba de Ji-cuadrada con datos de todas las congregaciones para el año 2013.*

En el caso del año 2013, que fue el único año donde se realizó trabajo de campo simultaneo en las tres zonas de congregación, se foto-identificaron (del costado derecho) 879 individuos; 106 en la laguna Ojo de Liebre, 477 en la laguna San Ignacio y 296 en la Bahía Magdalena. Se encontraron un total de 43 recapturas; 10 entre laguna San Ignacio y laguna Ojo de Liebre (todas hembras), 31 recapturas entre la laguna San Ignacio y Bahía Magdalena (19 hembras y 12 solitarios), y 2 entre la laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena (hembras). Estos últimos individuos, también fueron

registrados en la Laguna San Ignacio, es decir que se movieron entre las tres lagunas a lo largo de una sola temporada invernal.

El tiempo promedio de recaptura entre laguna Ojo de Liebre y laguna San Ignacio fue de 22 días para las hembras (rango de 13 a 39 días); de Laguna San Ignacio y Bahía Magdalena de 24 días para las hembras y de 17 días para los individuos solitarios (promedio total de 22 días y rango de 7 a 70 días); y entre Laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena de 35 días (rango de 35 a 36 días). Es importante señalar que todos los individuos recapturados entre BM y LOL y entre LSI y LOL fueron registrados primero en la localidad más al sur y posteriormente en localidad más norteña, mientras que en el caso de las recapturas entre LSI y BM solo hubo dos individuos que fueron registrados primero en LSI, posteriormente en BM y nuevamente en LSI (Tabla 11).

Tabla 11 Tiempo entre recapturas de las ballenas registradas entre las tres lagunas (LOL, LSI y BM) durante el 2013.

| B. MAGDALENA ID | FECHA | L. SAN IGNACIO ID | FECHA | DIAS ENTRE RECAPTURAS |
|---|---|---|---|---|
| 13-0012-D-BM | 19-Ene-13 | 13-0043-D-LSI | 3-Feb-13 | 15 |
| 13-0033-D-BM | 18-Ene-13 | 13-0134-D-LSI | 14-Feb-13 | 27 |
| 13-0039-D-BM | 18-Ene-13 | 13-0143-D-LSI | 14-Feb-13 | 27 |
| 13-0046-D-BM | 19-Ene-13 | 13-0018-D-LSI | 26-Ene-13 | 7 |
| 13-0049-D-BM | 19-Ene-13 | 13-0049-D-LSI | 3-Feb-13 | 15 |
| 13-0065-D-BM | 22-Ene-13 | 13-0063-D-LSI | 4-Feb-13 | 13 |
| 13-0083-D-BM | 23-Ene-13 | 13-0080-D-LSI | 7-Feb-13 | 15 |
| 13-0138-D-BM | 25-Ene-13 | 13-0141-D-LSI | 14-Feb-13 | 20 |
| 13-0155-D-BM | 26-Ene-13 | 13-0077-D-LSI | 7-Feb-13 | 12 |
| 13-0187-D-BM | 16-Feb-13 | 13-0328-D-LSI | 12-Mar-13 | 24 |
| 13-0237-D-BM | 19-Feb-13 | 13-0274-D-LSI | 4-Mar-13 | 13 |
| 13-0244-D-BM | 21-Feb-13 | 13-0317-D-LSI | 11-Mar-13 | 18 |
| 13-0307-D-BM-M | 16-Feb-13 | 13-0545-D-LSI-M | 30-Mar-13 | 42 |
| 13-0308-D-BM-M | 19-Feb-13 | 13-0490-D-LSI-M | 11-Mar-13 | 20 |
| 13-0309-D-BM-M | 27-Ene-13 | 13-0556-D-LSI-M | 7-Abr-13 | 70 |
| 13-0311-D-BM-M | 19-Feb-13 | 13-0527-D-LSI-M | 23-Mar-13 | 32 |
| 13-0313-D-BM-M | 16-Mar-13 | 13-0544-D-LSI-M | 30-Mar-13 | 14 |
| 13-0315-D-BM-M | 15-Mar-13 | 13-0543-D-LSI-M | 28-Mar-13 | 13 |
| 13-0316-D-BM-M | 14-Feb-13 | 13-0525-D-LSI-M | 22-Mar-13 | 36 |
| 13-0317-D-BM-M | 14-Feb-13 | 13-0476-D-LSI-M | 4-Mar-13 | 18 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 13-0318-D-BM-M | 14-Feb-13 | 13-0504-D-LSI-M | 15-Mar-13 | 29 |
| 13-0325-D-BM-M | 15-Mar-13 | 13-0550-D-LSI-M | 3-Abr-13 | 19 |
| 13-0327-D-BM-M | 21-Feb-13 | 13-0537-D-LSI-M | 24-Mar-13 | 31 |
| 13-0328-D-BM-M | 15-Mar-13 | 13-0539-D-LSI-M | 28-Mar-13 | 13 |
| 13-0333-D-BM-M | 8-Mar-13 | 13-0528-D-LSI-M | 23-Mar-13 | 15 |
| 13-0336-D-BM-M | 8-Mar-13 | 13-0441-D-LSI-M | 27-Mar-13 | 19 |
| 13-0337-D-BM-M | 15-Mar-13 | 13-0367-D-LSI-M | 7-Abr-13 | 23 |
| 13-0342-D-BM-M | 14-Mar-13 | 13-0370-D-LSI-M | 7-Abr-13 | 24 |
| 13-0343-D-BM-M | 15-Mar-13 | 13-0534-D-LSI-M | 24-Mar-13 | 9 |
| 13-0305-D-BM-M | 27-Ene-13 | 13-0383-D-LSI-M | 20-Ene-13 | LSI a BM =7 y BM a LSI = 17 |
| | 14-Feb-13 | | 5-Mar-13 | |
| | 16-Feb-13 | | 14-Mar-13 | |
| | | | 22-Mar-13 | |
| 13-0331-D-BM-M | 22-Feb-13 | 13-0397-D-LSI-M | 21-Ene-13 | LSI a BM =32 y BM a LSI = 29 |
| | | | 23-Mar-13 | |
| **L. SAN IGNACIO ID** | **FECHA** | **L. OJO DE LIEBRE ID** | **FECHA** | **DIAS ENTRE RECAPTURAS** |
| 13-0367-D-LSI-M | 7-Abr-13 | 13-0064-D-LOL-M | 20-Abr-13 | 13 |
| 13-0381-D-LSI-M | 28-Mar-13 | 13-0007-D-LOL-M | 12-Abr-13 | 15 |
| 13-0387-D-LSI-M | 19-Mar-13 | 13-0113-I-LOL-M | 21-Abr-13 | 33 |
| 13-0419-D-LSI-M | 4-Mar-13 | 13-0003-D-LOL-M | 12-Abr-13 | 39 |
| 13-0489-D-LSI-M | 10-Mar-13 | 13-0019-D-LOL-M | 13-Abr-13 | 34 |
| 13-0520-D-LSI-M | 3-Abr-13 | 13-0013-D-LOL-M | 13-Abr-13 | 10 |
| 13-0526-D-LSI-M | 22-Mar-13 | 13-0050-D-LOL-M | 18-Abr-13 | 27 |
| 13-0528-D-LSI-M | 23-Mar-13 | 13-0001-D-LOL-M | 12-Abr-13 | 20 |
| 13-0549-D-LSI-M | 7-Abr-13 | 13-0099-D-LOL-M | 23-Abr-13 | 16 |
| 13-0555-D-LSI-M | 7-Abr-13 | 13-0095-D-LOL-M | 23-Abr-13 | 16 |
| **B. MAGDALENA ID** | **FECHA** | **L. SAN IGNACIO ID** | **FECHA** | **DIAS ENTRE RECAPTURAS** |
| 13-0333-D-BM-M | 8-Mar-13 | 13-0528-D-LSI-M | 23-Mar-13 | 15 |
| 13-0337-D-BM-M | 15-Mar-13 | 13-0367-D-LSI-M | 7-Abr-13 | 23 |

Utilizando los datos de recaptura de 2013, se realizó una prueba de Ji-cuadrada para determinar cómo es el movimiento de los animales, si se utiliza solo los datos de una sola temporada, donde el monitoreo se realizó simultáneamente en las tres localidades (Tabla 12).

Tabla 12. Prueba de Ji-cuadrada, para determinar la homogeneidad del movimiento de las ballenas grises entre las lagunas durante el año 2013.

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. San Ignacio - L. Ojo de Liebre | 50562 | 0. 227 | 10 | 9.74 | 0.01 |
| L. San Ignacio - Bahía Magdalena | 141192 | 0.633 | 31 | 27.2 | 0.53 |
| L. Ojo de Liebre – B. Magdalena | 31376 | 0.141 | 2 | 6.04 | 2.70 |
| Total | 223130 | 1.000 | 43 | 641 | 3.24 |
| **$Xi^2$=3.24 $\chi^2_{0.95,2}$=5.99** | | | | | |

A diferencia de los resultados de la prueba de Ji-cuadrada utilizando los datos de todos los años, la prueba para el año 2013 no fue estadísticamente significativa, siendo la probabilidad de recaptura y el movimiento entre congregaciones homogéneo.

## DISCUSIÓN

*Movimientos de todos los individuos entre las tres lagunas.*

Existen diversos factores que afectan la probabilidad de recaptura de un individuo entre dos zonas de congregación, entre estos factores encontramos algunos intrínsecos a la biología de la especie, como son: el tiempo de residencia de los individuos en cada una de las zonas de congregación el cual es mayor para las hembras con cría que para los solitarios (Urban, *et al*.,1996; 1997, Martínez *et al*., 2014), la cantidad de tiempo que pasan en superficie, la velocidad de desplazamiento entre zonas y dentro de las zonas (Mate *et al*., 2011). Mientras que existen otros factores relacionados con el muestreo, como son el tiempo de esfuerzo, la aleatoriedad del muestreo y las condiciones climáticas que pueden limitar el trabajo de campo. Así mismo existe otro elemento que influye positiva o negativamente en la capacidad de registrar a un animal, que es la densidad de individuos en el área de muestreo; sin embargo, el principal factor que se requiere para llevar a cabo la recaptura, es que el animal se desplace entre las dos zonas de muestreo. Es por ello que la probabilidad de recaptura de un animal en dos localidades está altamente relacionada con la homogeneidad o heterogeneidad de los movimientos de los animales entre dos zonas de muestreo. Por lo que en este trabajo

discutiremos la heterogeneidad de los movimientos de las ballenas grises, con base en su probabilidad de recaptura entre zonas de congregación, con apoyo de los valores del índice de intercambio, pero considerando cómo influyen también los otros factores antes mencionados.

Al realizar la prueba de Ji-cuadrada para probar la hipótesis de que la probabilidad de recaptura entre las lagunas Ojo de Liebre, San Ignacio y la Bahía Magdalena es la misma, el resultado fue estadísticamente significativo lo que muestra que la probabilidad de recaptura entre estas congregaciones es diferente y por consiguiente el movimiento de los animales es heterogéneo, pero profundizando en el análisis para tratar de determinar cuáles movimientos entre pares de congregaciones determinan esta heterogeneidad, encontramos que: tanto la probabilidad de que animales se muevan de la Laguna San Ignacio hacia la Laguna Ojo de Liebre o a la Bahía Magdalena es diferente (caso 1), así como también es diferente la probabilidad de que los animales se muevan de la Bahía Magdalena a la Laguna San Ignacio o a la Laguna Ojo de Liebre (caso 2).

En el primer caso encontramos que el índice de intercambio es bajo entre la Laguna San Ignacio y la laguna Ojo de Liebre (0.011), tomando en cuenta, que estas dos congregaciones presentan el mayor número de foto-identificaciones comparadas, mientras que el índice de movimiento más alto se da entre Laguna San Ignacio y Bahía Magdalena, a pesar de que el número de foto-identificaciones de esta última es solo una tercera parte de las pertenecientes a la laguna Ojo de Liebre.

En el segundo caso, también se ve bien reflejado el resultado del análisis del índice de intercambio, donde se observa que los animales se mueven 6 veces más entre la Bahía Magdalena y la Laguna San Ignacio (valor del índice de intercambio de 0.048), que entre la Bahía Magdalena y la Laguna Ojo de Liebre (valor del índice de intercambio de 0.007).

*Movimientos de las hembras y hembras con cría entre las tres lagunas.*

Es bien conocido que en la ballena gris existen grandes diferencias entre las conductas de las hembras con cría, las hembras sin cría y los machos y estas diferencias conductuales se ven reflejadas en su fidelidad a una zona de congregación, en su tiempo de estancia y en el movimiento entre congregaciones que realizan, esto a su vez se vio reflejado en el mayor número de recapturas entre congregaciones (100 hembras por 66 individuos solitarios), es por esto que se decidió realizar la prueba de Ji-cuadrada separando las agrupaciones por categorías: hembras (con o sin cría) que conocemos su sexo por la presencia de una cría en alguno de sus registros e individuos solitarios que pueden ser machos o hembras que nunca han sido registradas con una cría (posiblemente inmaduras sexualmente), que debido a la carencia de dimorfismo sexual, no pueden ser definidos como machos o hembras.

Al realizar la prueba de Ji-cuadrada para los datos de las hembras, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos analizando la totalidad de los individuos. Es decir que existen tres casos, en el primero de ellos (caso 1), no se encontró diferencias significativas entre el movimiento de las ballenas hembras entre la Laguna Ojo de Liebre y San Ignacio, con el movimiento entre la Laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena, esto indica que las ballenas que migran de la Laguna Ojo de Liebre hacia el sur pueden no presentar una preferencia definida por ninguna de las otras lagunas, por lo que pueden ir indistintamente a cualquiera de ellas y que los números de recapturas entre estas zonas obtenidos en este trabajo dependen únicamente del número de individuos comparados y no propiamente de una fidelidad a una zona. Sin embargo esto no puede ser corroborado puesto que no tenemos ningún registro de animales que hayan sido registrados inicialmente en la Laguna Ojo de Liebre y posteriormente en la laguna San Ignacio, durante una misma temporada, pero si existen dos registros de dos ballenas las cuales se encontraron en las tres zonas de congregación durante un mismo año, lo que soporta esta idea.

En el segundo de los casos se encontró que la probabilidad de recaptura entre la Laguna San Ignacio y la Laguna Ojo de Liebre es diferente a la probabilidad de recaptura entre la Laguna San Ignacio y Bahía Magdalena. Esto lo podemos corroborar ya que el número de recapturas observado entre La Laguna San Ignacio y la Bahía Magdalena (53), es siete veces mayor a lo esperado mientras que el valor de recapturas entre la Laguna San Ignacio y la Laguna Ojo de Liebre es menor de la mitad del valor esperado.

En el tercer caso encontramos que existen diferencias significativas en la probabilidad de recaptura de la Bahía Magdalena y la Laguna San Ignacio con respecto a la Bahía Magdalena y la Laguna Ojo de Liebre. Como se ha observado a lo largo de varios años de muestreo, es común que las ballenas que se encuentran en la Bahía Magdalena, al final de la temporada invernal (a partir de finales de marzo), mientras realizan su migración al norte, ingresen a alguna de las lagunas donde pueden permanecer horas o algunos días, sin embargo esto ha sido comprobado mediante los conteos y la foto-identificación en la laguna San Ignacio, pero no ha sido corroborado en la Laguna Ojo de Liebre.

*Movimientos de los individuos solitarios entre las tres lagunas.*

En el caso de los individuos solitarios, a diferencia de las hembras y la totalidad de los individuos existe sólo un caso donde se encontraron diferencias significativas, lo que resulto en que todo el análisis en conjunto presentará diferencias significativas. Este caso fue el de los movimientos de las ballenas de la Laguna San Ignacio con respecto a Laguna Ojo de Liebre y a Bahía Magdalena.

Mientras que la probabilidad de recaptura de la Laguna Ojo de Liebre con la Laguna San Ignacio y con la Bahía Magdalena, así como Bahía Magdalena con la Laguna San Ignacio y con la Laguna Ojo de Liebre, no presentaron diferencias significativas, por lo que el movimiento entre estos pares de congregaciones es homogéneo. En el caso de los individuos solitarios se ha observado que su fidelidad (promedio de 2.23 recapturas

interanuales) y tiempo de residencia (8.2 días) es menor al de las hembras con cría (promedio de 2.42 recapturas interanuales y residencia de 32.4 días) (Martínez et al., 2014), lo que, por consiguiente, refleja una mayor capacidad de movimiento. Y de acuerdo con las probabilidades de recaptura homogénea de la Laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena, pareciera esto estar asociado a movimientos relacionados con el tiempo a lo largo de la temporada invernal, es decir que al inicio de la temporada (diciembre-enero) se pueden mover de norte a sur a cualquiera de las lagunas y al final de la temporada (marzo-abril), de sur a norte de igual forma, pero el movimiento proveniente de la laguna San Ignacio hacia las otras zonas es heterogéneo.

*Movimientos de todos los individuos solitarios entre las tres lagunas para el año 2013.*

Durante el año 2013 se pudo monitorear simultáneamente a las tres lagunas costeras (aunque no en igualdad de tiempo de esfuerzo) y se pudo registrar los tiempos de recapturas entre lagunas, siendo el promedio de 22 días para LOL-LSI, de 24 días para LSI-BM y de 35 días entre LOL-BM. Si consideramos que la velocidad de nado de la ballena gris fuera de las algunas registrada por Mate y colaboradores (2011) es de 4.1 a 4.6 km/h, el tiempo promedio de recorrido entre LOL y LSI o de LSI a BM sería menor a cuatro días, mientras que el de LOL a BM sería de 7 días, lo que refuerza lo registrado por Mate *et al*., (2003), quienes encontraron que las ballenas permanecen gran tiempo fuera de las lagunas.

Al hacer la prueba de Ji-cuadrada, el resultado mostró que el movimiento de los individuos es homogéneo, lo que da lugar a la duda de qué tanto influyen en los resultados, las diferencias en los tiempos de muestreo efectuado en las diferentes zonas. Sin embargo los resultados obtenidos para los diferentes tipos de agrupación respaldan la heterogeneidad en el movimiento de los animales, entre algunos pares de congregaciones.

# CONCLUSIONES

Existen diferencias en la probabilidad de recaptura entre las lagunas y por lo tanto se concluye que el movimiento de los animales es heterogéneo. En los casos del total de individuos y las hembras como grupo, las diferencias de la probabilidad de recaptura se dan entre la LSI y BM versus LSI y LOL, así como entre BM y LSI versus BM y LOL, mientras que en el caso de los individuos solitarios la heterogeneidad en la probabilidad de recaptura se debe exclusivamente a las diferencias entre LSI y LOL versus LSI y BM. Estos datos son respaldados por los diferentes índices de recaptura y tiempos de estancia registrados.

En cuanto a los resultados obtenidos durante el 2013, se encontró que el tiempo promedio de recaptura entre congregaciones fue de 22 días para LOL-LSI, de 24 días para LSI-BM y de 35 días entre LOL-BM y que su movimiento fue homogéneo.

REFERENCIAS

Fleischer, L. y Contreras, J.. 1986. Censos de ballenas grises (*Eschrichtius robustus*) en la región norte de Bahía Magdalena, B.C.S. México. Ciencia Pesquera (5): 5t-62pp.

Jones, M.L., S.L. Swartz, y Dahlheim, M.E. 1984. Census of gray whale abundance in San Ignacio Lagoon: a follow-up study in response to low whale counts recorded during an acoustic playback study of noise-effects on gray whales. U.S. Department of Commerce N.T.I.S. Publication PB 86-2190778, 69 pp.

Jones, M.L. y Swartz, S.L. 1984. Demography and phenology of gray whales and evaluation of whale-watching activities in Laguna San Ignacio, Baja California Sur, Mexico. pp. 309-74. *In:* M.L. Jones, S.L. Swartz and S. Leatherwood (eds.) *The Gray Whale,* Eschrichtius robustus. Academic Press, Inc., Orlando, Florida.600pp.

Martínez, A.S., Gómez-Gallardo E.A., Swartz, E. y Urbán, R.J. 2014. Fidelidad y Residencia de la ballena gris, en la laguna San Ignacio, B.C.S. México. Ponencia presentada en la XVI Reunión de trabajo de especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur. Cartagena, Colombia

Mate, B., Lagerquist B. and Irvine L. 2011. Feeding Habitats, Migrations and Winter Reproductive Range Movements Derived From Satellite-Monitored Radio Tags on Eastern North Pacific Gray Whales. SC/62/BGR 21.

Pérez-Cortés, M. H., Urbán R. J. y Loreto, C. P. A. 2004 Distribution and abundance in the Magdalena bay Complex, México during the 1997 winter season. J. Cetacean Res. Manage. 6(2):133–138, 2004

Urbán R, J., Gómez-Gallardo U, A., Flores de Sahagún, V., Cifuentes L, J., Ludwig, S. and Palmeros R, M. 1997. Gray whale studies at Laguna San Ignacio, B.C.S., Mexico, winter 1996. *Rep. int. Whal. Commn* 47:625-33.

Urbán R, J., Gómez-Gallardo U, A. y Palmeros-R, M. 1998. A note on the 1997 gray whale studies at Laguna San Ignacio, B.C.S., Mexico. Reporte para la *int. Whal. Commn* 48:513-6.

Urbán R, J. and Rojas B, L. 1999. Los programas de conservación de mamíferos marinos. pp. 541-73. *In:* C. Ma del, H. Rodríguez and F. Hernández C (eds.) *Océanos ¿Fuente inagotable de recursos?* Programa Universitario de Medio Ambiente, UNAM-SEMARNAP, Mexico. 589pp.

Urbán, R.J., Sumich, J., Culik, B.M., Ludwig, S., Gómez-Gallardo, U.A. y Palmeros, R.M. 1999. Demografía y ecología de la ballena gris en la Laguna San Ignacio, B.C.S. México, 1999. Reporte presentado al Instituto Nacional de Ecología (SEMARNAP). 46 pp.

Urbán R, J. and Gómez-Gallardo U., A. 2000. Whalewatching and gray whales at Laguna San Ignacio, B.C.S., México. Paper SC/52/WW12 presentado en la IWC Scientific Committee, Junio 2000, Adelaide, Australia 17pp.

Urbán R, J., Gómez-Gallardo U, A. and Solís L, I. 2001. Report of the 2001 gray whale winter season in Laguna Ojo de Liebre, México. Paper SC/53/BRG18 presented to the IWC Scientific Committee, July 2001, London (unpublished). 8pp.

# CAPITULO III. RELACIÓN DE LAS BALLENAS GRISES EN LAS LAGUNAS OJO DE LIEBRE, SAN IGNACIO Y BAHÍA MAGDALENA, CON BASE EN SU DIVERSIDAD GENÉTICA

## ANTECEDENTES

Una molécula de ácido desoxiribonucleico (ADN) consta de dos cadenas en hélice, complementarias, formadas por unidades alternantes de ácido fosfórico (grupo trifosfato) y una azúcar pentosa (desoxiribosa), con uniones transversales de bases nitrogenadas que pueden ser púricas (adenina, A, o guanina, G) o pirimidínicas (citosina, C, o timina, T), lo que constituye una estructura helicoidal dextrógira, y lleva la información genética codificada en la secuencia de las bases (Madigan *et al.*, 2000). En las células eucarióticas, la mayor parte del ADN se encuentra en el núcleo y se conoce como ADN cromosómico, está separado del resto de la célula (citoplasma) por una membrana de dos capas (membrana nuclear). Por otra parte, puede haber ADN extracromosómico en las mitocondrias y cloroplastos. Los elementos estructurales del ADN, llamados nucleótidos, son: desoxiadenosina-trifosfato (dATP), desoxiguanosina-trifosfato (dGTP), desoxitimidina-trifosfato (dTTP) y desoxicitidina-trifosfato (dCTP). Estos cuatro nucleótidos se denominan dNTP (por sus siglas en inglés de desoxinucleósido-trifosfato). El ADN contiene toda la información genética que define la estructura y la función de un organismo. Hay tres procesos diferentes encargados de la transmisión de la información genética: la replicación, la transcripción y la traducción.

La replicación del ADN es el proceso en que se basa la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Durante la replicación, la molécula de ADN se desenrolla y cada cadena se convierte en un ADN molde para la síntesis de una cadena complementaria nueva. Cada molécula hija consistente en una cadena nueva y una vieja de ADN, es una copia exacta de la molécula madre.

Las moléculas del cloroplasto y la mitocondria son importantes para trazar historias filogeográficas y de estructura poblacional genética estrechamente relacionada al

linaje, porque son de herencia uniparental y no recombinan. También nos permiten inferir cambios demográficos y de dispersión entre especies (Di Rienzo y Wilson, 1991).

La diversidad genética esta intrínsecamente ligada a la habilidad de las poblaciones, para responder a cambios ambientales. Ésta es generada por la selección natural, la deriva génica, la mutación y la migración (Bazin *et al*., 2006).

Para poder delimitar unidades de manejo o poblaciones de ballena gris, así como para determinar la relación existente entre los individuos de unidades poblaciones o stocks, se ha utilizado a la genética como herramienta y en particular se ha utilizado a la diversidad genética como modelo comparativo. La forma más ampliamente reconocida para hacer dicha comparación es mediante el análisis de la diversidad haplotípica (Nei, 1987).

En México se han realizado algunos trabajos sobre la genética de la ballena gris. Goerlitz y colaboradores (2003), analizaron 306 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial de 83 animales muestreados en sus zona de reproducción: 66 biopsias de la Laguna San Ignacio (55 hembra y 11 machos), 14 muestras de la laguna Ojo de Liebre (10 hembras y 4 machos), 2 de la Bahía Ballenas (machos) y 1 más de San José del cabo (hembra), revelando un total 28 haplotipos, de los cuáles 16 fueron únicos para la laguna San Ignacio y 2 para la Laguna Ojo de Liebre (Goerlitz *et al*., 2003) y 8 haplotipos compartidos entre regiones.

Las estimaciones de la diversidad nucleotídica ($\pi$) y haplotípica ($h$) para la laguna de San Ignacio (n=66) fue de $\Pi$ = 0.02 (SE = 0.01) y (h) de 0.98 (SE = 0.017), mientras que para la laguna Ojo de Liebre (n=14) fue de $\Pi$ = 0.02 (SE = 0.01) y h= 0.93 (SE = 0.017). La diversidad nucleotídica ($\pi$) y haplotípica ($h$) para el total de las muestras de las cuatro áreas combinadas (n=83) fue de $\Pi$ = 0.02 (SE = 0.01) y h= 0.95 (SE = 0.017) (Goerlitz *et al*., 2003). Así mismo, se encontraron diferencias significativas en las frecuencias haplotípicas entre las crías de ballena gris presentes en la laguna San Ignacio y las ballenas grises muestreadas fuera de las lagunas de congregación

invernal y de igual forma ocurrió para los machos, lo que sugiere cierta influencia filopátrica en los patrones del uso de hábitat de la ballena gris.

Los resultados genéticos indicaron que los animales parecen exhibir un grado de fidelidad y sugieren que la población de ballena gris del pacífico Noreste podría estar subestructurada en las zonas de congregación invernal. Esta subestructura podría o no afectar el flujo genético en la población, dependiendo si las hembras llegan a preñarse durante el recorrido hacía las zonas de congregación invernal.

Posteriormente en el año 2009, Alter y colaboradores, trataron de responder la pregunta de si la fidelidad a un área de reproducción podría generar diferencias genéticas entre las laguna de congregación en México. Para lo cual colectaron biopsias de 112 individuo: 56 de la laguna San Ignacio (35 hembras y 18 machos), 24 de laguna Ojo de Liebre (14 hembras y 6 machos) y 32 de Bahía Magdalena (28 hembras y 4 machos). Amplificaron 442 pares de bases de la región control del ADNm y encontraron 26 haplotipos. Los resultados, mostraron que no existen diferencias significativas entre ninguna de las lagunas, de la misma forma, el valor de Fst no fue significativo (Fst=-0.016, p=0.954).

## MÉTODOS

Los métodos de la colecta de las muestras y de la amplificación con primer universales, fueron descritos en el capítulo I de este trabajo.

Una vez que se obtuvieron las amplificaciones con primers universales y con los primers específicos con tinción y que se comprobó la presencia y calidad del ADN amplificado, por medio de un gel de electroforesis, se volvieron a amplificar las diluciones de ADN, esta vez sin colorante, para posteriormente ser enviadas a secuenciar a los laboratorios GENEWIZ en New Jersey, EUA. La mezcla maestra para llevar a cabo la amplificación de cada muestra fue en un volumen de 17µl, más un microlitro de ADN (100ng/µl).La mezcla estuvo compuesta de los siguientes reactivos: 11µl de agua destilada, 0.70µl de 50mM $MgCl_2$, 1µl de dNTPs, 1.7µl de solución buffer

(10x), 0.1µl de taq polimerasa (Taq Platinum-Invitrogen), betaina 0.7µl y 0.9µl de primers, 5'-TACCAAATGTATGAAACCTCAG-3' (Rosel *et al*., 1995) y el 5'-CCTCCCTAAGACTCAA
GG-3' (SWFSC).

Una vez recibidas las secuencias, estas se alinearon utilizando el programa Mega 5.0 (y posteriormente el 6.0) y con ayuda del programa DNAsp 5 se calculó: el número de haplotipos por región, los sitios polimórficos y la diversidades haplotipica (*h*) (Nei, 1987) y nucleotídica ($\pi$) (Tajima, 1983). Para ver la relación entre los haplotipos, así como sus frecuencias, se elaboró una red "Median Joining an Networks", mediante el programa PopART (Bandelt *et al*., 1999).

Mediante el programa Arlquin 3.1 (Schneider *et al*., 2000) se calculó el índice Fst (Excoffier *et al*., 2005), se realizó la prueba de AMOVA y se realizaron las comparaciones pareadas entre poblaciones. Utilizando el programa Mega 6.0 (Tamura *et al*., 2013).

## RESULTADOS

Se colectaron un total de 419 muestras de piel de ballena gris durante las temporadas 2012, 2013 y 2014; 120 provenientes de la laguna San Ignacio, 181 de Bahía Magdalena y 118 de la Laguna Ojo de Liebre, sin embargo, al realizar la comparación de las foto-identificaciones por zona, se encontró que a 42 individuos se les tomaron dos muestras, y por lo tanto el número total de biopsias se redujo a 377 muestras (Tabla 13).

Tabla 13. Número de biopsias por año y  por zona de congregación.

| Localidad y año | Número de biopsias | Número total de biopsias |
|---|---|---|
| Laguna Ojo de Liebre 2013 | 73 | 106 |
| Laguna Ojo de Liebre 2014 | 45 | |
| Laguna San Ignacio 2012 | 59 | 105 |
| Laguna San Ignacio 2013 | 61 | |
| Bahía Magdalena 2012 | 79 | 181 |
| Bahía Magdalena 2013 | 102 | |

Una vez extraído el ADN y amplificadas las muestras, se revisaron mediante un gel de electroforesis (Figura 15), y los productos obtenidos de la PCR fueron enviados a secuenciar a los laboratorios Genewiz, en New Jersey, EUA.

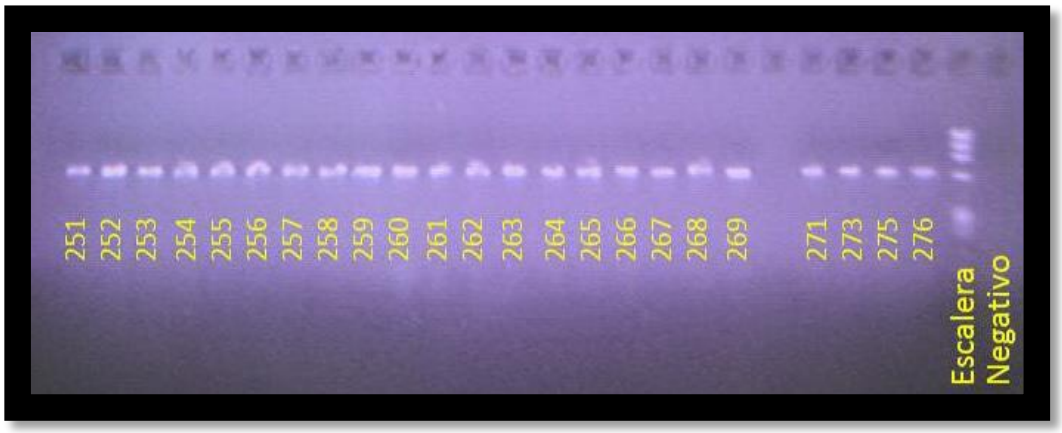



Figura 15. Muestras de DNA amplificadas con los primers B y TRO, observadas con luz UV

Una tercera parte de las muestras fueron enviadas a secuenciar con ambos primers (forward y reverse) para obtener secuencias complementarias, pero debido a que la mayoría de las muestras secuenciadas con el primer reverse (TRO) mostraban la secuencia de al menos 523 pares de bases, que era lo requerido para este trabajo, en las subsecuentes secuenciaciones sólo se utilizó este primer para secuenciarlas.

De las 377 muestras colectadas, se secuenciaron un total de 301 muestras: 85 muestras de la Laguna Ojo de Liebre, 97 muestras de la Laguna San Ignacio y 119 muestras de la Bahía Magdalena.

Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron alineadas mediante el programa Mega versiones (5 y 6) y comparadas con los 47 haplotipos existentes tanto para la Población Americana (incluyendo el Grupo de Alimentación de la Costa del Pacífico-PCFG), como para la Población Asiática. Posteriormente el archivo resultante (formato fasta) fue comparado mediante el programa DNAsp, para obtener el número de haplotipos, número de sitios polimórficos y frecuencias nucleotídicas y haplotípicas (tabla 14).

Tabla 14. Resumen de los haplotipos y frecuencias haplotípicas registradas por zona de congregación (Laguna Ojo de Liebre, Laguna San Ignacio y Bahía Magdalena), para las secuencias de 523 pares de bases.

| | LOL | LSI | BM |
|---|---|---|---|
| Número de secuencias | 85 | 97 | 119 |
| Sitios polimorficos | 37 | 34 | 36 |
| Número de haplotipos | 23 | 21 | 31 |
| Diversidad haplotípica (*h*) | 0.9342 | 0.9240 | 0.9477 |
| | ±0.0118 | ±0.0127 | ±.0074 |
| Diversidad nucleotídica ($\pi$) | 0.0165 | 0.0165 | 0.0167 |
| | ±0.0085 | ±0.0085 | ±0.0086 |

Al analizar la diversidad haplotípica (h), se encontró que la probabilidad de que dos individuos elegidos aleatoriamente dentro de las muestras, presenten haplotipos diferentes, varía entre el 92 y 94%, dependiendo de la zona de congregación, mientras que la diversidad nucleotídica es de 1.6% en todos los casos.

Se compararon los haplotipos y frecuencias haplotípicas de las tres zonas de congregación. En ninguno de los tres casos la frecuencia de un solo haplotipo fue mayor al 20%, el haplotipo tres fue el más abundante para la Laguna San Ignacio (19.59%), así como para la Bahía Magdalena (12.61%), mientras que el haplotipo más abundante para la laguna Ojo de Liebre fue el A (15.29%), (Figura 15).

Dentro de los haplotipos registrados, se encontraron cuatro nuevos haplotipos (51 a 54), los cuales fueron agregados a la lista de los 47 registrados anteriormente para posteriormente hacer todos los análisis. De estos cuatro haplotipos, uno fue específico de la laguna San Ignacio, dos más de la Bahía Magdalena y uno compartido entre la Laguna Ojo de Liebre y la Bahía Magdalena. Sin embargo, solo el haplotipo 54 se presentó en más de una muestra y los otros tres no han sido secuenciados nuevamente con ambos primers, para corroborar que efectivamente corresponden a haplotipos nuevos.

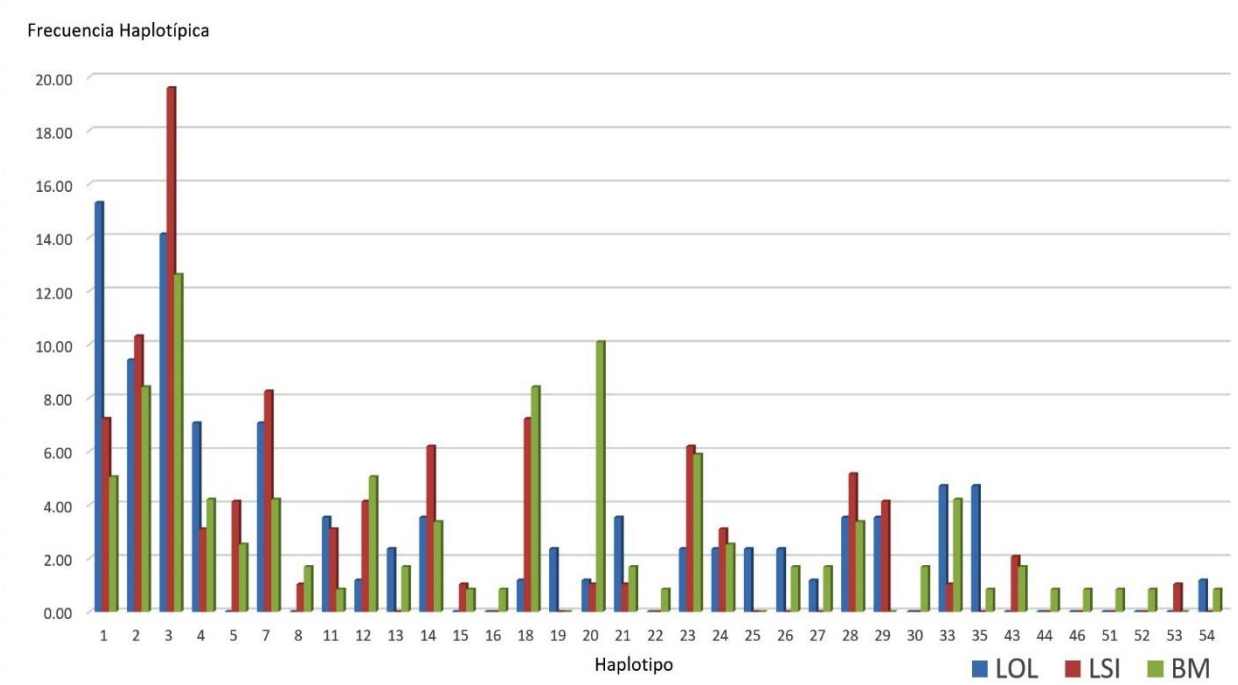



Figura 15. Gráfica de frecuencias haplotípicas para las lagunas Ojo de Liebre, San Ignacio y para la Bahía Magdalena.

Para tener una idea más visual de la relación de los haplotipos con su frecuencia, se realizó una red “Median Joining Networks” (Figura 16), utilizando el programa PopART (Bandelt *et al*., 1999).

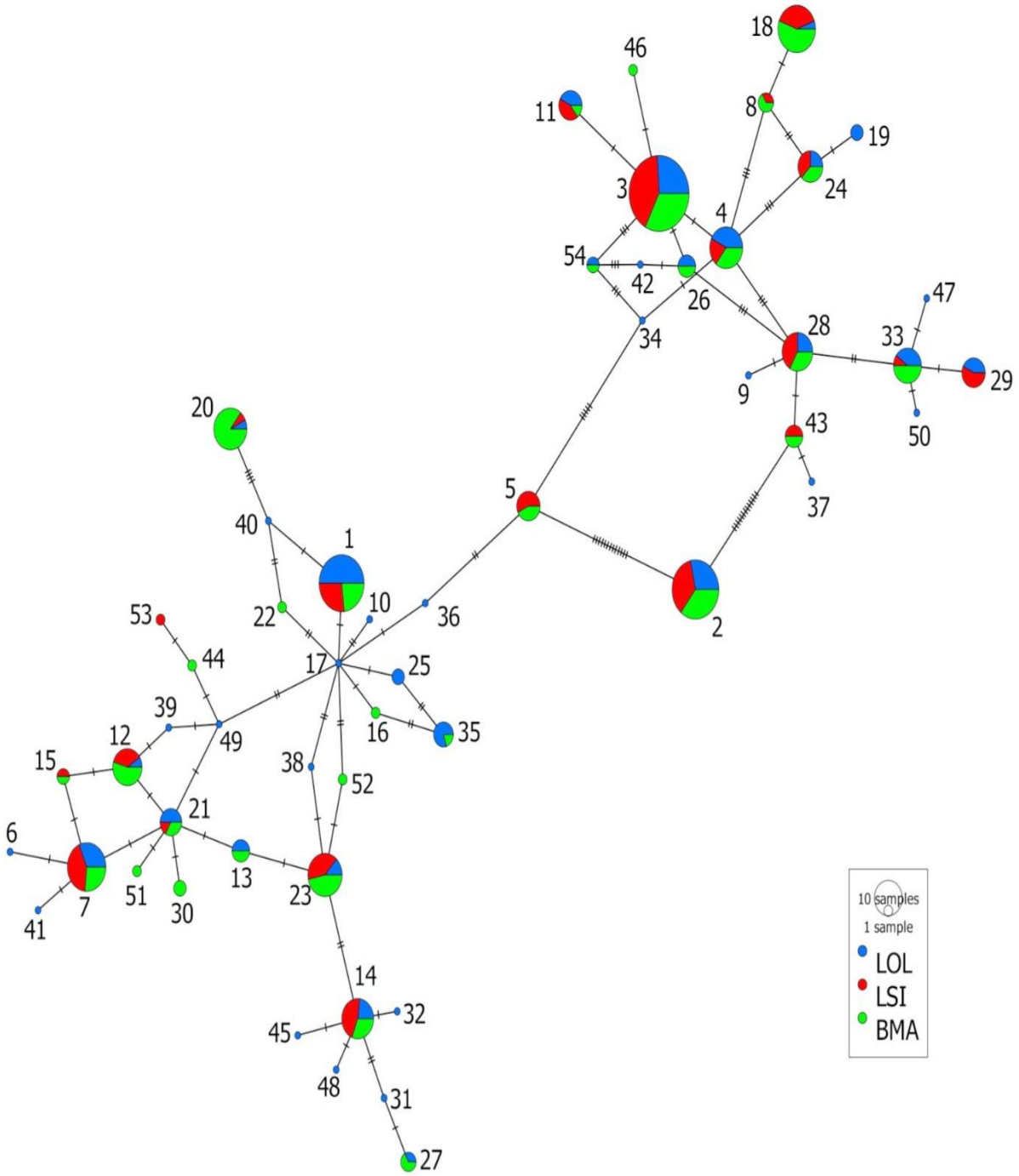



Figura 16. Red “Median Joining Networks” de los haplotipos presentes en las ballenas grises de la Península de Baja California.

Del Análisis de varianza para datos moleculares (AMOVA), utilizando el modelo de distancia molecular de Tamura / Nei (10,000 permutaciones), el índice Fst y la prueba de diferenciación entre pares de muestras, mediante el programa Arlequin 3.1, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 15):

Tabla 15. Resultados del análisis de AMOVA, donde se muestran los valores de Fst, ϕst, y *p*. para las tres zonas de congregación de la Península de Baja California (LOL, LSI y BM).

**ANALISIS AMOVA**

| Fuente de variación | g.l. | Suma de cuadrados | Varianza de los componentes | Porcentaje de la variación |
|---|---|---|---|---|
| Entre poblaciones | 2 | 1.402 | 0.00234 Va | 0.50 |
| Dentro de las poblaciones | 298 | 139.502 | 0.46813 Vb | 99.50 |
| Total | 300 | 140.904 | 0.47047 | |
| Índice de Fijación | | Fst | **0.00498** | |

Índices de fijación específicos por población

| Pob# | Nombre | Fst | ϕST |
|---|---|---|---|
| 1 | LOL | 0.00502 | -0.00157 |
| 2 | LSI | 0.00512 | -0.00158 |
| 3 | BM | 0.00484 | -0.00172 |

Va y Fst : P(valor aleatorio > valor obs.) = 0.03723
P(valor aleatorio = valor obs.) = 0.00000
Valor de P = **0.03723+-0.00188**

De acuerdo a los valores obtenidos de la AMOVA: Fst= 0.00498 y *p*=0.03723 < α=0.05, entonces se concluye que el valor de la prueba es significativo y que existe una subestructura de las zonas de congregación invernal, sin embargo el 99.5% de las

diferencias se debe a las diferencias dentro de las poblaciones y solo el 0.5 es debido a las diferencias entre poblaciones.

Para determinar cuál o cuáles zonas presentan diferencias, se realizó una prueba de comparaciones pareadas, para los valores de las frecuencias haplotípicas (Tabla 16).

Tabla 16. Resultados de las comparaciones entre los diferentes pares de congregaciones, donde se muestras los diferentes valores de Fst y *p.*

**Comparaciones pareadas**

==========

| Número | Nombre de la población |
|---|---|
| 1: | LOL |
| 2: | LSI |
| 3: | BM |

---

Valores de Fst de las poblaciones

---

Computo convencional del estadístico F de las frecuencias haplotípicas

| | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|
| 1 | 0.00000 | | |
| 2 | 0.00376 | 0.00000 | |
| 3 | 0.00864 | 0.00260 | 0.00000 |

---

valores de P para los Fst (con 10100 permutaciones)

---

| | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|
| 1 | * | | |
| 2 | 0.16196+-0.0032 | * | |
| 3 | 0.01653+-0.0013 | 0.18226+-0.0032 | * |

---

Matriz de significancia para los valores de P de los Fst

Valor de significancia de =0.05 (con 10100 permutaciones)

| | LOL | LSI | BM |
|---|---|---|---|
| LOL | | - | + |
| LSI | - | | - |
| BM | + | - | |

De acuerdo a los valores de *p,* obtenidos de la comparación entre pares de congregaciones (Population pairwise Fst´s), existen diferencias entre las frecuencias haplotípicas de la Laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena, pero no existen diferencias de estas dos con la Laguna San Ignacio.

## DISCUSIÓN

Durante este trabajo, utilizando 523 pares de bases, se registraron 35 haplotipos, siendo más que los reportados en estas mismas zonas por Goerlitz y colaboradores (2003), quienes analizaron 83 muestras (306pb) y registraron 28 haplotipos, así como de los encontrados por Alter y colaboradores (2009), quienes analizando 112 muestras obtuvieron 26 haplotipos (442pb).

De los 35 haplotipos registrados, 26 ya habían sido registrados previamente en la Población Americana, dos han sido registrados en la Población Asiática (Le Duc *et al*., 2002; Lang *et al*, 2010), tres más han sido registrados tanto en la Población Asiática como en el Grupo de Alimentación de la Costa del Pacífico (Frasier *et al.*, 2011; Lang *et al*., 2011) y cuatro más no habían sido registrados con anterioridad. De estos cuatro haplotipos tres se registraron en un solo individuo: haplotipo 52 en una hembra, los haplotipos 51 y 53 en dos individuos solitarios, mientras que el cuarto haplotipo (54) se registró en dos individuos, una hembra y un individuo solitario; sin embargo, las tres secuencias únicas (con un solo individuo), aún no han sido secuenciadas nuevamente con ambos primers para corroborar su identidad de haplotipos nuevos.

En cuanto a la diversidad de haplotipos presentes en las lagunas costeras, encontramos que la Bahía Magdalena presenta un mayor número con respecto a la Laguna San Ignacio y la Laguna Ojo de Liebre. Se sabe que en las poblaciones con gran diversidad de haplotipos existe una relación entre el número de haplotipos registrados y el número de muestras analizadas. Sin embargo le número de muestras colectadas para cada congregación (cercano a 100) es bastante representativo de la misma y es similar a los tamaños de muestra utilizados para comparar entre

poblaciones (Le Duc *et al*., 2002; Lang *et al*., 2010) o unidades de manejo (Stocks) de esta especie (Frasier *et al*., 2011; Lang *et al*., 2011).

En las frecuencias haplotípicas presentadas entre las tres localidades, encontramos que Bahía Magdalena es la que tiene la mayor frecuencia haplotípica (0.9477). Esto se debe al mayor número de haplotipos registrados (31) y a que la frecuencia de estos es bastante homogénea, no presentándose ninguno de los haplotipos en más del 13% del total de las muestras, mientras que la Laguna San Ignacio presenta solo dos terceras partes de los haplotipos, con respecto a Bahía Magdalena (21 haplotipos) y más del 50% de las muestras están representadas tan solo por 5 haplotipos. Por lo que su frecuencia haplotípica es ligeramente más baja y muy inferior a la presentada por Goerlitz y colaboradores (2003), quienes estimaron una *h* de 0.98 utilizando 66 muestras. Por otra parte la frecuencia haplotípica para Laguna Ojo de Liebre no presentó diferencias con la calculada en el trabajo de Goerlitz y colaboradores en el 2003 (h=0.93).

Analizando la diversidad nucleotídica (que es la probabilidad de que dos nucleótidos en el mismo loci, elegidos aleatoriamente sean diferentes), encontramos que esta es muy similar entre las tres congregaciones siendo de .0165 en la Laguna Ojo de Liebre y en la Laguna San Ignacio y de 0.167 para la Bahía Magdalena, pero estas son ligeramente más bajas que las reportadas por Goerlitz *et al*., (2003), esto tiene relación con el número de pares de bases analizadas en cada trabajo.

La red de haplotipos muestra que el haplotipo número dos es el que tiene mayor diferencia con respecto a los otros haplotipos, mientras que el haplotipo nuevo, el número 54, presenta una relación cercana con el haplotipo tres, que es uno de los más frecuentes, mientras que el haplotipo 53 (nuevo), presenta una relación cercana con otro de los haplotipos muy poco frecuentes el 44.

Con respecto a la prueba de AMOVA, el resultado fue estadísticamente significativo, por lo que se rechaza la hipótesis nula de que la diversidad haplotipica es similar en

todas las congregaciones, es decir que existe una subestructura. Sin embargo, el porcentaje de variación de la prueba se debe en un 99.5% a las fuentes de variación dentro de las poblaciones y solo el 0.5% a las fuentes de variación entre poblaciones. La existencia de una subestructura entre las zonas de congregación de la Península de Baja California, confirman lo propuesto por Goerlitz y colaboradores (2003), quienes con base en sus resultados genéticos indicaron que los animales parecen exhibir un grado de fidelidad y sugerían que la Población de ballena gris del pacífico Noreste podría estar subestructurada en las zonas de congregación invernal.

No sé realizó una prueba de AMOVA separada por sexos debido a que la obtención de las muestras estuvo determinada por cuestiones ligadas al monitoreo. En la Laguna San Ignacio el porcentaje de hembras (con cría) muestreadas fue casi del 75 % del total de animales biopsiados, mientras que en la Laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena estos porcentajes fueron del 80% y 27% respectivamente. Por lo que al hacer un análisis con estos porcentajes, los resultados no serían tan confiables para los individuos machos (debido al sesgo en los tamaños de muestra).

Para determinar las diferencias en las frecuencias haplotipicas entre congregaciones, se hizo una prueba de comparaciones pareadas, la cual mostró que existen diferencias significativas entre la Laguna Ojo de Liebre y la Bahía Magdalena, pero no con la Laguna San Ignacio. Esto podría tener relación con la fidelidad por parte de las hembras a una determinada zona de congregación, como fue descrito por Mate y colaboradores (2011), quienes registraron que de 8 ballenas que fueron rastreadas con marcas satelitales, tres de ellas, al realizar su migración hacia el sur, solo permanecieron en la Laguna Ojo de Liebre y posteriormente retornaron al norte, lo que soporta esta idea de fidelidad. Mientras que la similitud entre las frecuencias haplotípicas entre la Bahía Magdalena y La laguna San Ignacio está sustentadas en el 66% de reavistamientos de hembras con cría provenientes de la Bahía Magdalena, en la Laguna San Ignacio.

# CONCLUSIONES

Al ser la Población Americana tan grande, se siguen identificando haplotipos nuevos dentro de la población (cuatro), sin embargo aún falta secuenciar algunos nuevamente para confirmar que son haplotipos nuevos.

Existen diferencias significativas entre las frecuencias haplotípicas de las lagunas de la Península de Baja california, por consiguiente existe una subestructura entre las lagunas, sin embargo, esta diferenciación se debe principalmente a las diferencias dentro de las congregaciones y en mucho menor grado a las diferencias entre las lagunas. Las comparaciones pareadas de las congregaciones, mostraron que existen diferencias únicamente entre la Laguna Ojo de Liebre y la Bahía Magdalena. Estos resultados confirman lo encontrado con la foto-identificación.

REFERENCIAS

Alter, S. E., Flores, R.S., Nigenda, S., Urbán, R. J., Rojas, B. L. y Palumbi, R.S. 2009. Mitochondrial and Nuclear Genetic Variation across Calving Lagoons in Eastern North Pacific Gray Whales (Eschrichtius robustus) Journal of Heredity 2009:100(1):34–46

Bandelt, H., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16(1), 37–48.

Bazin, E., Glémin, S. y N. Galtier, 2006 Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. Science 312: 570–572.

Di Rienzo, A. y Wilson, C. A. 1991. Branchin pattern in the evolutionary tree for human mitocondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 88 pp 1597- 1601.

Excoffier, L., Laval, G. y Schneider, L. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online. 1: 47–50.

Goerlitz, S.D., Urbán, R.J., Rojas-Bracho, L., Belson, M. and Schaeff, M.C. 2003. Mitochondrial DNA variation among Eastern North Pacific gray whales (*Eschrichtius robustus*) on winter breeding grounds in Baja California. Can. J. Zool. 81: 1965–1972.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. y J. Parker, 2000. *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 991 pp.

Miller, S.A., Dykes, D.D. y Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research. 16 (3): 1225.

Nei, M. (ed). 1987. Molecular evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. 12 pp.

Schneider, S., Roessli, D. y Excoffier L. 2000. Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva.

Rosel, P.E., Dizon, A.E. y haygood, M.G. 1995. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbor porpoises, Phocoena Phocena, on interoceanic and regional scales. Can. J. Fish Aquat. Sci. 52: 1210-9.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. and Evol. 30: 2725–2729.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123:585–595.

# CAPITULO IV. RELACION DE LAS BALLENAS GRISES DE LA POBLACIÓN ASIÁTICA CON LAS BALLENAS QUE VISITAN LAS LAGUNAS COSTERAS DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA CON BASE EN SU FOTO-IDENTIFICACIÓN.

## ANTECEDENTES

Las ballenas grises de la Población Asiática (Pacífico Noroeste) se alimentan durante el verano en aguas circundantes a la Isla Sakhalin y en la parte Sureste de la Península de Kamchatka. En la Isla Sakhalin existen dos áreas principales: el área de Piltun, localizada en la Bahía Piltun y que se extiende desde la Bahía Ekhabi (al norte) hasta la Bahía Chayvo (al sur) (52°40’ N a 53°30’ N) y la segunda área se encuentra de 35 a 50 km fuera de la costa, al sureste de la Bahía Chayvo (51°50’ N. to 52°25’ N) (Vladimirov *et al*., 2010; Tyurneva *et al*., 2011). Mientras que las ballenas grises en la Península de Kamchatka se distribuyen en las Bahías Olga, Nalycheva y Vestnik principalmente (Tyurneva *et al.,* 2011). Sin embargo poco se sabe sobre las actuales rutas migratorias, así como de sus zonas de congregación invernal.

Históricamente, existen evidencias de que las aguas costeras del este de Rusia, la Península Coreana y Japón, eran parte de la ruta migratoria de estas ballenas y que la parte sur del mar de China era usada como zona de congregación invernal (Weller *et al*., 2002 y Weller y Brownell, 2012). Sin embargo, en Japón sólo existen 20 registros de ballena gris desde el año de 1955; 8 avistamientos, 6 ballenas enmalladas y 5 varadas y una que se desconoce cómo fue registrada (Kato *et al*., 2013). Mientras que para Corea el último registro fue realizado el 3 de enero de 1977 frente a Bang-eo jin y se trató de un par de animales migrando hacia el sur (Park, 1995 en Hyun Woo *et al*., 2013).

Estudios con base en la foto-identificación han documentado la fidelidad estacional a una zona de alimentación (Weller *et al*, 1999). Se sabe que las hembras reproductivas utilizan las zonas de alimentación de Sakhalin, en aquellos años en que están

preñadas y cuando presentan crías, así mismo se tiene el registro de individuos identificados anteriormente como crías (Weller *et al*., 2009).

De igual forma, con base en la foto-identificación, Weller y colaboradores, en el 2011 comparando las 181 foto-identificaciones de ballenas grises de la Población Asiática (1994-2009) contra del 1200 foto-identificaciones de la Población Americana (incluido el Grupo de Alimentación de la Costa del Pacífico). Encontraron seis recapturas entre ambas congregaciones (3 machos, 2 hembras y un individuo sin identificar). Todas estas recapturas ocurrieron al sur de Vancouver, British Columbia (Tabla 17).

Tabla 17. Recapturas entre Rusia y Vancouver, B.C. con su número de identificación (Weller *et al*., 2011).

| Rus-US ID (Rusia) | CRC ID (Vancouver BC) | Sexo |
|---|---|---|
| 2 | 817 | M |
| 32 | 1045 | M |
| 35 | 809 | M |
| 78 | 825 | S/D |
| 119 | 1040 | H |
| 135 | 1042 | H |

A partir de estos registros, así como de la ruta migratoria que siguió una ballena de la Población Asiática (Flex) (Mate, 2011) y el registro de dos individuos observados tanto en Sakhalin como en Vancouver, determinado mediante el análisis de micro-satélites (Lang *et al*., 2010), se ha renovado la pregunta de ¿cuál es la capacidad de movimiento de los individuos de la Población Asiática?

# MÉTODOS

Para cuantificar el número de movimientos migratorios realizados por las ballenas grises, de la Población Asiática hacía la Península de Baja California, como primer paso se compararon los dos catálogos de foto-identificación existentes para la Isla Sakhalin, Rusia; el catálogo realizado por Weller y colaboradores (Rusian-U.S. Research Program), el cual cuenta con 205 individuos fotoidentificados entre 1994 y el 2011 y el catálogo de Tyurneva y Yakovlev (Institute of Marine Biology, Russian Academy of Science) compilado entre los años 2002 a 2010, el cual tiene un total de 178 individuos foto-identificados. Las foto-identificaciones de ambos catálogos, fueron tomadas en la parte Noreste de la isla Sakhalin, en la cercanía de la laguna Piltun (52°50’ N y 143° 20’ E).

Una vez realizada estas comparaciones visualmente con la ayuda del programa ACDSee 2.5 y eliminados los individuos recapturados entre ambos catálogos, se procedió a comparar el total de individuos encontrados entre ambos catálogos, contra los 149 individuos foto-identificados en la Península de Kamchatka Rusia, pertenecientes al catálogo de Tyurneva y Vertyankin (Institute of Marine Biology, Russian Academy of Science), el cual fue elaborado entre los años 2004 y 2011.

Una vez completadas las comparaciones de las ballenas pertenecientes a la Población Asiática, se inició la comparación con las 6787 foto-identificaciones (lados derecho e izquierdo) de la ballenas grises registradas en la Península de Baja California, México, registradas entre el los años 2001 a 2013.

Una vez obtenidos los resultados se calculó el índice de intercambio y se hizo una prueba Ji-cuadrada para ver si el movimiento entre las dos zonas de alimentación y las tres de reproducción es homogéneo o heterogéneo.

# RESULTADOS

*Comparación entre los catálogos de ballena gris de la Población del Pacífico Noroeste o Población Asiática.*

Al realizar la comparación entre los dos catálogos elaborados a partir de foto-identificaciones tomadas alrededor de la Isla Sakhalin (36,490 comparaciones totales), se encontraron 225 individuos diferentes, de los cuales 160 individuos están presentes en ambos catálogos, 47 únicamente están presentes en el catálogo de Durbin y Weller y 18 solo en el catálogo de Tyurneva y Yakovlev.

Posteriormente, las 205 foto-identificaciones obtenidas de la Isla Sakhalin, fueron comparadas con las 149 tomadas en la Península de Kamchatka, de estas 30,545 comparaciones, se encontraron un total de 291 individuos diferentes, de los cuales 84 individuos han estado presentes en ambas zonas, 142 solo han sido registrados en la Isla Sakhalin y 65 únicamente han sido observados en la Península de Kamchatka.

*Comparación entre los catálogos de ballena gris de la Población del Pacífico Noroeste y la Península de Baja California*

Se compararon las 291 foto-identificaciones de ballena gris de la Población Asiática (Isla Sakhalin y Península de Kamchatka) registradas entre 1994 y 2011, contra las 6787 foto-identificaciones registradas entre el 2001 y el 2013 en la Península de Baja California (laguna Ojo de Liebre, laguna San Ignacio y Bahía Magdalena). Este número de foto-identificaciones, corresponde al total de foto-identificaciones registradas sin eliminar registros de individuos con recapturas interanuales o en dos diferentes lagunas.

De las 1,975,017 comparaciones se encontraron 21 recapturas (8 hembras y 6 machos y 7 ballenas sin determinar); 18 con la laguna de San Ignacio, 2 con la laguna Ojo de Liebre y una más con la Bahía Magdalena (Tabla 18). Y en cuanto a las zonas de

congregación en Rusia, de las 21 recapturas, 15 fueron con la Isla Sakhalin, 4 con la Península de Kamchatka y 2 fueron registradas en ambas zonas. Es importante mencionar que las comparaciones de las foto-identificaciones de la Población Asiática fueron realizadas con la colaboración de tres tesistas del PRIMMA/UABCS y de la Dra. Olga Tyurneva.

Tabla 18. Recapturas registradas entre las ballenas grises de la Población del Pacífico Noroeste y la Península de Baja California.

| **UABCS – LSIESP ID - AÑO** | **Burdin y Weller (Sakhalin) ID - AÑO** | **Yakovlev Tyurneva y (Sakhalin) ID -AÑO** | **Tyurneva y Vertyankin (Kamchatka) ID - AÑO** | **Sexo** |
|---|---|---|---|---|
| **02-0336-D-LOL**<br>2002 | **27**<br>1995, 2009 | **2**<br>2002, 2005 | **-** | M |
| **13-0096-D-LOL-M**<br>2013 | **107**<br>2002, 2011 | **108**<br>2004, 2007 | **-** | H |
| [redacted] | | | | |
| **06-0131-D-LSI**<br>2006 | **28**<br>1997, 2009 | **59**<br>2005, 2007 | **-** | M |
| **06-0132-D-LSI**<br>2006 | **94**<br>2000, 2007 | **57**<br>2003, 2006, 2007, 2008 | **-** | S/D |
| **06-0176-D-LSI**<br>2006 | **69**<br>1998, 2009 | **113**<br>2004, 2005, 2007 | **-** | M |
| **06-0209-D-LSI**<br>2006 | **20**<br>1997, 2009 | **80**<br>2006, 2007 | **-** | M |
| **07-0328-I-LSI / 10-0639-D-LSI**<br>2007, 2010 | **52**<br>1998, 2009 | **26**<br>2002, 2005, 2008 | **-** | M |
| **07-0457-D-LSI / 11-0526-D-LSI-M**<br>2007, 2011 | **103**<br>2001, 2005 | **119**<br>2005, 2006, 2007 | **-** | H |
| **08-0051-D-LSI-M / 10-0396-D-LSI / 12-0111-D-LSI-M**<br>2008, 2010, 2012 | **85**<br>1999, 2001, 2009, 2011 | **51**<br>2004, 2005, 2007 | **-** | H |
| **08-107-I-LSI-M**<br>2008 | **63**<br>1997, 2008 | **47**<br>2003, 2005, 2007 | **-** | H |
| **09-0506-D-LSI**<br>2009 | **-** | **166**<br>2005, 2011 | **15**<br>2004 | S/D |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **09-0696-D-LSI-M / 12-0549-D-LSI**<br>2009, 2012 | **42**<br>97-00, 11, 12 | **90**<br>2003, 2005 | **1**<br>2008, 2009 | H |
| **10-0739-D-LSI-M**<br>2010 | **29**<br>1997, 2009 | **28**<br>2003, 2005 | **-** | H |
| **11-0273-D-LSI**<br>2011 | **91**<br>2000, 2009 | **137**<br>2007 | **-** | M |
| **11-0308-I-LSI**<br>06-mar-13 | **-** | **-** | **36**<br>2007 | S/D |
| **11-0362-D-LSI**<br>2011 | **-** | **-** | **134**<br>2010 | S/D |
| **11-0505-D-LSI-M**<br>2006 | **3** | **114**<br>2005, 2008 | **-** | H |
| **12-0229-D-LSI-M**<br>2012 | **-** | **-** | **117**<br>2010 | H |
| **12-0436-D-LSI**<br>2012 | **47**<br>95, 98-05, 07,08, 10-12 | **9**<br>2002, 2004, 2005 | **-** | S/D |
| **12-0551-D-LSI**<br>2012 | **200**<br>2011 | **-** | **-** | S/D |
| | | | | |
| **12-0272-D-BM / 13-0267-D-BM**<br>2012, 2013 | **-** | **-** | **114**<br>2009 | S/D |

(H- Hembra, M- Macho, S/D- sexo sin determinar)

De las 18 ballenas de la Población del Pacífico Noroeste, recapturadas en la Laguna San Ignacio, 13 provienen de Sakhalin, 3 de Kamchatka y 2 han estado en ambas zonas (Figura 18). Así mismo, tres ballenas (dos hembras y un macho), fueron registradas en México en dos años diferentes y una más (hembra) en tres años diferentes, dos de las ocasiones acompañada de una cría. También dentro de las recapturas entre laguna San Ignacio y las ballenas del Pacífico Noroeste, se registraron 6 recapturas en el mismo año (2 hembras, 2 machos y 2 individuos sin identificar su sexo), todas ellas con la Isla Sakhalin, Rusia.

En cuanto a las dos ballenas de la laguna Ojo de Liebre (una hembra y un macho), ambas fueron recapturadas con la Isla Sakhalin y una de ellas (macho) se registró en ambos lugares en el mismo año (2002).

Finalmente, la única ballena de la Bahía Magdalena fue registrada en la Península de Kamchatka y se observó en la Bahía Magdalena durante dos años consecutivos (2012 y 2013). Cabe mencionar que en ambos años, esta ballena presentaba el síndrome de las ballenas flacas (Brownell y Weller, 2001; Bradford *et al*., 2007).

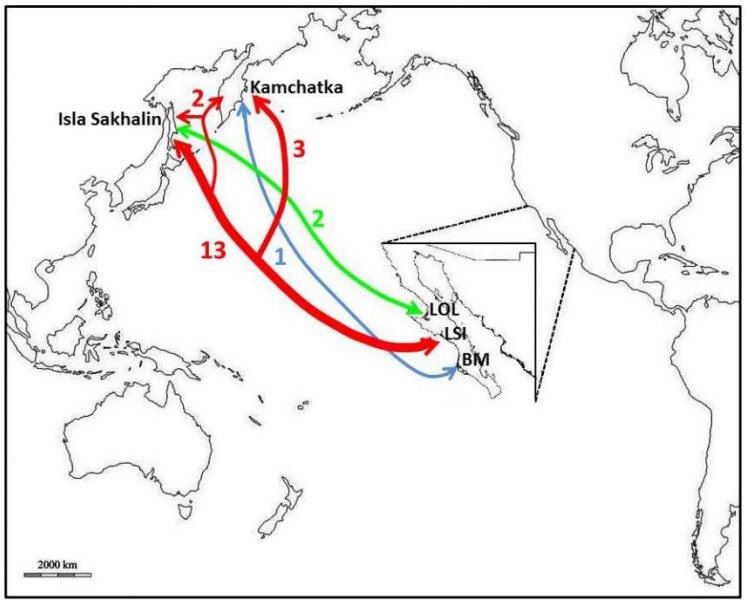



Figura 18. Número de migraciones registradas entre las ballenas grises de la Población del Pacífico Noroeste y la Península de Baja California.

Cabe mencionar que estos datos forman parte del proyecto “Pacific Wide Study on Population Structure and Movement Patterns of North Pacific Gray Whales”, patrocinado por la Comisión Ballenera Internacional (IWC) y como parte de este trabajo, investigadores de la SWFSC encontraron dos recapturas más al comparar el catálogo de foto-identificación de Laura Conner y Eduardo Hillman del Center for Coastal Studies, School for Field Studies de Puerto San Carlos, con registros de la Bahía Magdalena (1998-2010). Estas dos recapturas no fueron incluidas en el análisis de datos de este trabajo.

Los valores obtenidos del índice de intercambio entre las congregaciones de la zona de alimentación (Isla Sakhalin con n=205 y Península de Kamchatka con n=149) y las congregaciones de la zona de reproducción (Laguna Ojo de Liebre con n= 1236, Laguna San Ignacio con n=4955 y Bahía Magdalena con n=596) son:

Tabla 19. Índice de intercambio entre zonas de alimentación (Población Asiática) y zonas de reproducción de la Población Americana.

| | Laguna San Ignacio | Laguna Ojo de Liebre | Bahía Magdalena |
|---|---|---|---|
| Peninsula de Kamchatka | 0.007 | 0 | 0.011 |
| Isla Sakhalin | 0.015 | 0.008 | 0 |

Siendo el índice de intercambio más grande entre la Laguna San Ignacio y la isla Sakhalin, seguido del índice de intercambio entre Bahía Magdalena y la Península de Kamchatka. En cuanto a la prueba de Ji-cuadrada para determinar la probabilidad de recaptura entre zonas de alimentación y de reproducción los resultados son los siguientes (Tabla 20).

Tabla 20. Prueba de Ji-cuadrada para determinar la homogeneidad en la probabilidad de recaptura entre las ballenas de la Población Asiática y las que se congregan en las lagunas de la Península de Baja California.

| Zonas de congregación comparadas | Número de comparaciones | Proporción | Rec Obs | Rec Esp | $Xi^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| L. Ojo de Liebre - Isla Sakhalin | 253380 | 0.105 | 2 | 2.00 | 0.00 |
| L. Ojo de Liebre - P Kamchatka | 184164 | 0.077 | 0 | 1.46 | 1.46 |
| L. San Ignacio - Isla Sakhalin | 1015775 | 0.423 | 13 | 8.04 | 3.06 |
| L. San Ignacio - P Kamchatka | 738295 | 0.307 | 3 | 5.84 | 1.38 |
| Bahía Magdalena - Isla Sakhalin | 122180 | 0.051 | 0 | 0.97 | 0.97 |
| Bahía Magdalena - P Kamchatka | 88804 | 0.037 | 1 | 0.70 | 0.13 |
| Total | 2402598 | 1.000 | 19 | 19 | 6.99 |
| **$Xi^2$=6.99 $\chi^2_{0.95,5}$=11.07** | | | | | |

El valor de Ji-cuadrada no fue estadísticamente significativo, por lo que la probabilidad de recaptura entre las zonas de alimentación y de reproducción es homogénea, lo que implica que el movimiento entre congregaciones también es homogéneo.

## DISCUSIÓN

Los índices de intercambio obtenidos entre las zonas de alimentación y las zona de reproducción, a pesar de ser relativamente bajos, son similares a los obtenidos entre las lagunas de la zona de reproducción, este valor bajo se debe principalmente al tamaño de la Población Americana que es grande, N=21,911 individuos (Punt y Wade, 2010), más que a la falta de intercambio entre poblaciones. De acuerdo al valor obtenido de la prueba de Ji-cuadrada se determinó que la probabilidad de recaptura es homogénea entre las zonas de alimentación y las zonas de reproducción. Si tomamos en cuenta que el número de identificaciones de la zona de reproducción utilizadas para este análisis corresponde a un tercio del tamaño de la Población Americana, podríamos suponer que al incrementar el número de identificaciones comparadas, se incrementaría el número de recapturas y si este incremento fuera proporcional, se podría llegar a registrar hasta el 40% de los individuos de la Población Asiática (aproximadamente 62 individuos de 155), lo cual sería un número de recapturas muy alto para dos poblaciones genética y espacialmente separadas (entre 8200 km Kamchatka y 9500 km Sakhalin). Esta idea está fundamentada en qué tanto las seis ballenas registradas en Vancouver en 2004 y 2008 (Weller *et al*.,2011) , así como una de las que presentaban marca satelital (Varvara) y las de este trabajo, son 30 individuos diferentes .

En cuanto a la idea de que las ballenas grises de la Población Asiática posiblemente viajen en grupos hacia o desde las zonas de reproducción de la Población Americana, los resultados obtenidos en este trabajo respaldan lo encontrado por Weller y colaboradores en 2011, quienes  en su búsqueda de recapturas entre las poblaciones Asiática y Americana encontraron 6 recapturas entre Sakhalin y el sureste de la Isla de Vancouver, ocurridas en la misma agrupación o en agrupaciones cercanas: El dos de

mayo de 2004 tres ballenas fueron recapturadas en un solo grupo (2 machos y una ballena de la que se desconoce su sexo), mientras que el 25 de abril de 2008 otras tres ballenas fueron registradas en dos grupos cercanos (dos hembras en una agrupación y un solitario en otra cercana). En el caso de este trabajo, el 24 de febrero dos ballenas pertenecientes a la Población Asiática (un macho y una ballena sin identificar su sexo), fueron registradas juntas, mientras que una tercera ballena (macho) fue vista ese mismo día por la tarde, no muy lejos de la primera agrupación. Así mismo, el 25 de febrero de 2012 dos ballenas de la Población Asiática (una hembra y un individuo sin identificar su sexo), también fueron vistas en dos agrupaciones seguidas (con diferencia de 3 minutos entre avistamientos). Este fenómeno, suponemos puede deberse a dos factores: el primero es que hay mayor seguridad en aguas abiertas al viajar en grupo y el segundo podría tener que ver con el aprendizaje de nuevas rutas migratorias por parte de alguno de los animales (reclutamiento). Algo que cabe resaltar es que las fechas de los registros hechos en Vancouver (abril y mayo) corresponden a las fechas de migración hacia el norte por parte de las ballenas grises. Esto, aunado a que cuatro de las seis ballenas fueron vistas en fechas posteriores de ese mismo año en Sakhalin, sugiere que la migración hacia el Pacifico Noroeste también podría ser en grupos.

Algo también importante de resaltar en este trabajo es la presencia de una ballena (12-0272-D-BM/ 114) en la Bahía Magdalena en años consecutivos (2012 y 2013), la cual fue registrada en la Península de Kamchatka en 2009. Esta ballena presentaba el síndrome de las ballenas flacas en ambos años (Bradford *et al*., 2007). Lo que genera la pregunta de si las ballenas de la Población asiática podrían alternar zonas de alimentación entre años o si las condiciones ambientales en las costas Mexicanas son muy favorables para ellas, como para realizar una migración tan larga, aun en condiciones corporales desfavorables (flacas).

En cuanto al sexo de los 21 animales registrados en este trabajo y los 9 de trabajos anteriores, encontramos que la proporción de sexos de las ballenas grises que migran de la Población Asiática hacia la Población Americana es casi de 1 a 1 con 12

hembras, 10 machos y 8 individuos sin identificar. Y tomando en consideración que en el 2012 existían 30±4 hembras sexualmente maduras (Burdin *et al*., 2013), podemos concluir que las lagunas de la Península de Baja California, son de gran importancia no solo para la Población de ballena gris Americana, sino también para la Asiática que se encuentra en grave riesgo de extinción.

## CONCLUSIONES

El índice de intercambio entre las zonas de alimentación de la Población Asiática y las zonas de reproducción de la Población Americana son bajos, pero esto se debe a un tamaño poblacional grande, más que a la falta de flujo de animales entre poblaciones.

No existen diferencias significativas en la probabilidad de recaptura entre poblaciones por lo que se considera que el movimiento de animales es homogéneo. De este movimiento se registraron 21 ballenas grises con una proporción de sexos cercana a 1:1.

Los resultados de este trabajo confirman que algunas ballenas de la Población Asiática realizan la migración (en ambos sentidos) en grupos y que inclusive permanecen juntas por algún tiempo en las zonas de reproducción.

Los registros de diferentes animales por diferentes métodos (foto-identificación, microsatélites, marcas satelitales) muestran que una considerable parte de la Población Asiática ha realizado la migración hacía la Población Americana en algún momento.

Al menos una cuarta parte de las hembras sexualmente maduras, de la Población Asiática (8 de 30) han sido registradas en las lagunas de la Península de Baja California y en particular en la Laguna San Ignacio (7 de las 8 hembras), lo que refleja la gran importancia de este lugar tanto para la Población Americana, como para la diezmada Población Asiática

# REFERENCIAS

Bradford, A. L., Weller, D. W., Ivashchenko, Y. Burdin, M. A. y Brownell, R. L. 2007 Seasonal and annual variation in body condition of western gray whales off northeastern Sakhalin Island, Russia: a preliminary report. Paper SC/59/BRG22 presented to the International Whaling Commission

Burdin, M.A., Sychenko, A.O and Sidorenko, M.M., 2013. Status of western gray whales off northeastern Sakhalin Island, Russia in 2012. SC/65a/BRG03 IWC Meeting Report.

Kim, H.Y., Sohn, H., Yong-Rock A., Kyum Joon Park, Doo Nam Kim y Doo Hae An. 2013 Report of Gray Whale Sighting Survey off Korean waters from 2003 to 2011, SC/65a/BRG26 reunión de la IWC

Kato, H., Miyashita, T., Kishiro, T., Kanda, N., Bando, T., Mogoe, T., Nakamura, G. y Sakamoto, T. 2013. Status Report of Conservation and Researches on the Western North Pacific Gray Whales in Japan, May 2012 – Abril 2013, SC/65a/BRG20, IWC meeting 2013.

Mate B., Bradford A., Tsidulko G., Vertyankin V., and Ilyashenko V. 2011. Late-Feeding Season Movements of a Western North Pacific Gray Whale off Sakhalin Island, Russia and Subsequent Migration into the Eastern North Pacific. Paper SC/63/BRG23 presented to IWC Scientific Committee, Tromsö, Norway, June 2011.

Tyurneva O. Y., Yakovlev M.Y and Vertyankin V. V. 2011. Results of photographic identification study of the gray whale (Eschrichtius robustus) offshore northeast Sakhalin Island and southeast Kamchatka Peninsula, Russia, 2010. SC_63_BRG12

Tyurneva O. Y., Yakovlev M.Y, The Western Pacific Gray Whales of Sakhalin Island 2002 – 2008. Institute of marine Biology (Russian Academy of Science, Vladivostok, Russia.

Tyurneva O.Y. and Vertyankin V. The North Pacific Gray whales Master catalogue 2004 – 2011. Institute of Marine Biology, Russian Academy of Science

Vladimirov V.A., Starodymov S.P., Kornienko M.S. and Muir J.E. 2010., Distribution and abundance of Western gray whales in the waters off Northeast Sakhalin Island, Russi, 2004-2009. SC/62/BRG4.

Lang, R.A, 2010. The population genetics of gray whales (Eschrichtius robustus) in the North Pacific. Ph.D. thesis, University of California San Diego, 202 pp.

Weller, D.W., Bradford, A.L., Tsidulko, A.G., Ivashchenko, V.Y., Lang, A.R., Kim H.W., Sidorenko, M., Rickards, H. S., Burdin, A.M. and Brownell, R.L. Jr. Western Gray Whales of Sakhalin Island, Russia: a Catalog of Identified Individuals.

Weller, D.W., Wursig, B., Bradford, A.L., Burdin, A.M., Blokhin, S.A., Minakuchi, H. y Brownell, R.L.Jr. 1999. Gray whales (*Eschrichtius robustus*) off Sakhalin Island, Russia: Seasonal and annual patterns of occurrence. Marine Mammal Science 15:1208-1227.

Weller, D.W., Burding, A.M., Würsing, B., Taylor, B.L. y Brownell, R.L. Jr, 2002. The western gray whale: a review of past exploitation, current status and potential threats. J. Cetacean Res. Manage. 4(1): 7-12

Weller, D. W. y R. L. Brownell, Jr. 2012. A re-evaluation of gray whale records in the western North Pacific. Paper SC/64/BRG10 presented to the International Whaling Commission Scientific Committee (Unpublished). 4 pp.

Weller, D.W., Klimek A.,Bradford, A.L., Calambokidis J.,Lang A.R, Gisborne B., Burdin A.M, Szaniszlo, W. and Brownell Jr R.L. 2011. Movements of western gray whales from the Okhotsk Sea to the eastern North Pacific. SC/63/BRG6

# CAPITULO V. RELACIÓN DE LAS BALLENAS GRISES DE LA POBLACIÓN ASIÁTICA CON LAS BALLENAS QUE VISITAN LAS LAGUNAS COSTERAS DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA, CON BASE EN SU DIVERSIDAD GENÉTICA.

## ANTECEDENTES

En el 2002, Le duc y colaboradores utilizaron las secuencias de la región control del ADN mitocondrial para examinar la diferenciación entre las poblaciones de ballena gris Asiática y Americana. Utilizando 45 muestras del Pacífico Noroeste y 120 muestras del Pacífico Noreste, secuenciaron 523 pares de bases, encontrando 36 haplotipos (33 se presentaron en las muestras del lado Este y 10 en las muestras del lado Oeste, además de compartir 7 haplotipos entre ambas muestras) y al analizarlos encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias haplotípicas de las dos zonas ($\Phi_{ST}$=0.117, $p < 0.001$; $X^2$=65.9, $p < 0.001$; Fst= 0.087, $p < 0.001$), por lo que fueron consideradas como poblaciones independientes. Las poblaciones aparentemente no han estado separadas el tiempo suficiente, como para que los haplotipos compartidos sean removidos por deriva génica, por lo tanto, no hay caracteres diagnosticos o caracteres dentro de la region de 523 pares de bases que pueda ser una buena fuente para distinguir una poblacion de la otra (Le duc *et al*., 2002)

La diversidad haplotípica (*h*) difiere de forma importante, siendo de 0.95 +/-0.01 en la Población Americana, y de 0.70 +/-0.05 en la Población Asiática, la diferencia del porcentaje promedio (diversidad nucleotídica $\pi$) entre individuos va del 1.6% en al Población Americana al 1.7% en la Población Asiática. La diversidad haplotípica (*h*) es afectada tanto por el número de haplotipos presentes en una población, como por su frecuencia relativa. Si existen una gran cantidad de haplotipos y sus frecuencias relativas son iguales, entonces el valor de la diversidad haplotípica (*h*) aumenta. En los datos de De Luc y colaboradores (2002), los diferentes valores de *h* provienen principalmente de la distribución de las frecuencias haplotípicas, las cuales difieren enormemente entre ambas poblaciones.

En las muestras de las ballenas del Población Americana, el haplotipo más común únicamente estuvo presente en 10.8% de los individuos, y 7 de los 33 haplotipos estuvieron presentes en 5% de las muestras. En contraste los dos haplotipos más comunes dentro de las 45 muestras de las ballenas de la Población Asiática, están representadas por 20 (44.4%) y 15 (33.3%) individuos, con los 8 haplotipos restantes presentes en un par de animales o en uno solo (Le Duc *et al*., 2002).

Posteriormente, en los años 2010 y 2011, Lang y colaboradores con un mayor número de muestras tomadas en ambas congregaciones del Pacífico Norte (n=377), encontraron 40 haplotipos e identificaron que la diversidad haplotípica (*h*) fue alta en todo el estrato del Pacífico Noreste (ENP) (h=0.952-0.967), pero fue baja en el estrato del Pacífico Noroeste (WPN) (h=0.77, Sakhalin, h=0.80, sureste de Kamchatka). La diversidad nucleotídica ($\pi$) fue ligeramente más alta en el Pacifico Noroeste (1.8 – 1.9%) que en el Pacifico Noreste (1.2 a 1.6%) y por lo tanto confirmaron esta diferenciación genética entre ambas poblaciones.

Así mismo Lang y colaboradores en el 2010, compararon el sexo, el ADN mitocondrial y el ADN nuclear (8 de 13 loci), de todas las muestras analizadas, para identificar los archivos genéticos idénticos, es decir que pertenecieran a un mismo individuo. Esto con la finalidad de inferir movimientos de individuos entre áreas. Encontraron siete muestras que compartían archivos genéticos idénticos, incluyendo un animal muestreado en San Diego y Chukotka, cuatro animales biopsiados en Sakhalin y al Sureste de Kamchatka y dos animales más muestreados en Sakhalin, Rusia y la costa de California.

Mientras que los análisis genéticos soportan una demografía independiente y un grado de aislamiento entre la Población del Pacífico Noroeste y la Población del Pacífico Noreste, los movimientos putativos detectados en ese trabajo, sugieren que algunos de los animales que pasan el verano en Sakhalin, Rusia, pasan el invierno en el Pacífico Noreste, al menos en algunos años (Lang *et al*., 2010)

En el pasado se pensaba que el movimiento entre poblaciones era llevado a cabo por los machos, sustentándose en que la mayoría de los haplotipos encontrados en sólo uno o dos individuos, está representado por machos (LeDuc *et al*., 2002; Lang *et al*., 2010), así como en los bajos niveles de diferenciación encontrados cuando únicamente los machos fueron comparados entre las poblaciones del Pacifico Noreste y Noroeste (Lang, *et al*., 2010). Sin embargo los nuevos hallazgos indican qué tanto hembras como machos han migrado entre poblaciones.

Por otra parte Frasier y colaboradores (2011) y Lang y colaboradores (2014), estudiaron la relación del Grupo de Alimentación de la Costa del Pacifico (PCFG), con el resto de la Población Americana. Utilizando 40 muestras del PCFG y 105 de la Población Americana, secuenciaron 523 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial y encontraron diferencias significativas en las frecuencias haplotípicas entre ambos grupos, por lo que ahora se consideran como stocks o unidades de manejo diferentes.

De acuerdo a todos estos antecedentes, se sugiere que la estructura poblacional de las ballenas grises podría ser más compleja de lo que se había pensado. Tal vez no todos los animales que se alimentan en Sakhalin y Kamchatka, Rusia comparten un mismo lugar de invernación, o quizás algunos animales podrían intercalarse entre zonas de invernación. Y debido a que el tamaño poblacional de la congregación del Pacífico Noroeste es muy pequeño, es necesario enfocar los estudios en identificar las rutas migratorias y las zonas de congregación invernal usadas por las ballenas grises de cada una de las zonas de alimentación (Lang *et al*., 2010).

## MÉTODOS

El método de colecta de las biopsias, la extracción y amplificación del ADN de la piel de las ballenas grises se encuentran descritos en los capítulos I y III de este trabajo.

Las secuencias obtenidas de la muestras colectadas en la las lagunas costeras de la Península de Baja California, fueron alineadas en el programa Mega 6 y fueron comparadas con los 47 haplotipos obtenidos de las secuencias del trabajo de Le Duc *et al*., 2002 y Lang *et al*. (2010) (muestras disponibles en el GenBank) y aquellas que aún no estaban disponibles en el Gen Bank, fueron solicitadas a los autores. Con la ayuda del programa DNAsp 5, se calculó: el número de haplotipos por región, los sitios polimórficos y la diversidad haplotipica (Nei, 1987) y nucleotídica ($\pi$) (Tajima, 1983) y para ver la relación entre los haplotipos, así como sus frecuencias, se elaboró una red "Median Joining an Networks" mediante el programa PopART (Bandelt *et al*., 1999).

Mediante el programa Arlequin (Schneider *et al*., 2000), se realizó la prueba de AMOVA, se calculó el índice Fst (Excoffier *et al*., 2005), y se realizaron las comparaciones pareadas entre poblaciones.

## RESULTADOS

Del total de muestras colectadas y eliminando las muestras repetidas (es decir que fueron sacadas de un mismo animal), se obtuvo un total de 377 muestras de piel de ballena gris durante las temporadas 2012 a 2014; 120 de la Laguna San Ignacio, 181 de la Bahía Magdalena y 73 de la Laguna Ojo de Liebre, (Tabla 21).

Tabla 21. Número de biopsias por año y zona de congregación.

| Localidad y año | Número de biopsias | Número total de biopsias |
|---|---|---|
| Laguna Ojo de Liebre 2013 | 73 | 106 |
| Laguna Ojo de Liebre 2014 | 45 | |
| Laguna San Ignacio 2012 | 59 | 105 |
| Laguna San Ignacio 2013 | 61 | |
| Bahía Magdalena 2012 | 79 | 181 |
| Bahía Magdalena 2013 | 102 | |

A cada muestra se les extrajo el ADN siguiendo el protocolo de Miller *et al*. (1998), posteriormente, se les amplifico un segmento de 523 pb de la región control, utilizando

los primers específicos. Los productos obtenidos de la PCR fueron revisados mediante un gel de electroforesis y posteriormente fueron enviados a secuenciar a los laboratorios Genewiz, en New Jersey, EUA. De las 377 muestras colectadas, se secuenciaron un total de 301 muestras: 85 muestras de la Laguna Ojo de Liebre, 97 muestras de la Laguna San Ignacio y 119 muestras de la Bahía Magdalena.

Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron alineadas mediante el programa Mega versiones (5 y 6) y comparadas con los 47 haplotipos existentes tanto para la Población Americana (incluyendo el Grupo de Alimentación de la Costa del Pacífico-PCFG), como para la Población Asiática, más los cuatro registrados en este trabajo. Posteriormente el archivo resultante con todas las 301 secuencias fue ingresado al programa Arlequin 3.1, para realizar la prueba de AMOVA y obtener el índice de fijación Fst, el valor de *p* de la prueba, el número de haplotipos, el número de sitios polimórficos y las frecuencias nucleotídicas y haplotípicas (Tabla 22).

El objetivo de este capítulo es determinar la relación de la ballenas grises de la Población Asiática con las ballenas grises que se congregan en las lagunas de la Península de Baja California, pero al contar con la totalidad de los datos, tanto para la Población Asiática, como para la Población Americana y del Grupo de Alimentación de la Costa del Pacífico, también se anexaron estos datos al análisis, para comprobar la veracidad de nuestros resultados al compararlos con datos ya publicados para estas poblaciones.

Tabla 22. Resumen de los haplotipos y frecuencias haplotípicas registradas por zona de congregación (Laguna Ojo de Liebre, Laguna San Ignacio y Bahía Magdalena) y por unidad de manejo (Grupo de Alimentación de la Costa del Pacífico (PCFG) y por población (Pacífico Noreste o Americana (PNE) y Pacífico Noroeste o Asiática (PNO).

| | LOL | LSI | BM | PNE | PNO | PCFG |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Número de secuencias | 85 | 97 | 119 | 103 | 142 | 71 |
| Sitios polimórficos | 37 | 34 | 36 | 35 | 37 | 35 |
| Haplotipos | 23 | 21 | 31 | 32 | 22 | 23 |
| Diversidad haplotípica (*h*) | 0.9342 ±0.0118 | 0.9240 ±0.0127 | 0.9477 ±.0074 | 0.9516 ±0.0083 | 0.7703 ±0.0274 | 0.9453 ±0.0099 |
| Diversidad nucleotídica ($\pi$) | 0.0165 ±0.0085 | 0.0165 ±0.0085 | 0.1677 ±0.0086 | 0.01413 ±0.0073 | 0.01824 ±0.0093 | 0.01515 ±0.0079 |

Al conjuntar los haplotipos y sus frecuencias para las tres lagunas de la Península de Baja California y compararlos como una sola unidad contra la Población Asiática, encontramos que en total se registraron 40 haplotipos entre la Población Asiática (22 haplotipos) y las lagunas de la Península de Baja California (35 haplotipos). Del total de haplotipos registrados, cinco haplotipos sólo estuvieron presentes en las muestras de la Población Asiática (dos de ellos específicos para esta población), 18 solo se registraron en las muestras provenientes de México y 17 en ambos grupos (Figura 19).

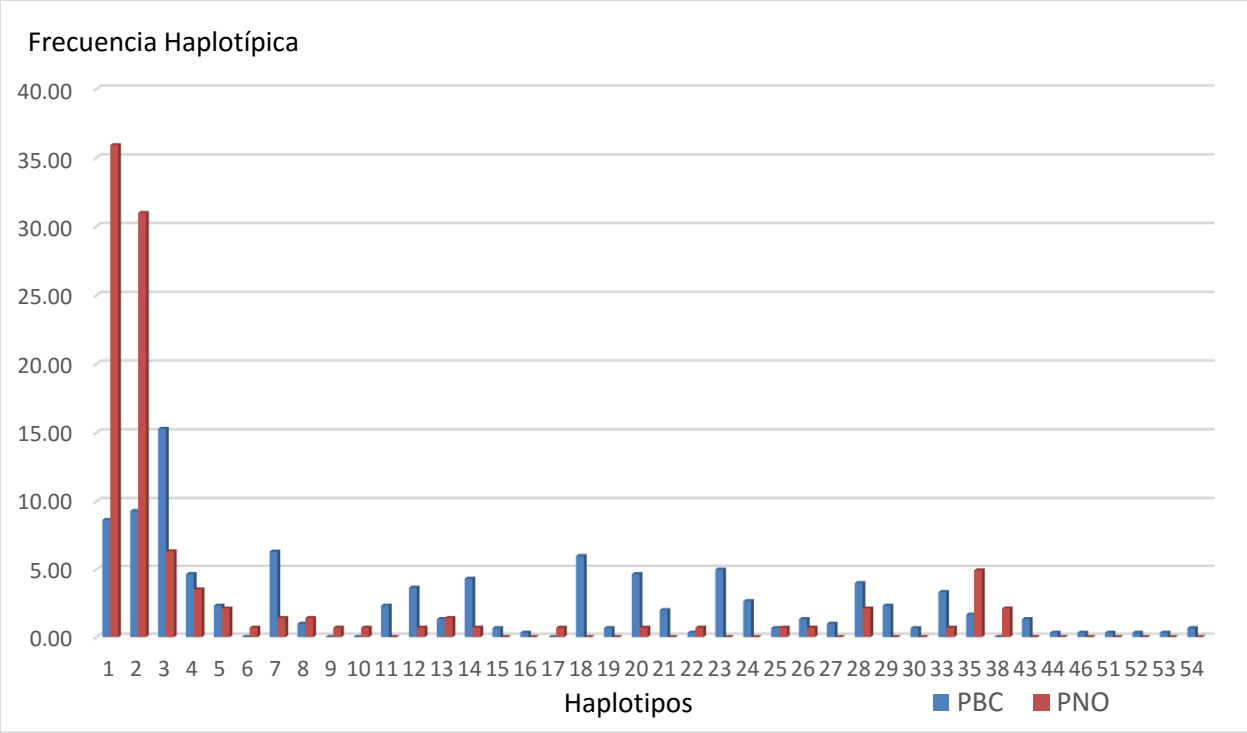



Figura 19. Gráfica de frecuencias haplotípicas de las lagunas mexicanas (azul) y de la Población Asiática (rojo).

Para tener una idea visual de la relación de los haplotipos con su frecuencia, se realizó una red “Median Joining Networks” (Figura 20), Aquí se puede observar claramente como los primeros tres predominan en la Población Asiática, disminuyendo su diversidad haplotípica.

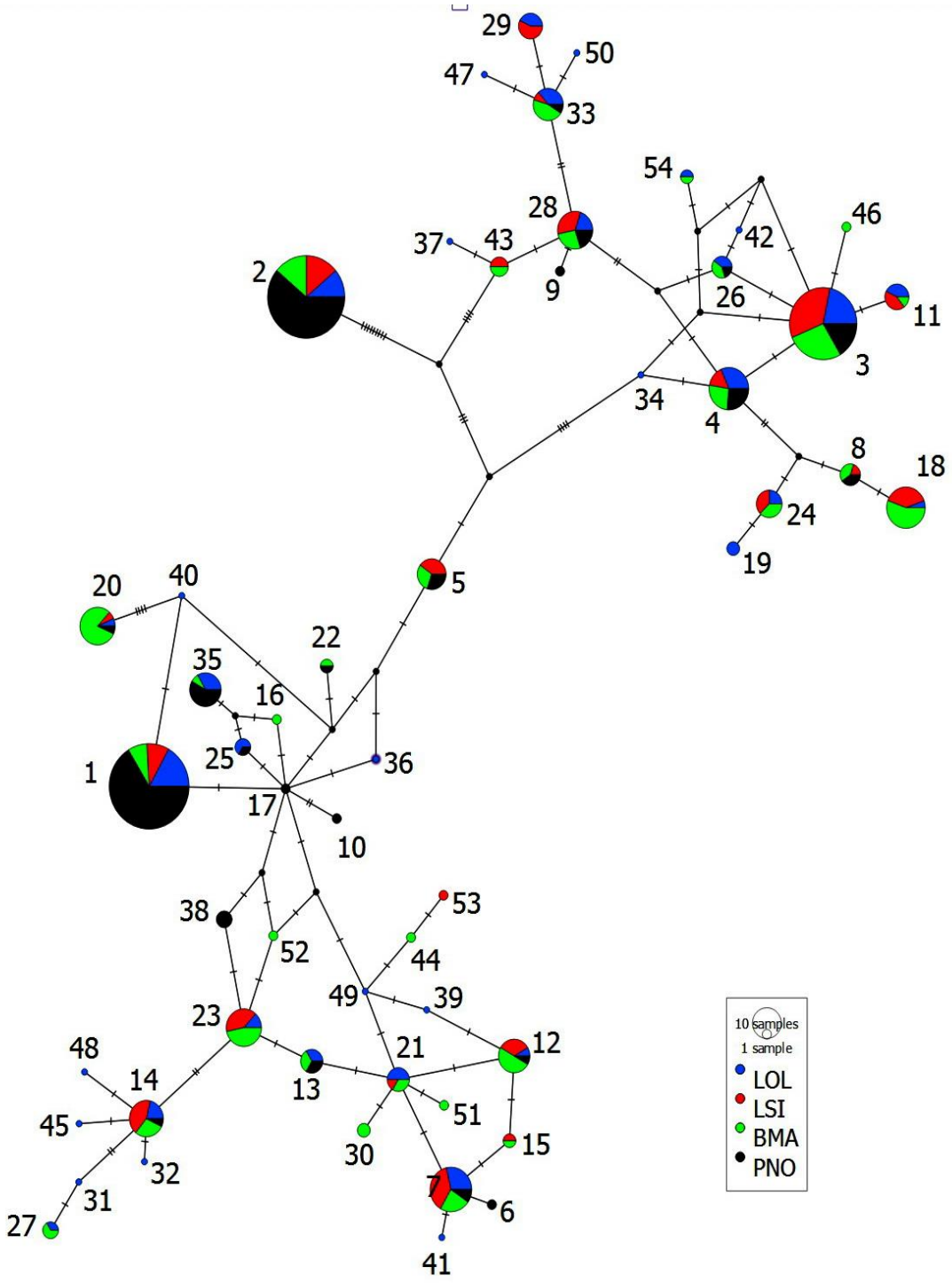



Figura 20. Red “Median Joining Networks” de los haplotipos presentes en las ballenas grises de la Península de Baja California.

En cuanto a los resultados del Analisis de varianza para datos moleculares (AMOVA) utilizando el modelo de distancia molecular de Tamura / Nei (10,000 permutaciones); el índice Fst y la prueba de diferenciación entre pares de muestras, mediante el programa Arlequin 3.1, los resultados son los siguientes:

Tabla 23. Resultados del análisis de AMOVA, donde se muestran los valores de Fst y *p*. para todas las congregaciones de ambas poblaciones de ballena gris

**ANALISIS AMOVA**

==========

| Fuente de variación | g.l. | Suma de cuadrados | Varianza de los componentes | Porcentaje de la variación |
|---|---|---|---|---|
| Entre poblaciones | 5 | 11.472 | 0.01811 Va | 3.86 |
| Dentro de las poblaciones | 611 | 275.423 | 0.45077 Vb | 96.14 |
| Total | 616 | 286.895 | 0.46888 | |

Índice de Fijación **Fst : 0.03862**

Índices de fijación específicos por población

| Pob# | Nombre | Fst |
|---|---|---|
| 1 | PNE | 0.03809 |
| 2 | PCFG | 0.03820 |
| 3 | PNO | 0.03997 |
| 4 | LOL | 0.03830 |
| 5 | LSI | 0.03839 |
| 6 | BM | 0.03812 |

Va y Fst : P(valor aleatorio > valor obs.) = 0.00000
P(valor aleatorio = valor obs) = 0.00000
Valor de P **= 0.00000+-0.00000**

De acuerdo a los valores obtenidos de la AMOVA: Fst= 0.03862 y *p*=0.0000 < α=0.05, entonces se concluye que existen diferencias significativas entre zonas y para determinar cuál o cuáles zonas presentan diferencias en las frecuencias haplotípicas, se realizó una prueba de comparaciones pareadas.

Tabla 24. Resultados de las comparaciones entre los diferentes pares de congregaciones, donde se muestras los diferentes valores de Fst y *p.*

**Comparaciones pareadas**

==========

| Número | Nombre de la población |
|---|---|
| 1: | PNE |
| 2: | PCFG |
| 3: | PNO |
| 4: | LOL |
| 5: | LSI |
| 6: | BM |

---

Valores de Fst de las poblaciones

---

Computo convencional del estadístico F de las frecuencias haplotípicas

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.00000 | | | | | |
| 2 | 0.01193 | 0.00000 | | | | |
| 3 | 0.08644 | 0.08855 | 0.00000 | | | |
| 4 | -0.00028 | 0.01235 | 0.05370 | 0.00000 | | |
| 5 | 0.00544 | 0.02556 | 0.08530 | 0.00376 | 0.00000 | |
| 6 | 0.00109 | 0.01695 | 0.08887 | 0.00864 | 0.00260 | 0.00000 |

---

valores de P para Fst (con 10100 permutaciones)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | * | | | | |
| 2 | 0.00574+-0.0007 | * | | | |
| 3 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | * | | |
| 4 | 0.46461+-0.0045 | 0.01040+-0.0010 | 0.00000+-0.0000 | * | |
| 5 | 0.06564+-0.0026 | 0.00000+-0.0000 | 0.00000+-0.0000 | 0.15652+-0.0040 | * |
| 6 | 0.30185+-0.0041 | 0.00010+-0.0001 | 0.00000+-0.0000 | 0.01891+-0.0014 | 0.19780+-0.0038 |

Matriz de significancia para los valores de P de los Fst
Valor de significancia de =0.05 (con 10100 permutaciones)

---

| | PNE | PCFG | PNO | LOL | LSI | BM |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PNE | | + | + | - | - | - |
| PCFG | + | | + | + | + | + |
| PNO | + | + | | + | + | + |
| LOL | - | + | + | | - | + |
| LSI | - | + | + | - | | - |
| BM | - | + | + | + | - | |

## DISCUSIÓN

En cuanto a la diversidad haplotípica de la Población Asiática, aunque entre el trabajo de Le Duc *et al*., (2002) y el de Lang *et al*., (2010) hubo una gran diferencia en el número de haplotipos (10 y 22 respectivamente), debido a la diferencia entre el número de muestras analizadas (45 y 142), existen 11 haplotipos presentes solo en machos, por lo que de no encontrarse nuevamente estos haplotipos en más ballenas de esa población, esta diversidad se volvería a reducir en tan solo una generación. De los tres haplotipos (6, 9 y 10) registrados únicamente para la Población Asiática, ninguno fue registrado en las lagunas de la Península de Baja California a pesar de haber sido identificados 21 individuos de la Población Asiática en aguas Mexicanas, además de haber extraído al menos una muestra de un individuo de aquella población. En cuanto a los haplotipos registrados únicamente en México, se obtuvieron 6; uno se encuentra presente en la Población Americana, otro se comparte con el PCFG y los cuatro restantes son los haplotipos únicos (nuevos), sin embargo como ya se mencionó en los resultados, aún no se vuelven a secuenciar tres de ellos, utilizando ambos primers para verificar su autenticidad.

Pese al incremento registrado en el número de haplotipos de la Población Asiática (Lang *et al*., (2010), su frecuencia haplotipica no cambió, ya que siguen predominando dos haplotipos “1 y 2” y juntos están presentes en casi el 70% del total de las muestras. En el caso de México el haplotipo predominante es el “3”, con el 15.28%, seguido del “1” y el “2” con 8.64% y 9.3% respectivamente.

Los valores obtenidos para las frecuencias haplotípicas de la laguna San Ignacio (0.924) y la laguna Ojo de Liebre (0.934) son ligeramente más bajos que los obtenidos

para toda la Población Americana (0.952) y que para el PCFG (0.945) (Lang *et al*, 2014), esto se debe tanto al menor número de haplotipos registrados para estas dos lagunas, como a una ligera predominancia de tres haplotipos (1, 2,y 3) con respecto a los demás, sin embargo esta predominancia no es tan marcada como la observada en la Población del Pacifico Noroeste donde dos de los haplotipos predominan en casi el 40% de las muestras, lo que se ve reflejado en su baja frecuencia haplotípica (0.770) (Lang *et al*., 2011).

Al analizar la diversidad nucleotídica, encontramos que ésta es similar entre las tres congregaciones (0.0165) en la Laguna Ojo de Liebre y Laguna San Ignacio y (0.167) para la Bahía Magdalena, sin embargo son ligeramente mayores que la reportada para la Población Americana(0.0141), pero inferiores que la reportada para la Población Asiática (0.0182).

De acuerdo a los valores obtenidos de la AMOVA (Fst= 0.03862 y $p$=0.0000 < α=0.05), se concluye que el valor de la prueba es significativo y que existen diferencias entre las zonas de congregación invernal y la Población Asiática, además de la separaciones de poblaciones previamente registradas por Le Duc *et al*., (2003); Lang et al., (2010); (2011) y Frasier et al., (2010). Pero es importante aclarar que en este caso, el 96.14% de las diferencias se debe a las diferencias dentro de las poblaciones y solo el 3.86 es debido a las diferencias entre poblaciones.

En cuanto a los valores de Fst de las comparaciones pareadas y sus respectivos valores de $p$, encontramos que los resultados correspondientes a la comparación entre el Pacífico Noroeste (Población Asiática), el Pacífico Noreste (Población Americana) confirman lo anteriormente descrito por Le Duc *et al*., (2002) y Lang *et al*., (2010), quienes determinaron que existe una separación genética entre las dos poblaciones del Pacifico Norte. Mientras que los resultados de la comparación entre el Pacifico Noreste y el Grupo de Alimentación de la Costa del Pacífico, confirman lo descrito por Frasier *et al*., (2011) y Lang *et al*., (2011), quienes definieron al PCFG como un Stock o unidad de manejo independiente al resto de la Población Americana, que se alimenta más al

norte de las islas Aleutianas. En cuanto a los resultados de nuestras muestras, se confirma lo encontrado en el capítulo III de este trabajo con respecto a la existencia de subestructura entre las lagunas, además de que no existen diferencias significativas con el resto de la Población Americana que se alimenta más al norte de las islas Aleutianas, pero si hay diferencias significativas con el Grupo de Alimentación de la Costa del Pacífico. Así como que existen diferencias en las frecuencias haplotípicas de las ballenas de cada una de las zonas de congregación invernal (LOL, LSI y BM), con respecto a la Población Asiática. Esto último está determinado al igual que en el caso de la Población Americana, por la predominancia de un par de haplotipos en casi el 40% de las muestras de la Población Asiática (Lang *et al*, 2010), mientras que las frecuencias haplotípicas de las lagunas de la Península de Baja California tienen unas frecuencias haplotípicas (0.92 a 0.94) más parecidas a la de la Población Americana (0.95), a la cual pertenecen.

## CONCLUSIONES

Los haplotipos predominantes en las lagunas de la Península de Baja california son el 3, el 1 y el 2 con el 15.2, 8.6 y 9.3 % del total de las muestras respectivamente. Por otra parte se concluye que hay diferencias significativas entre las frecuencias haplotípicas de las lagunas de la Península de Baja California con respecto a la Población Asiática y al grupo de alimentación de la costa del Pacífico y así mismo se conforma que existen diferencias entre la Laguna Ojo de Liebre y la Bahía Magdalena. Las diferencias encontradas corresponden al 96%, debido a la diferencia dentro de los grupos y casi del 4% debido a las diferencias entre grupos.

REFERENCIAS

Bandelt, H., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16(1), 37–48.

Excoffier, L., Smouse, P.E. y Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.

Frasier, R. T., Koroscil, M.S., White, N. B. and J. D. Darling. 2011. Assessment of population substructure in relation to summer feeding ground use in the eastern North Pacific gray whale. Endagerer Species Research Vol 14: 39-48.

IWC, 2013. Report of the Scientific Committee, Annex F: Report of the Sub-Committee on Bowhead, Right and Gray Whales, International Whaling Commission, Jeju Island, Republic of Korea, 2013.

Kato, H. y T. Kasuya. 2002. Some analyses of the modern whaling catch history of the western North Pacific stock of gray whales (*Eschrichtius robustus*), with special reference to the Ulsan whaling ground. J. Cetacean Res. Manage. 4:277–282.

Lang, A.R., Weller, D.W., LeDuc, R., Burdin, A.M., Pease, V.L., Litovka, D., Burkanov, V. y Brownell, Jr. R.L. 2010. Genetic analysis of stock structure and movements of gray whales in the eastern and western North Pacific. Rep CBI. SC/63/BRG 10.

Lang, A.R., Taylor, B.L., Calambokidis, J.C., Pease, V.L., Klimek, A., Scordino, J., Robertson, K.M., Litovka, D., Burkanov, V., Gearin, P., George, J.C. y Mate, B. 2011. Assessment of stock structure among gray whales utilizing feeding grounds in the eastern North Pacific. Paper SC/M11/AWMP4 presented to the IWC Scientific Committee, 22 pp.

Lang, A.R., Calambokidis, Scordino, J., Klimek, A., Burkanov, V., Gearin, P., Litovka, D., Robertson, K.M., Mate, B., Jackobsen J.K., and Taylor, B.L. 2014. Assessment of genetic structure among eastern North Pacific gray whales on their feeding grounds. Marine Mammals Science

Le duc, R.G., Weller, D.W., Hyde, J., Burdin, A.M., Rosel, P.E., Brownell, R.L., Würsing, B. y Dizon, A.E., 2002. Genetic differences between western and Eastern gray whales (*Eschrichtius robustus*). J. Cetacean Res. Manage. 4(1): 1-5

Nei, M. (ed). 1987. Molecular evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. 12 pp.

Nielsen, R. y Wakeley, J. 2001. Distinguishing migration from isolation: a Markov Chain Monte Carlo Approach. Genetics. 158: 885-896.

Schneider, S., Roessli, D. y Excoffier L. 2000. Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva.

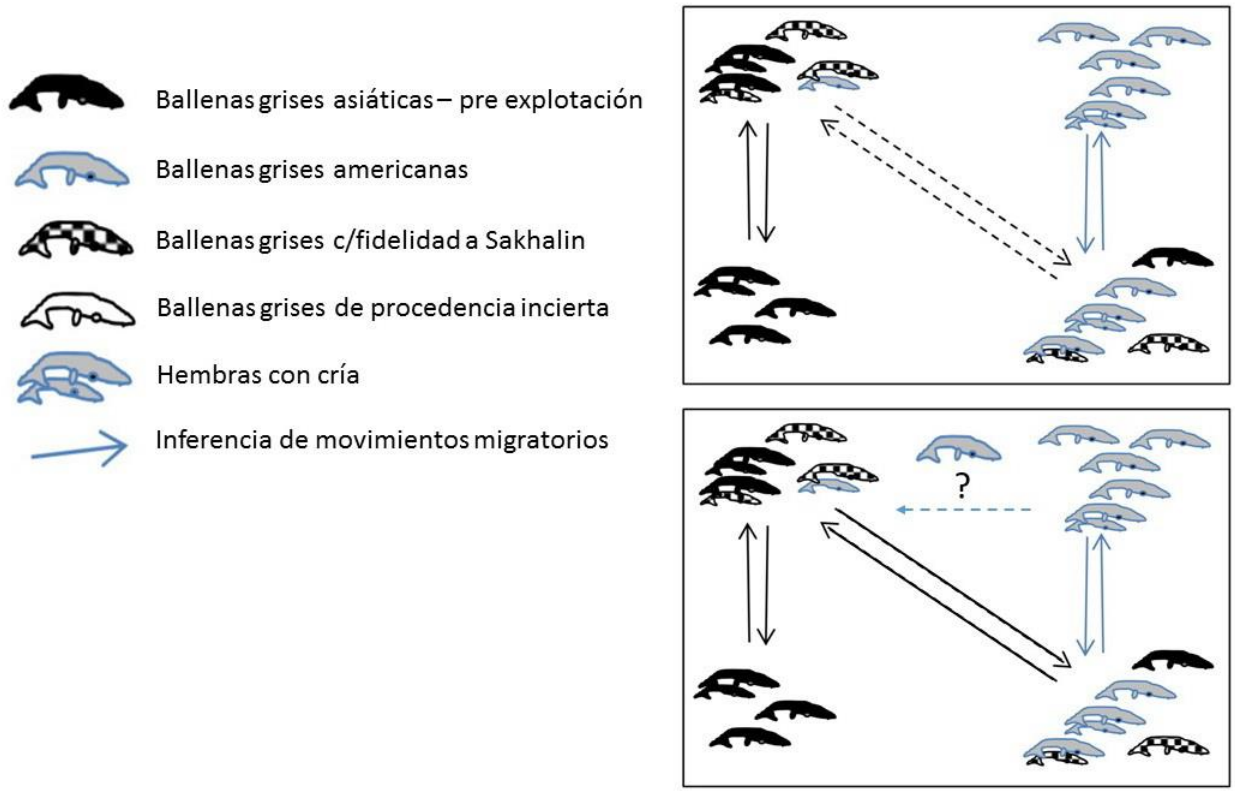
Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123:585–595.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. and Evol. 30: 2725–2729.

# CAPITULO VI. ARGUMENTOS FINALES

Los resultados obtenidos mediante las frecuencias haplotípicas de la región control del ADNm de este trabajo, muestran una subestructura en las zonas de reproducción de la Península de Baja California, esta subdivisión es de las ballenas de la Laguna Ojo de Liebre por un lado y las ballenas de la Laguna San Ignacio y la Bahía Magdalena por otro lado, así mismo esta subestructura también se observó en los resultados obtenidos mediante la foto-identificación; ya que el índice de intercambio es muy diferente entre congregaciones, observándose movimientos del 66% del total de las hembras de Bahía Magdalena hacia la Laguna San Ignacio; la pruebas de Ji-cuadrada mostraron diferencias significativas entre el movimiento de la laguna San Ignacio y Laguna Ojo de Liebre contra la Laguna San Ignacio y la Bahía Magdalena y de la Bahía Magdalena y la Laguna San Ignacio con respecto a la Bahía Magdalena y la Laguna Ojo de Liebre . Sin embargo los valores de las fuentes de variación muestran que estas diferencias genéticas se deben casi en su totalidad a las variaciones internas en cada congregación, más que a las variaciones entre poblaciones.

En cuanto a la relación de las ballenas grises de la Población Asiática con las ballenas de la Población Americana y en particular con las ballenas grises que se congregan en las laguna de la Península de Baja california, se revisó y evaluó cada una de las siete hipótesis propuestas hechas por el subcomité de Ballena gris de la IWC (2013) y se elogió la hipótesis número 4 a la cual se le agregaron un par de elementos.




La hipotesis fue la siguiente: [SC/65a/BRG16 Hypothesis 4] La zona de alimentación de Sakhalin es utilizada por ballenas que muestran fidelidad matrilineal a las zonas de alimentación. Estas ballenas incluyen a las verdaderas ballenas grises de la Población Asiática (antes de la explotación comercial), que migran hacia las zonas de reproducción tanto en el Pacífico noroeste como el noreste con cierta cruza con las ballenas de la Población Americana así como de la Asiática.

De acuerdo, a los resultados de diversos autores y los encontrados en este trabajo, podemos describir esta hipótesis. Iniciando con las zonas de reproducción de la Población Asiática en sus zonas históricas, si bien sabemos que son escasos los registros en los últimos años, Kato y colaboradores (2013) han obtenido ocho registros de diez individuos durante este siglo, lo que confirma que aun realizan la migración hacia el mar de China y sus alrededores.

Por otra parte este trabajo ha mostrado el movimiento de al menos una parte de la Población Asiática hacia las zonas de reproducción de la Población Americana y si

sumamos esto a lo obtenido por Lang *et al*., (2014), quienes mediante al análisis de microsatélites sólo le pudieron asignar la paternidad a entre el 46 a 53% de las ballenas de la Población Asiática, por lo que la probabilidad de que el otro progenitor provenga de la Población Americana es alta.

Finalmente el último punto que falta cubrir es si existe un reclutamiento de individuos adultos hacia la Población Asiática, sin embargo esto es difícil de determinar, porque a pesar de registrar movimiento de animales, no existe alguna característica distintiva de cada población para poder determinar el origen de cada ballena. Además de esto, el incremento del número de hembras maduras ha sido muy bajo, lo que podría sugerir que no existe tanto reclutamiento de ballenas provenientes de la Población Americana.