

**LARGE PELAGIC FISHES IN THE CARIBBEAN SEA AND GULF OF MEXICO
OTHER SYMPOSIUM PRESENTATIONS AND ABSTRACTS**

Variabilidad genética del tiburón ballena (*Rhincodon typus*) en dos poblaciones aisladas: Caribe (Isla Holbox) y Golfo de California

DENÍ RAMÍREZ-MACÍAS¹, RICARDO VÁZQUEZ-JUÁREZ¹, FELIPE GALVÁN-MAGAÑA²,
RAFAEL DE LA PARRA³.

¹Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S. 23090, México.

²Departamento de Pesquerías, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Av. Instituto Politécnico Nacional s/n Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S. 23096, México.

³Proyecto Dominó (Tiburón Ballena del Atlántico Mexicano), Av. Xel-ha 1 – 311, SM 28, Cancún, Quintana Roo 77500, México.

ABSTRACT

El tiburón ballena (*Rhincodon typus*) presenta una distribución epipelágica circumtropical. Presentan un ciclo de vida con estrategia K, haciéndolos vulnerables a una mala explotación; como es el tener tallas grandes, lento crecimiento, maduración tardía, longevos y probablemente poblaciones pequeñas. Es un organismo altamente migratorio, por lo que el uso sustentable de esta especie amenazada depende de colaboraciones internacionales. El conocimiento sobre su biología, ecología, y desarrollo es limitado, no permitiendo la implementación de una protección adecuada para su conservación. En el 2000 fue declarado como especie vulnerable en la lista roja de la IUCN y en México fue incluido en su lista roja en el 2001, debido a que las poblaciones han disminuido en los últimos años lo cual puede traer consecuencias negativas en sus poblaciones. Para un adecuado manejo de la especie, es necesario establecer unidades de manejo, lo cual puede abordarse mediante el análisis de variación inter e intra poblacional. La cuantificación de las variaciones inter e intra específicas de las secuencias del ADNm es una buena herramienta para examinar aspectos sobre la estructura genética poblacional, flujo genético, movimientos migratorios, dentro y entre poblaciones de tiburones. En colaboración con la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (Área de Protección de Flora y Fauna Yum Balam y Parque Nacional Isla Contoy) se realizó un proyecto sobre genética poblacional del tiburón ballena. El fragmento altamente polimórfico de la región control del ADNm de tiburones ballena fue amplificado y secuenciado para caracterizar la variabilidad genética entre las poblaciones del Golfo de California (n=65) y de Isla Holbox en el Caribe (n=58). Encontramos mayores niveles de variación en el Golfo de California con 23 haplotipos ($h=0.92$, $\pi=0.01$) que en Isla Holbox con 15 haplotipos ($h=0.78$, $\pi=0.01$). El AMOVA reveló una diferencia geográfica significativa entre las dos cuencas oceánicas indicando que las poblaciones de tiburones ballena están estructuradas en una escala geográfica.

KEY WORDS: Whale shark; control region; genetic structure.

Genetic Variability of the Shark Whale (*Rhincodon typus*) in Two Isolated Populations: The Caribbean (Holbox Island) and Gulf of California

The shark whale (*Rhincodon typus*) presents/displays a circumtropical epipelágica distribution. They present/display a service life with strategy K, doing them vulnerable to a bad operation; as he is to have great statures, slow growth, delayed maturation, longevos and probably small populations. It is a highly migratory organism, reason why the sustainable use of this threatened species depends on international collaborations. The knowledge on its Biology, ecology, and development is limited, not allowing the implementation of a protection adapted for its conservation. In the 2000 it was declared as vulnerable species in the red list of the IUCN and in Mexico were including in its red list in the 2001, because the populations have diminished years in the last which can bring negative consequences in its populations. For an adapted handling of the species, it is necessary to establish handling units, which can approach by means of the analysis of population Inter variation and intra. The quantification of the Inter variations and intra you specify of the sequences of the ADNm is a good tool to examine aspects on the population genetic structure, genetic flow, migratory movements, inside and between populations of sharks. In collaboration with the National Commission of Protected Natural Areas (Area of Protection of Flora and Fauna Yum Balam and National Park Contoy Island) a project was made on population genetics of the shark whale. The highly polimórfico fragment of the region control of the ADNm of sharks whale was amplified and secuenciado to characterize the genetic variability between the populations of the Gulf of California (n=65) and Holbox Island in the Caribbean (n=58). We found greater levels variation in the Gulf of California with 23 haplotipos ($h=0.92$, $\pi=0.01$) that in Holbox Island with 15 haplotipos ($h=0.78$, $\pi=0.01$). The AMOVA revealed significant a geographic difference between the two ocean basins indicating that the populations of sharks whale are structured in a geographic scale.

PALABRAS CLAVES: tiburón ballena, región control, estructura genética.

INTRODUCCIÓN

El tiburón ballena *Rhincodon typus* es una especie de distribución epipelágica pantropical, de aguas costeras y oceánicas (Compagno 1984, Wolfson 1986). Constituye un recurso pesquero en India, Pakistán e Indonesia. Asimismo se utiliza como indicador de cardúmenes de atún y es un recurso ecoturístico en distintas partes del mundo como Australia, Filipinas, México y Centro América. Es una especie altamente migratoria por lo que la conservación de esta especie depende de un adecuado manejo internacional (Norman 2004). Es poco el conocimiento que se tiene sobre su biología, sin embargo presenta características biológicas que lo hacen vulnerable a una mala explotación como el tener un lento crecimiento, talla de madurez sexual tardía, el ser longevos y probablemente poblaciones pequeñas (Colman 1997, CITES 2002).

Lo anterior provocó que la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) declarara recientemente al tiburón ballena como especie vulnerable (Norman 2000). En México, esta especie fue declarada como amenazada a partir de marzo de 2002 (DOF 2002). Ambas categorías se les da a aquellas especies, o poblaciones de las mismas, que podrían llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo, si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad, al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir directamente el tamaño de sus poblaciones.

Estudios recientes han mostrado la utilidad de las técnicas moleculares en la biología de la conservación (Primark 2002). Las técnicas moleculares permiten identificar individuos de especies amenazadas, la falta de diversidad genética y el declive subsecuente de diferentes especies, analizar la viabilidad poblacional con base a su variabilidad genética, o determinar parentescos, grado de hibridación e introgresión, patrones de distribución, flujo genético y establecer así unidades evolutivas significativas de conservación de acuerdo con la estructura genética y geográfica de las poblaciones (Waples 1995, Smith y Wayne 1996, Haig 1998).

El tiburón ballena se agrega estacionalmente en diferentes localidades a lo largo del Golfo de California, algunas de ellas son: Bahía de La Paz (BLP), Bahía de Los Ángeles (BLA) y Banco Gorda (BG). Por su parte, en el Caribe Mexicano se agrega estacionalmente cerca de Isla Contoy y Holbox, siendo en este lugar una de las mayores agregaciones a nivel internacional (Hueter et al. 2005). Sin embargo, es escaso el conocimiento que se tiene sobre los patrones de migración y estructura genética poblacional. Mediante marcas satelitales se ha detectado el amplio rango de movimiento que presentan estos organismos, por ello se ha planteado que no existen diferencias genéticas interoceánicas (Eckert y Stewart 2001). Sin embargo, estudios con marcas y con foto identificación llevados a cabo en

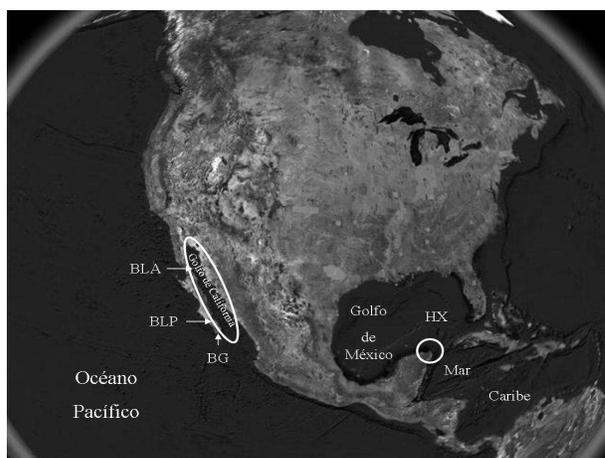


Figura 1. Área de estudio: Golfo de California y sus localidades, donde BLA = Bahía de los Ángeles, BLP Bahía de La Paz y BG= Banco Gorda. HX=Holbox.

diferentes regiones del Mundo como Australia, Belice (Norman 2004) y Golfo de California Ramírez-Macías et al. (in press) han mostrado que año a año regresan los mismos organismos al área. Con base en ello, nos planteamos la hipótesis de que existe un sistema metapoblacional, conformado por diferentes poblaciones de tiburones ballena, lo cual puede abordarse mediante el empleo de marcadores moleculares ya que son una poderosa herramienta en la determinación de la estructura poblacional. En colaboración con la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (Área de Protección de Flora y Fauna Yum Balam y Parque Nacional Isla Contoy) se realizó un proyecto sobre genética poblacional del tiburón ballena, mediante la cuantificación de las variaciones inter e intra específicas de las secuencias de la región control del ADNm, ya que estudios realizados en tiburones han mostrado que este marcador es una buena herramienta para examinar aspectos sobre la estructura genética poblacional, flujo genético, movimientos migratorios, dentro y entre poblaciones de tiburón ballena (Ramírez-Macías et al. in press) y otros tiburones (Heist et al. 1996, Keeney et al. 2003).

OBJETIVO

Determinar el grado de aislamiento genético entre las dos poblaciones o subpoblaciones de Tiburón Ballena en aguas Mexicanas: Caribe y Golfo de California.

MÉTODOS

Se tomaron biopsias de tiburones ballena siguiendo la metodología planteada por Ramírez-Macías et al. (in press), el tejido se preservó en alcohol y se congeló hasta su análisis. En el Golfo de California se realizaron muestreos en los 3 sitios mas importantes de agregación de tiburón ballena. En la Bahía de La Paz (BLP) se realizaron salidas

de campo en los meses de septiembre-diciembre a partir del 2001 al 2005. Banco Gorda (BG) se visitó en junio de 2003 y Bahía de Los Ángeles (BLA), por su parte, se visitó en octubre de 2003 y de 2004. Por su parte Holbox fue visitado en agosto del 2005 (Fig. 1)

El trabajo de laboratorio se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas el Noroeste, el ADN total de las biopsias se extrajo y se amplificó el fragmento polimórfico de la región control del ADNmt de acuerdo a la metodología mencionada en Ramírez-Macias et al. (in press). El producto de PCR se secuenció en ambas direcciones utilizando los primers específicos (Ramírez-Macias et al. in press) en un secuenciador automático AB1377.

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

La diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (π) se calcularon de acuerdo con la fórmula de Nei (1987), mediante el programa computacional Arlequín 2.0 (Schneider et al. 2000), utilizando distancias gamma y el modelo de Tamura-Nei.

Se realizó un análisis de variancia molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés) (Excoffier et al. 1992) mediante el programa computacional Arlequín 2.0 (Schneider et al. 2000), para examinar en mayor detalle la concordancia entre las distancias genéticas y las diferentes regiones geográficas. En este análisis, los individuos son asignados a poblaciones y las poblaciones son anidadas en grupos basados en un criterio no genético; en este caso, la localización geográfica de la muestra. Para el presente estudio se asignaron dos grupos: el Golfo de California con tres poblaciones (BLA, BLP y BG) y Holbox.

Con la finalidad de ilustrar las interrelaciones entre los haplotipos, se realizó una red MJ (Median-Joining network) informática con todos los haplotipos encontrados, mediante el programa computacional network 4.1 (Bandelt et al. 1999).

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

RESULTADOS

Se analizaron 123 secuencias del fragmento más poli-

Tabla 2. Resultados de la AMOVA

Fuente de variación	Varianza	% Total
Entre grupos	0.045	9.36
Entre poblaciones dentro de grupos	0.009	2.05
Dentro de poblaciones	0.427	88.59
Índices de fijación:		
FSC :	0.02257	P = 0.11673
FST :	0.11405	P = 0.00000
FCT :	0.09360	P = 0.25158

mórfico de la región control del ADNmt de tiburones ballena del Caribe Mexicano ($n=58$) y del Golfo de California ($n=65$). De las secuencias analizadas, el tamaño del fragmento de la región control varió entre 600 pb y 711 pb. La composición nucleotídica del fragmento fue de 18.40% citosina, 41.44% timina, 32.57% adenina, 7.58% guanina. El análisis de secuencias reveló 221 sitios polimórficos conformados por 57 sustituciones (43 transiciones, 18 transversiones), y 171 indels (inserciones/delecciones), resultando en 35 haplotipos.

En el Golfo de California se encontraron 23 haplotipos distribuidos en 65 individuos, donde el 18% de los indivi-

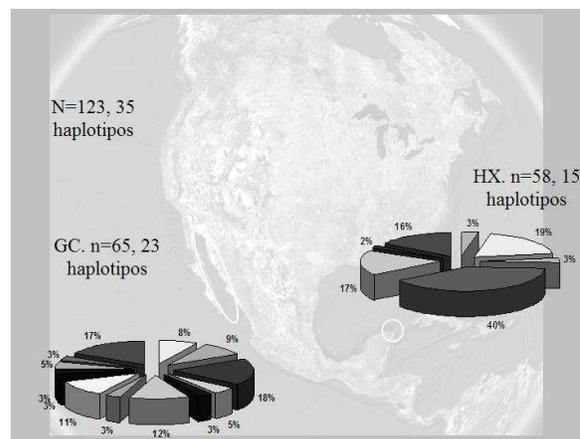


Figura 2. Frecuencia de haplotipos en las diferentes localidades. En el Golfo de California se encontraron 23 haplotipos ($N=65$), donde el 18% de los individuos presentaron el haplotipo más común de esta localidad. En Holbox se encontraron 15 haplotipos ($N=58$), el haplotipo más frecuente y único de esta localidad se presentó en el 41% de los individuos. Tres haplotipos se presentaron en ambas localidades: uno encontrado en Holbox en el 19% de los individuos estuvo presente en el Golfo de California en un 5% de los individuos. El segundo haplotipo compartido se presentó en el 17% de los individuos de Holbox y en un 12% de los individuos del Golfo de California. El tercer haplotipo compartido se presentó únicamente en un individuo, mientras que en el Golfo de California estuvo presente en un 18% de los individuos.

duos presentaron el haplotipo mas común, seguido por el 17% de individuos con haplotipos únicos (11 haplotipos), se presentaron 4 haplotipos frecuentes pero con menor porcentaje (12%, 11%, 9% y 8%) y dos haplotipos poco frecuentes (5%) y 4 haplotipos con 3%. En holbox se encontraron 15 haplotipos distribuidos en 58 individuos, el haplotipo más frecuente se presentó en el 41% de los individuos, seguido por dos haplotipos frecuentes uno encontrado en el 19% (haplotipo (rc-20)también encontrado en el Golfo de California en un 5% de los individuos) y otro con el 17% de los individuos (haplotipo (rc-13) también encontrado en el Golfo de California en un 12% de los individuos), el 17% presentaron haplotipos únicos 17% (10 haplotipos, uno de ellos (rc-6) presente en el Golfo de California en 18% de los individuos) y dos haplotipos poco frecuentes con el 3% (Fig. 2).

La diversidad haplotípica total encontrada en el Golfo de California fue mayor ($h=0.92$) a la encontrada en el Caribe Mexicano ($h=0.78$), con lo que se ve claramente que el Golfo de California es una población genéticamente mucho más heterogénea que Holbox (Tabla I).

En contraste, la diversidad nucleotídica fue baja en ambas localidades ($GC=0.01$, $CM=0.01$) debido a que las diferencias entre los haplotipos fueron en su mayoría por una sustitución (Tabla 1).

El AMOVA mostró que la mayor diversidad haplotípica se observó dentro de cada localidad (88.59%); sin embargo, la diversidad entre grupos fue alta (9.36%) y muy

Tabla 1. Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) por localidad, donde N es el número de individuos de cada localidad. Donde GC= Golfo de California, HX= Isla Holbox.

Localidad	N	No. hap.	π	h
GC	65	23	0.01	0.92
HX	58	15	0.01	0.78

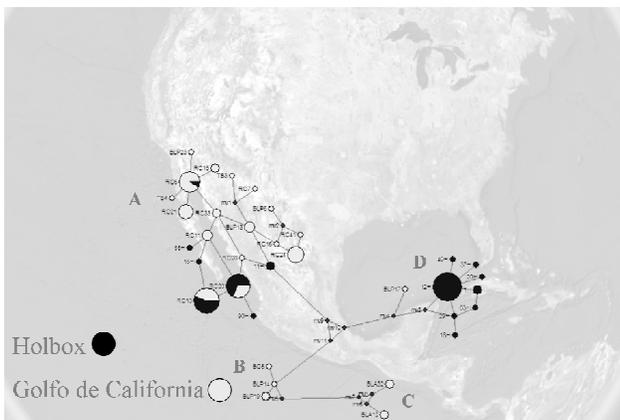


Figura 3. Red de informática con las secuencias completas de los 35 haplotipos. El tamaño de los nodos es proporcional a la frecuencia. El Golfo de California esta representado en gris mientras que Holbox en negro.

baja entre poblaciones (2.05%). El nivel estructura entre las dos regiones oceánicas dio un valor alto de $F_{ST}= 0.114$ ($p<0.05$) indicando que existe una estructura genética entre Holbox y Golfo de California, mostrando que son dos poblaciones diferentes (Tabla 2).

La red MJ agrupó a los haplotipos en cuatro diferentes grupos evidentes. El grupo A incluye los haplotipos mas frecuentes del Golfo de California el cual podría subdividirse por la gran variedad de haplotipos, sin embargo en su mayoría las diferencias se deben a una o dos sustituciones y a uno o dos indels. El grupo B de la red MJ está conformado por los haplotipos presentes en Holbox, donde se ve claramente que los haplotipos son muy similares entre ellos difiriendo en su mayoría por una sustitución, dentro de este grupo encontramos un haplotipo único encontrado en el Golfo de California (BLP17), el cual difiere del resto por dos indels y dos sustituciones. El grupo C y D están compuestos por haplotipos raros (B= rc12 y rc32, C= BLP14, BG5, BLP19) presentes en el Golfo de California pero muy diferentes del resto de haplotipos encontrados en esta localidad. Los nodos rojos de la red MJ sugieren que existen

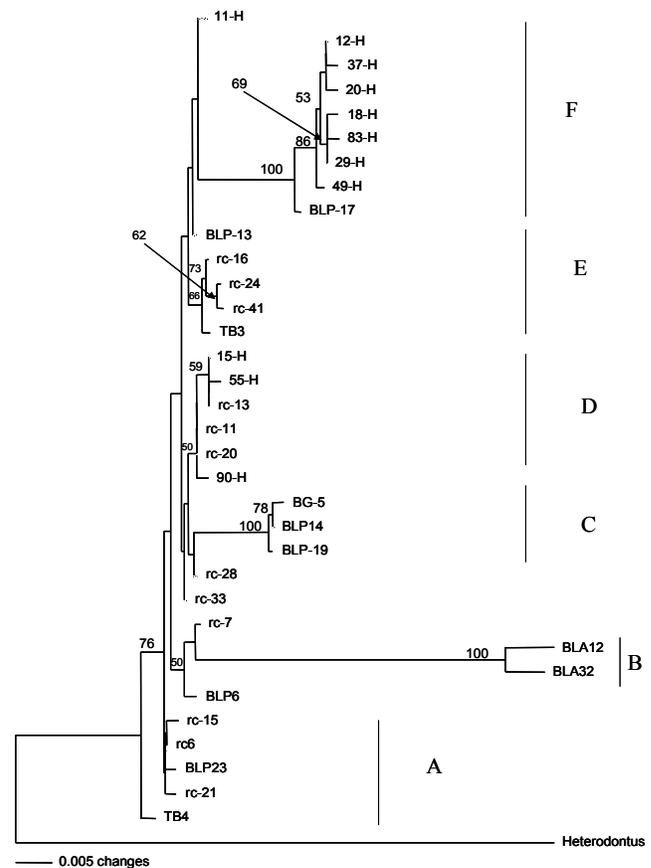


Figura 4. Árbol filogenético realizado con el algoritmo neighbor-joining con 1000 replicas. Los números de los nodos muestran los valores de bootstrap y las letras los clados.

haplotipos que no se han colectado, o bien pueden ser haplotipos extintos (Fig. 3).

El árbol filogenético (Fig. 4) generado por la aplicación del algoritmo neighbor-joining mostró 6 clados que representan diferentes linajes de haplotipos referidos como A, B, C, D, E y F los cuales están soportados por valores de bootstrap altos (más de 50%). En la base del árbol tenemos al clado A compuesto por los haplotipos TB4, RC15, RC6, BLP23 y RC21, el cual representa el linaje basal o ancestral, seguido por los clados B (BLA12 y BLA32), C (BG5, BLP19, BLP14), D (90H, RC20, RC11, RC1, 55H y 15H), E (TB3, RC41, RC24 y RC16), y F (BLP17, 49H, 29H, 83H, 18H, 20H, 37H y 12H), esto por la cercanía a la secuencia de *Heterodontus*. La distancia entre estos haplotipos, con respecto al grupo fuera fue la más alta de acuerdo con el alineamiento mediante bootstrap con el programa computacional MegAlign (DNASTar) el cual fue de 87.9. Se ve claramente como el clado B además de ser el más lejano representan un grupo monofilético. Podemos ver como los haplotipos 11H, BLP13, RC33, RC28, RC7 y BLP6 no están resueltos (Fig. 4). Los clados A, D y E corresponden al grupo A de la red MJ, mismos que corresponden a los haplotipos representantes del Golfo de California, al igual que la red MJ, los clados B y C corresponden a los haplotipos raros y muy diferentes del resto de haplotipos presentes en el Golfo de California, finalmente el clado F corresponde al grupo D de la red MJ que representa los haplotipos de Holbox.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo el análisis de varianza molecular fue utilizado para examinar una estructura genética poblacional del tiburón ballena entre dos localidades aisladas: Golfo de California y Caribe Mexicano. El análisis de AMOVA calcula los componentes de variancia genética y una serie de medidas de correlaciones haplotípicas referidas como F-estadística la cual puede utilizarse como inferir el grado de subdivisión poblacional con base en la significancia de la variancia observada mediante el método de permutaciones (Schneider et al. 2000). El análisis de haplotipos de la región control del ADN_m del tiburón ballena reveló que existe una diferenciación genética significativa entre el Golfo de California y Golfo de México-Caribe Mexicano.

Tanto el árbol filogenético como la red MJ mostraron claramente una división entre los linajes del Golfo de California y los linajes de Holbox, por ejemplo, el grupo D de la red MJ está conformado principalmente por haplotipos de Holbox y uno del Golfo de California, mismos haplotipos que conforman el clado F del árbol filogenético, de acuerdo con la topología del árbol y los valores de bootstrap indican que este linaje monofilético divergió del resto desde hace mucho tiempo debido a las grandes diferencias con el resto de haplotipos, dado que se encuentra representado en su mayoría por haplotipos de Holbox y del haplotipo más común en esta zona, este clado representa los haploti-

pos que conforman a los tiburones de Holbox.

En el área de Holbox encontramos haplotipos raros que se ven claramente tanto en la red MJ como en el árbol filogenético que son más cercanos a los haplotipos del Golfo de California que a los de Holbox, incluso en esta zona se encontraron 3 haplotipos del Golfo de California, de tal manera que en ni en la red MJ ni en análisis filogenético es evidente un aislamiento genético entre las dos cuencas oceánicas; sin embargo, existe una significativa diferenciación en las frecuencias de los haplotipos en las dos regiones indicando que existe una estructura poblacional a escala de las dos cuencas oceánicas. Sin embargo, la presencia de 7 haplotipos encontrados en Holbox pertenecientes al Golfo de California y 1 haplotipo presente en el Golfo de California más cercano a los haplotipos de Holbox sugiere que existe o existió flujo genético entre estas dos localidades aisladas pero a un nivel tan bajo que ha permitido que se estructuren las dos poblaciones, lo cual fue revelado con el AMOVA. Para poder conocer si existe flujo genético actualmente es necesario realizar en análisis con marcadores moleculares con una mayor tasa de mutación como los microsatélites, así como evaluar el número de hembras migrantes entre océanos por generación.

La red MJ muestra que la mayoría de las conexiones entre los haplotipos que conforman los grupos están dadas por una sola mutación lo cual sugiere que no hay haplotipos perdidos. Más de una mutación entre haplotipos puede indicar pérdida de haplotipos por deriva génica, seguida de una expansión o bien un tamaño de muestra insuficiente donde no están representados todos los haplotipos presentes. En el Golfo de California las agregaciones de tiburones ballena van de 4 a 30 tiburones en una temporada (Rodríguez et al. 2003, Ketchum), dependiendo de la localidad, en este trabajo se analizaron 65 secuencias de diferentes tiburones ballena, mientras que en Holbox las agregaciones van de 100-150 tiburones y analizamos un tamaño de muestra similar (58 secuencias) es poco probable que dicho problema haya sido debido al tamaño de muestra, debido a que la cantidad de haplotipos faltantes en Holbox fuera mayor a la del Golfo de California si se tratara de un tamaño de muestra insuficiente.

De acuerdo con la teoría de coalescencia (Posada y Crandall, 2001) el haplotipo más común representa el linaje mitocondrial más antiguo, porque han tenido más tiempo para acumular más copias, mientras que la mayoría de los nuevos haplotipos derivan de los haplotipos con altas frecuencias por lo que se espera que los haplotipos más antiguos presenten mayor cantidad de uniones, por tanto se esperaría que los haplotipos más frecuentes y con mayor número de reticulaciones fueran los ancestrales y los menos frecuentes y menos reticulados serían los haplotipos derivados (Excoffier y Smouse 1994). En el presente trabajo los haplotipos más frecuentes fueron el rc6, rc13, rc20 y 12H, el haplotipo que presentó la mayor cantidad de reticulaciones fue el 12H seguido por el rc6, rc20 y en menor cantidad por el rc13, de acuerdo con este supuesto pode-

mos descartar al haplotipo rc13. Otra característica que presentan los haplotipos más antiguos es que deben estar presentes en la mayoría de las zonas cuando la población se encuentra subdividida, en este caso la característica la cumplen los haplotipos rc6 y rc20 mientras que el haplotipo 12H fue único de Holbox. Los grupos externos también ayudan en la búsqueda de los haplotipos más antiguos, de acuerdo con el análisis de distancia entre los haplotipos mostró que los haplotipos cercanos al grupo fuera (*Heterodontus*) son el rc6, rc33 y TB4, con base en esta característica podemos decir que el haplotipo más ancestral es el rc6, esto puede corroborarse con la red MJ donde se ve como a partir de este haplotipo surgen el resto de haplotipos, a su vez, la posición basal del haplotipo RC6 en el clado ancestral A en el árbol N-J soporta fuertemente este punto de vista.

En el grupo B se ve claramente como una forma de estrella que radia del Haplotipo 12H y la mayoría de los haplotipos difieren por un solo evento de sustitución. Los valores bajos de la diversidad nucleotídica entre un número relativamente pequeño de sitios polimórficos y la forma de estrella de la red MJ, son consistentes con una expansión poblacional seguida de un evento fundador de pocos individuos (Tajima 1989, Aris-Brosou y Excoffier 1996), lo cual pudo haber ocurrido hace cientos o miles de años. Esto puede implicar que la población de tiburones ballena de Holbox fue fundada por un número pequeño de organismos (los cuales venían del haplotipo 12H) y que se expandió rápidamente. En este caso, varios sitios polimórficos pudieron surgir después de la expansión demográfica, la cual probablemente alcanzó tamaños poblacionales moderados, con lo que se explica la presencia de pocos haplotipos muy cercanos y por tanto una menor diversidad haplotípica a la encontrada en el Golfo de California, las ramas cortas del árbol en el clado F que conforman los haplotipos de Holbox y el valor de bootstrap soporta a su vez esta teoría.

De acuerdo con el análisis filogenético, Clado B y C conforman un linaje monofilético, las ramas largas del árbol indican que el linaje B divergió del resto hace mucho tiempo, debido a las grandes diferencias con el resto de haplotipos, ambos linajes al ser tan diferentes del resto, se puede interpretar como que provienen de otra región geográfica, lo cual puede explicarse debido a que se ha visto que los tiburones ballena son altamente migratorios (Eckert y Stewart, 2001, CITES 2002, Norman 2004).

Los valores bajos de la diversidad nucleotídica han sido observados en especies cosmopolitas y altamente migratorias como la ballena jorobada (Barker et al. 1993), esto dado a su gran movilidad que permite un alto intercambio genético. La misma situación pudiera presentarse en el tiburón ballena debido a que el tiburón ballena es altamente migratorio (Eckert y Stewart 2001, CITES 2002, Norman 2004). Mediante el uso de marcas satelitales se han observado migraciones excepcionalmente largas del tiburón ballena: 1) una migración de 12642 km desde el Golfo de California hasta el Pacífico Occidental, el cual es

el mayor movimiento jamás registrado por un tiburón ballena o cualquier vertebrado marino (Eckert y Stewart 2001), 2) un viaje de más de 2000 km hacia Asia (cerca de Christmas Island) desde la costa Noroccidental del oeste de Australia (Norman 2004), 3) otro de 550 km completado en algunas semanas de un tiburón marcado en Belice (Norman 2004), 4) una migración de 4567 km desde el mar de Mindanao en Filipinas hacia 280 km al sur de Vietnam realizado en dos meses (Eckert et al. 2002) y 5) dos tiburones ballena marcados en Seychelles migraron una distancia aproximada de 5000 km hacia Sri Lanka y Tailandia en un corto periodo de tiempo. Por su parte Ramírez_Macías et al. (in press) mediante foto identificación registraron una migración de aproximadamente 850 km en un mes de una tiburón ballena foto-identificado en Bahía de los Ángeles en el Golfo de California y un mes después recapturado en la Bahía de la Paz.

Estas largas migraciones son indicio que puede existir flujo genético entre las diferentes cuencas oceánicas, sin embargo, es necesario comparar muestras mediante el empleo de microsatélites del Océano Indico, así como de diferentes partes de cada cuenca oceánica para poder conocer si existe una estructura a escala global.

CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra que existe gran variabilidad en la región control del ADNm en los tiburones ballena del Golfo de California y de Isla Holbox.

El AMOVA mostró que existen una diferencia geográfica significativa entre las dos cuencas oceánicas indicando que las poblaciones de tiburones ballena están estructuradas en una escala geográfica.

Puede existir flujo genético entre las dos localidades.

El estudio filogeográfico mostró que el linaje ancestral es del Golfo de California y que en Isla Holbox hubo una expansión poblacional después de un evento fundador.

Debido a que la naturaleza migratoria de los tiburones ballena es crucial una colaboración internacional para conocer más sobre la biología así como patrones de migración. Esta información permitirá en un manejo sustentable y la conservación de la especie.

Es necesario la obtención de muestras de otras partes del mundo así como el estudio genético mediante un marcador genómico para determinar la estructura genética global del tiburón ballena.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a toda persona que apoyo para la realización del presente trabajo. La gente que nos ayudó en el trabajo de campo del Golfo de California: Ana Hacohe, Mauricio Hoyos, James Ketchum, Felipe Morales, Abraham Vázquez, Paul Ahuja (Manta México), Roberto Enriquez, Lucina Iñiguez, Nezahualpilli Tovar, Mario Salinas, Francisco J. Vergara, Yoel Goldchein, Florencia Cerutti, Flavio Zepeda, Ciro Calderón, Gabriel Aguirre, Romeo Saldivar, Lilia Gama, Liza Gómez, Mario Jaime, Ciro Aris-

ta, Enrique Calvillo, Sr. Calvillo, Nicolás Quiñónez, Jaime Arista. En Holbox: Francisco Remolina, Montserrat Trigo, Jaime Cano, Enrique Rodríguez, José Antele, Gilberto Quintal. En el trabajo de laboratorio agradecemos a: Hever Latisnere, Dariel Tovar, Clarisa Galindo.

El presente trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero del Fondo Sectorial de Investigación Ambiental. (clave del proyecto FOSEMARNAT-2004-01-457, convocatoria: SEMARNAT-CONACYT 2004).

LITERATURA CITADA

- Aris-Brosou, S., L. Excoffier. 1996. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution* (13): 494-504.
- Bandelt, H-J, P. Forster, A. Rol. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* (16): 37-48.
- Barker, C.S., A. Perry, J.L. Bannister, M.T. Weinrich, R.B. Abernethy, J. Calambokidis, R.H. Lambertsen, R.J. Urbán O. Vazquez, P.J. Clapham, A. Alling, S.J. O'Brien, S.R. Palumbi. 1993. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. Proceedings of the Natural Academic of Science of the United States of America (90):8239-8243.
- CITES. 2002. Proposal to include the whale shark (*Rhincodon typus*). In: Appendix II, the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES). The Philippines and India to the 12th Conference of Parties to CITES, Chile, November 2002. (www.cites.org).
- Colman, J.G. 1997. A review of the biology and ecology of the whale shark. *Journal of Fish Biology* (51):1219-1234.
- Compagno, L.J. 1984. FAO species catalogue. vol 4, sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species know to date. Part 1. Hexanchiformes to Lamniformes. FAO *fisheries synopsis* 125: 209-211.
- DOF, 2002. Diario Oficial de la Federación, 6 de marzo de 2002. T (582:4). México, D.F. pp. 1-80.
- Eckert, S.A. y B.S. Stewart. 2001. Telemetry and satellite tracking of whale sharks, *Rhincodon typus*, in the Sea of Cortez, Mexico, and the North Pacific Ocean. *Environmental Biology of Fishes* (60): 299-308.
- Eckert, S.A., L. L. Dolar, G. L. Kooyman, W. Perrin, R. A. Rahman. 2002. Movements of whale sharks (*Rhincodon typus*) in South-east Asian waters as determined by satellite telemetry. *J. Zool. Lond* (257): 111-115.
- Excoffier, L., P.E. Smouse, J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* (131): 479-491.
- Excoffier L. y P.E. Smouse. 1994. Using Allele Frequencies and Geographic Subdivision to Reconstruct Gene Trees Within a Species: Molecular Variance Parsimony. *Genetics* (136): 343-359
- Haig, S. M. 1998. Molecular contributions to conservation. Ecology.
- Heist, J., J.A. Musick, J.E. Graves. 1996. Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* (53): 583-588.
- Hueter, R., J. González-Cano, R. de la Parra, J. Tyminski, J. Perez-Ramírez, F. Remolina-Suarez. 2005. Biological studies of large feeding aggregations of whale sharks (*Rhincodon typus*) in the southern Gulf of Mexico. International Whale Shark Conference. Perth, Australia.
- Keeney, D.B., M. Heupel, R.E. Hueter, E.J. Heist. 2003. Genetic heterogeneity among blacktip shark, *Carcharhinus limbatus*, continental nurseries along the U.S. Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Biology* (143): 1039-1046.
- Ketchum, M.K., 2003. Distribución espacio-temporal y hábitos alimentarios del tiburón ballena en la Bahía de la Paz y áreas adyacentes. Tesis. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B.C.S., México. 91 pp.
- Nei. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
- Norman, B.M. 2000. In: 2000 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 61 pp. (Book and CD) also on <http://www.redlist.org/>
- Norman, B.M. 2004. Review of the current conservation concerns for the whale shark (*Rhincodon typus*), a regional perspective. AMCS. 74 pp.
- Primark, R. B. 2002. Essentials of Conservation Biology. Sinauer Associates. USA. 698 pp.
- Posada, D. y K.A. Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* (16): 37-45.
- Ramírez-Macias D., R. Vázquez-Juárez, F. Galván-Magaña, A. Munguía-Vega. [In press]. Variations of the mitochondrial control region sequence in whale sharks (*Rhincodon typus*) from the Gulf of California, Mexico. In: T.R. Irvine and J.K. Keesing (Eds.) Whale Sharks: Science, Conservation and Management. Proceedings of the First International Whale Shark Conference, 9-12 May 2005 Australia. Fisheries Research special issue.
- Rodríguez, N.D, R. A. Enríquez, N.T., Cárdenas, A.G. Zavala, A. H. Vázquez, C.R. Godínez. 2003. Propuesta de programa de manejo de tiburón ballena (*Rhincodon typus*) con referencia específica a Bahía de Los Ángeles, Baja California. Documento para revisión. México.

co. 61pp.

- Schneider, S., D. Roessli, L. Excoffier. 2000 Arlequin. 2.000: A software of population genetic data analysis. Genetics and Biometry laboratory. University of Geneva, Switzerland.
- Smith, T.B. y R.K. Wayne. 1996. Molecular genetic approaches in conservation. Oxford University Press. USA. 483 pp.
- Swofford, D. L. 1998. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* (123): 597-601.
- Waples, R.S. 1995. Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species. *Act. Am. Fish. Soc. Symp* (17):8-27.
- Wolfson, F.H. 1986. Occurrences of the whale shark, *Rhincodon typus*, Smith. Pp. 208-226. In: Indo-Pacific Fish Biology. Uyeno, T., R. Arai, T. Taniuchi, K. Matsuura (Eds.). Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes, Ichthyological Society of Japan, Tokio.