

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES
DE CETÁCEOS DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO:
SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL Y LOS
GENES COI Y NADH5 DEL ADN MITOCONDRIAL**

SILVIA HILDEBRANDT

Las Palmas de Gran Canaria, septiembre de 2002

8/2002-03

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO**

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de _____

SOBRESALIENTE CUM LAUDE

Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de noviembre de 2002.

El/a Presidente/a: Dr.D. Antonio Fernández Rodríguez,

El/a Secretario/a: Dr.D. María Jesús Zamorano Serrano,

El/a Vocal: Dr.D. José Luis Martín Esquivel,

El/a Vocal: Dr.D. Mariano Hernández Ferrer,

El/a Vocal: Dr.D. José Juan Castro Hernández,

La Doctoranda: D^a. Silvia Hildebrandt.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE
CETÁCEOS DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO:
SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL Y LOS
GENES COI Y NADH5 DEL ADN MITOCONDRIAL**

Silvia Hildebrandt

**Las Palmas de Gran Canaria
2002**

El presente trabajo ha sido financiado con los proyectos *Apoyo a la conservación del delfín mular (*Tursiops truncatus*) y la tortuga boba (*Caretta caretta*) en Canarias (LIFE-B4-3200/97/247)* y *Caracterización genética de las poblaciones de delfín mular y calderón tropical en el Archipiélago Canario* del Gobierno de Canarias (PI 2001/111), y con una beca de postgrado para la realización de tesis doctorales concedida durante los años 1996-2000 por el Gobierno de Canarias.

Todas las muestras de biopsia fueron tomadas con una autorización concedida por la Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente – Viceconsejería de Medio Ambiente del Gobierno de Canarias.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Tesis Doctoral presentada por **Dña. Silvia Hildebrandt**

Dirigida por los Doctores: **D. Luis Felipe López Jurado**
D. Juan Manuel Afonso López

El Director

El Director

La Doctoranda

Luis Felipe
López Jurado

Juan Manuel
Afonso López

Silvia
Hildebrandt

Las Palmas de Gran Canaria
2002

LUIS FELIPE LÓPEZ JURADO, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

INFORMA:

Que Dña. Silvia Hildebrandt, Licenciada en Ciencias del Mar, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado "**ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE CETÁCEOS DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO: SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL Y LOS GENES COI Y NADH5 DEL ADN MITOCONDRIAL**", el cual considero reúne las condiciones y la calidad científica para optar al grado de Doctor en Ciencias del Mar.

Las Palmas de Gran Canaria, 23 de septiembre de 2002

Fdo.: Luis Felipe López Jurado

JUAN MANUEL AFONSO LÓPEZ, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

INFORMA:

Que Dña. Silvia Hildebrandt, Licenciada en Ciencias del Mar, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado "**ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE CETÁCEOS DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO: SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL Y LOS GENES COI Y NADH5 DEL ADN MITOCONDRIAL**", el cual considero reúne las condiciones y la calidad científica para optar al grado de Doctor en Ciencias del Mar.

Las Palmas de Gran Canaria, 23 de septiembre de 2002

Fdo.: Juan Manuel Afonso López

**A MI FAMILIA
Y A JOSÉ ÁNGEL**

**JAMÁS SE DESCUBRIRÍA NADA
SI NOS CONSIDERÁSEMOS SATISFECHOS
CON LAS COSAS DESCUBIERTAS.**

SÉNECA

AGRADECIMIENTOS

He recibido mucha ayuda y apoyo durante estos largos años que ha durado mi investigación por lo que se me hace difícil empezar este apartado de agradecimientos. Espero no olvidar a nadie pero si es así, ruego comprensión.

Agradezco ante todo a mis directores, al Dr. Luis Felipe López Jurado, por facilitarme mis inicios en la investigación en el mundo de los cetáceos desde mis tiempos de estudiante, por sugerirme este apasionante tema y por poner a mi disposición los medios necesarios para la obtención de las muestras, sin las cuales no hubiese podido realizar mi trabajo; y al Dr. Juan Manuel Afonso López. Gracias Juanma por depositar tu confianza en mí e integrarme en tu equipo desde el principio. Nunca podré agradecerte lo suficiente todo el tiempo, esfuerzo, conocimientos y medios económicos que has invertido en este trabajo y tu apoyo y los ánimos para seguir adelante en los momentos de mayor dificultad. Las estupendas personas y ambiente de trabajo que hay en tu equipo, son sólo el reflejo de tu propia persona. Espero poder compensarte algún día.

Hablando de equipos, doy las gracias, profundamente, a mis compañeros de laboratorio, Víctor, Maite, Nicolás, Ana y M^a Jesús con los que he compartido tantísimas horas de esfuerzo, fracasos y éxitos, que, por pequeños que fueran, a nosotros nos parecían logros históricos. A todos os deseo de corazón muchísima suerte en vuestros respectivos proyectos.

Otro equipo con el que he compartido innumerables e inolvidables momentos es el de campo. Gracias a Vidal Martín, a quién admiro por sus profundos conocimientos sobre los cetáceos y por su pasión por investigar. Te agradezco sinceramente que compartieras ambas cosas conmigo. Una gran parte de este trabajo te la debo a tí.

Gracias a Sonia García y Antonella Servidio, dos grandes promesas en la investigación en cetáceos en Canarias. Espero poder compartir con vosotras muchos años más de trabajo en el futuro. Y gracias a todos aquellos que han pasado por el "Monachus" durante los años de campañas y nos han ayudado en nuestro trabajo con su voluntad y su pasión por los cetáceos, a nuestro patrón Chago Quintana, a Urimare, a Rafa, a Erika y a tantísimos otros con los que hemos compartido millas y millas de navegación alrededor de las islas.

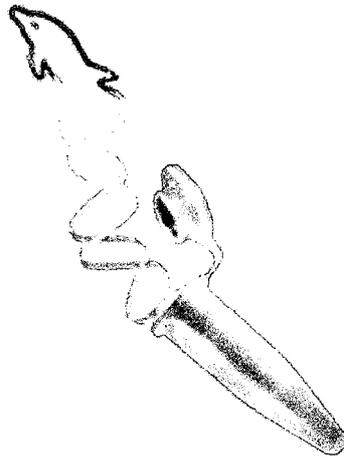
Agradezco también a la Unidad de Histología y Anatomía Patológica Veterinaria por facilitarme en todo momento material de animales varados para incluir en este estudio. Gracias a Michel André, con el que compartí eternas y frías noches en vela en el puente del "Monachus" durante los primeros años y a Eduard Degollada, Manolo Arbelo, Pedro Castro y Antonio Fernández.

También agradezco mucho a todos aquellos que revisaron este documento y me dieron importantes consejos para mejorarlo.

Gracias, como no, a mi familia que siempre me ha dado todo tipo de facilidades para que siguiera el camino que he elegido. Sé que para ellos no siempre ha sido fácil sobrellevar el tiempo y la distancia que nos separa.

Gracias a mis amigos canarios y a todas las personas que me han acogido con tanto cariño aquí, porque con su amistad y apoyo han compensado un poco la falta de mi familia y gracias también a mis amigas de la península, por no olvidarme y animarme desde la distancia.

Y sobre todo quiero darte las gracias a tí, José Ángel. Por tu ayuda, tu apoyo incondicional, tu confianza en mí, tu comprensión, tus ánimos a seguir adelante cuando no veía el final, tu cariño... Sin duda alguna has vivido conmigo los peores momentos de este trabajo pero también los mejores. Sin tí no lo hubiese conseguido. Gracias, gracias, gracias.



ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA IMPORTANCIA DE LOS CETÁCEOS EN LAS ISLAS CANARIAS	1
1.2. EL ESTUDIO CIENTÍFICO DE LAS POBLACIONES DE CETÁCEOS EN CANARIAS Y LA NECESIDAD DE REALIZAR ESTUDIOS GENÉTICOS	3
1.3. EL ADN MITOCONDRIAL Y SU IDONEIDAD PARA LOS ESTUDIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES	4
1.3.1. <i>La región control o D-loop</i>	7
1.3.2. <i>Los genes COI y NADH5</i>	8
1.4. ANTECEDENTES DE LOS ESTUDIOS GENÉTICOS EN CETÁCEOS UTILIZANDO ADNMT	10
1.4.1. <i>Estudios de estructuración genética en poblaciones de cetáceos</i>	11
1.4.2. <i>Identificación de especies mediante técnicas moleculares</i>	21
1.4.3. <i>Estudios de filogenia</i>	23
1.5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO	26
1.5.1. <i>Delfín mular - Tursiops truncatus (Montagu, 1821)</i>	26
1.5.2. <i>Calderón tropical - Globicephala macrorhynchus Gray, 1846</i>	27
1.5.3. <i>Delfín común - Delphinus delphis Linnaeus, 1758</i>	29
1.5.4. <i>Delfín moteado atlántico - Stenella frontalis (Cuvier, 1829)</i>	30
1.5.5. <i>Delfín listado - Stenella coeruleoalba (Meyen, 1833)</i>	30
1.5.6. <i>Zifio de Gervais - Mesoplodon europaeus Gervais, 1855</i>	32
1.5.7. <i>Cachalote - Physeter macrocephalus Linnaeus, 1758</i>	33
1.5.8. <i>Rorcual común - Balaenoptera physalus (Linnaeus, 1758)</i>	34
1.5.9. <i>Rorcual tropical - Balaenoptera edeni Anderson, 1878</i>	35
1.6. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	37

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
2.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	39
2.1.1. <i>Muestras de biopsias</i>	39
2.1.2. <i>Muestras de necropsias</i>	44
2.2. MUESTRAS UTILIZADAS EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO	45
2.3. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO DE LAS MUESTRAS	46
2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN	53
2.5. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES DE ADN	53
2.5.1. <i>La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	54
2.5.2. <i>Diseño de los cebadores usados en las reacciones de PCR</i>	56
2.5.3. <i>La reacción de amplificación</i>	59
2.6. COMPROBACIÓN DEL RESULTADO DE LA REACCIÓN DE PCR.....	60
2.7. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS	61
2.7.1. <i>Secuenciación por tinción de plata</i>	63
2.7.2. <i>Secuenciación automática</i>	64
2.8. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	66
3. RESULTADOS	71
3.1. LA REGIÓN D-LOOP	71
3.1.1. <i>El delfín mular</i>	71
Haplotipos.....	71
Polimorfismo	75
Estructura de las poblaciones de delfín mular en el Archipiélago Canario	75
3.1.2. <i>El calderón tropical</i>	81
Haplotipos.....	81
Polimorfismo	81
Estructura de las poblaciones de calderón tropical en el Archipiélago Canario.....	86
3.1.3. <i>El delfín común</i>	89
Haplotipos.....	89
Polimorfismo	89
Estructura de las poblaciones de delfín común en el Archipiélago Canario.....	95
3.1.4. <i>El rorcual tropical</i>	98
Haplotipos.....	98

3.1.5. Identificación molecular de un zifio de Gervais	100
3.2. EL GEN COI.....	103
3.3. EL GEN NADH5.....	112
4. DISCUSIÓN	121
4.1. EL DELFÍN MULAR	121
4.2. EL CALDERÓN TROPICAL.....	126
4.3. EL DELFÍN COMÚN	130
4.4. EL RORCUAL TROPICAL.....	136
4.5. LA REGIÓN CONTROL.....	139
4.6. LOS GENES COI Y NADH5	141
5. CONCLUSIONES	145
6. BIBLIOGRAFÍA.....	147
ANEXO I: SECUENCIAS	169
1. SECUENCIAS DE LA REGIÓN D-LOOP DE LOS HAPLOTIPOS DE DELFÍN MULAR (TURSIOPS TRUNCATUS) DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO.....	169
2. SECUENCIAS DE LA REGIÓN D-LOOP DE LOS HAPLOTIPOS DE CALDERÓN TROPICAL (GLOBICEPHALA MACRORHYNCHUS) DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO.....	177
3. SECUENCIAS DE LA REGIÓN D-LOOP DE LOS HAPLOTIPOS DE DELFÍN COMÚN (DELPHINUS DELPHIS) DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO.....	180
4. SECUENCIA DE LA REGIÓN D-LOOP DEL HAPLOTIPO DE RORCUAL TROPICAL (BALAENOPETERA EDENI) DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO.....	184
5. SECUENCIA DE LA REGIÓN D-LOOP DEL HAPLOTIPO DE UN ZIFIO DE GERVAIS (MESOPLONDON EUROPAEUS) DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO.....	184
6. SECUENCIAS DEL GEN COI DE LOS HAPLOTIPOS DE VARIAS ESPECIES DE CETÁCEOS DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO	185
7. SECUENCIAS DEL GEN NADH5 DE LOS HAPLOTIPOS DE VARIAS ESPECIES DE CETÁCEOS DEL ARCHIPIÉLAGO CANARIO	197
ANEXO II: PROTOCOLOS	205
1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	205
2. SECUENCIACIÓN POR TINCIÓN DE PLATA	207
A. Preparación de los cristales.....	207

A.1. Limpieza de los cristales.....	207
A.2. Preparación del cristal corto.....	207
A.3. Preparación del cristal largo.....	207
A.4. Colocación de los cristales.....	208
<i>B. Preparación del gel de acrilamida.....</i>	<i>208</i>
<i>C. Tinción de plata y revelado del gel.....</i>	<i>209</i>
3. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN CON "ABI PRISM® DRHODAMINE TERMINATOR CYCLE SEQUENCING READY REACTION KIT".....	210
ANEXO III : TABLAS DE DISTANCIAS	211
ANEXO IV : ESTADILLOS.....	219

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Disposición de los genes en el ADNmt de los mamíferos.	5
Figura 1.2. Las tres teorías sobre las relaciones filogenéticas en el orden Cetacea.	24
Figura 1.3. Delfín mular.....	26
Figura 1.4. Calderón tropical.....	28
Figura 1.5. Delfín común.....	29
Figura 1.6. Ejemplares juveniles de delfín moteado.	30
Figura 1.7. Delfín listado.....	31
Figura 1.8. Zifio de Gervais.....	32
Figura 1.9. Aleta caudal de cachalote.....	33
Figura 1.10. Rorcual común.....	34
Figura 1.11. Cabeza de rorcual tropical en la que se aprecian las tres crestas craneales.	36
Figura 2.1. Representación del número de biopsias de cetáceos tomadas en las campañas durante los años 1999 y 2000, clasificadas por especies.....	40
Figura 2.2. Material utilizado en la toma de muestras. A. Ballesta y flecha de fibra de carbono con flotador de espuma de poliestireno. B. Punta de biopsia de acero inoxidable.....	42
Figura 2.3. Representación del número de muestras de necropsias de cetáceos varados durante los años 1991 a 2001 clasificadas por especies.....	45
Figura 2.4. Localización de las muestras de delfín mular analizadas en el presente trabajo.	47
Figura 2.5. Localización de las muestras de calderón tropical analizadas en el presente trabajo. .	48
Figura 2.6. Localización de las muestras de delfín común analizadas en el presente trabajo.	49
Figura 2.7. Localización de las muestras de rorcual tropical analizadas en el presente trabajo.....	50
Figura 2.8. Localización de las muestras para las que se ha secuenciado el gen COI.....	51
Figura 2.9. Localización de las muestras para las que se ha secuenciado el gen NADH5.....	52
Figura 2.10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN genómico de muestras de piel de varias especies de cetáceos.....	54
Figura 2.11. Gel de agarosa al 1% en el que se ha cargado el producto de la reacción de PCR para amplificar el gen NADH5 en distintas especies de cetáceos.....	61

Figura 2.12. Gel de acrilamida teñido con el método de la tinción de plata	64
Figura 2.13. Fragmento de la región D-loop de la muestra Be2-29/8 secuenciado con el secuenciador automático.....	65
Figura 3.1. Diversidad nucleotídica π (Pi) de la región control, en intervalos de 30 bases, en el delfín mular del Archipiélago Canario.....	78
Figura 3.2. Árbol filogenético construido por el método <i>Neighbor Joining</i> a partir de distancias genéticas calculadas par a par para la población de delfín mular del Archipiélago Canario.....	80
Figura 3.3. Diversidad nucleotídica π (Pi) de la región control, en intervalos de 30 bases, en el calderón tropical del Archipiélago Canario.....	85
Figura 3.4. Árbol filogenético construido por el método <i>Neighbor Joining</i> a partir de distancias genéticas calculadas par a par para la población de calderón tropical del Archipiélago Canario ...	88
Figura 3.5. Diversidad nucleotídica π (Pi) de la región control, en intervalos de 30 bases, en el delfín común del Archipiélago Canario.....	94
Figura 3.6. Árbol filogenético construido por el método <i>Neighbor Joining</i> a partir de distancias genéticas calculadas par a par para la población de delfín común del Archipiélago Canario	97
Figura 3.7. Reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre las distintas especies de la familia Ziphiidae de la base de datos Genbank y el individuo no identificado muestreado en Canarias...	102
Figura 3.8. Diversidad nucleotídica π (Pi) del gen COI, en intervalos de 30 bases, considerando las 9 especies de cetáceos.....	109
Figura 3.9. Árbol filogenético construido por el método <i>Neighbor Joining</i> a partir de distancias genéticas en el gen COI, calculadas por el algoritmo de Jukes-Cantor para diversas especies de cetáceos.....	110
Figura 3.10. Diversidad nucleotídica π (Pi) del gen NADH5, en intervalos de 30 bases, considerando las 8 especies de cetáceos.....	119
Figura 3.11. Árbol filogenético construido por el método <i>Neighbor Joining</i> a partir de distancias genéticas en el gen NADH5, calculadas por el algoritmo de Jukes-Cantor para diversas especies de cetáceos.....	120
Figura 4.1. Árbol filogenético construido por el método de Mínima Evolución a partir de distancias par a par, para las poblaciones mundiales de <i>Tursiops truncatus</i>	125
Figura 4.2. Árbol filogenético construido por el método <i>Neighbor Joining</i> a partir de distancias par a par, para las poblaciones mundiales de <i>Globicephala macrorhynchus</i>	127
Figura 4.3. Árbol filogenético construido por el método del <i>Neighbor-Joining</i> a partir de distancias par a par, para las poblaciones mundiales de delfín común.....	135

Figura 4.4. Árbol filogenético del rorcual tropical, construido por el método <i>Neighbor-Joining</i> a partir de distancias par a par	138
Figura IV.1. Estadillos utilizados para registrar la información asociada a las muestras de biopsia obtenidas.....	219
Figura IV.1. Continuación. Estadillos utilizados para registrar la información asociada a las muestras de biopsia obtenidas.	220
Figura IV.1. Continuación. Estadillos utilizados para registrar la información asociada a las muestras de biopsia obtenidas.	221

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Características de los cebadores usados en las reacciones de PCR correspondientes a la amplificación.....	58
Tabla 2.2. Condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos utilizadas en las reacciones de PCR de amplificación.....	59
Tabla 2.3. Características de los cebadores usados en las reacciones de PCR correspondientes a la secuenciación.....	62
Tabla 2.4. Condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos utilizadas en las reacciones de PCR de secuenciación.....	65
Tabla 3.1. Muestras de <i>Tursiops truncatus</i> secuenciadas.....	72
Tabla 3.1. (Continuación). Muestras de <i>Tursiops truncatus</i> secuenciadas.....	73
Tabla 3.2. Lugares variables en las 399 bases secuenciadas para la región control de los 31 haplotipos de delfín mular.....	74
Tabla 3.3. Lugares polimórficos de la región control del ADNmt en la población canaria de delfín mular.....	76
Tabla 3.4. Resultados del análisis de la varianza molecular teniendo en cuenta las distancias genéticas entre las secuencias de D-loop calculadas por el método par a par y la frecuencia haplotípica (Φ_{ST}) y sólo la frecuencia haplotípica (F_{ST}) de cinco posibles poblaciones de delfín mular en el Archipiélago Canario: Tenerife, Fuerteventura, norte de Gran Canaria, oeste de Gran Canaria y sur de Gran Canaria.....	77
Tabla 3.5. Resultados del análisis de la varianza molecular utilizando las distancias genéticas calculadas por el método par a par entre las secuencias de D-loop de los dos grupos de delfín mular en el Archipiélago Canario: Canarias Tt-1 y Canarias Tt-2.....	79
Tabla 3.6. Muestras de <i>Globicephala macrorhynchus</i> secuenciadas.....	82
Tabla 3.6. (Continuación). Muestras de <i>Globicephala macrorhynchus</i> secuenciadas.....	83
Tabla 3.7. Lugares variables en las 402 bases secuenciadas para la región control de los 11 haplotipos de calderón tropical.....	84
Tabla 3.8. Lugares polimórficos de la región control del ADNmt en la población canaria de calderón tropical.....	86

Tabla 3.9. Resultados del análisis de la varianza molecular teniendo en cuenta las distancias genéticas entre las secuencias de D-loop calculadas por el método par a par y la frecuencia haplotípica (ϕ_{ST}) y sólo la frecuencia haplotípica (F_{ST}) de dos posibles poblaciones de calderón tropical en el Archipiélago Canario: Tenerife y Gran Canaria.....	87
Tabla 3.10. Resultados del análisis de la varianza molecular utilizando las distancias genéticas calculadas por el método par a par entre las secuencias de D-loop de los dos grupos de calderón tropical en el Archipiélago Canario: Canarias Gm-1 y Canarias Gm-2.....	88
Tabla 3.11. Muestras de <i>Delphinus delphis</i> secuenciadas.....	90
Tabla 3.11. (Continuación). Muestras de <i>Delphinus delphis</i> secuenciadas.....	91
Tabla 3.12. Lugares variables en las 398 bases secuenciadas para la región control de los 21 haplotipos de delfín común.....	92
Tabla 3.13. Lugares polimórficos de la región control del ADNmt en la población canaria de delfín común.....	93
Tabla 3.14. Resultados del análisis de la varianza molecular teniendo en cuenta las distancias genéticas entre las secuencias de D-loop calculadas por el método par a par y la frecuencia haplotípica (ϕ_{ST}) y sólo la frecuencia haplotípica (F_{ST}) de cuatro posibles poblaciones de delfín común en el Archipiélago Canario: 1997, 1998, 1999 y 2000.....	96
Tabla 3.15. Resultados del análisis de la varianza molecular utilizando las distancias genéticas calculadas por el método par a par entre las secuencias de D-loop de los dos grupos de delfín común en el Archipiélago Canario: Canarias Dd-1 y Canarias Dd-2.....	97
Tabla 3.16. Muestras de <i>Balaenoptera edeni</i> secuenciadas.....	99
Tabla 3.17. Muestras secuenciadas para el gen COI.....	104
Tabla 3.18. Porcentaje de divergencia media entre secuencias de ADN dentro de una misma especie (π) (a lo largo de la diagonal) y entre especies (D_{xy}) (debajo de la diagonal) y sus errores estándar para el gen COI en varias especies de cetáceos.....	105
Tabla 3.19. Número de mutaciones, mutaciones por posición en el codón, cambios sinónimos y aminoácidos informativos para el gen COI en las diferentes especies de cetáceos secuenciadas...	106
Tabla 3.20. Aminoácidos variables en la cadena peptídica que resulta de la traducción de las secuencias de COI del ADNmt de cada haplotipo.....	107
Tabla 3.21. Porcentaje de divergencia media entre secuencias de aa dentro de una misma especie (a lo largo de la diagonal) y entre especies (debajo de la diagonal) y sus errores estándar para el gen COI en varias especies de cetáceos.....	108
Tabla 3.22. Muestras secuenciadas para el gen NADH5.....	114

Tabla 3.23. Porcentaje de divergencia media entre secuencias de ADN dentro de una misma especie (π) (a lo largo de la diagonal) y entre especies (D_{xy}) (debajo de la diagonal) y sus errores estándar para el gen NADH5 en varias especies de cetáceos	115
Tabla 3.24. Número de mutaciones, mutaciones por posición en el codón, cambios sinónimos y aminoácidos informativos para el gen NADH5 en las diferentes especies de cetáceos secuenciadas, considerando aquellos haplotipos que no presentaron delecciones.....	116
Tabla 3.25. Aminoácidos variables en la cadena peptídica que resulta de la traducción de las secuencias de NADH5 del ADNmt de los haplotipos que no presentaron delecciones.....	117
Tabla 3.26. Porcentaje de divergencia media entre secuencias de aa dentro de una misma especie (a lo largo de la diagonal) y entre especies (debajo de la diagonal) y sus errores estándar para el gen NADH5 en varias especies de cetáceos.....	118
Tabla 4.1. Índice de fijación (ϕ_{ST}) entre poblaciones de delfín mular de distintas áreas geográficas y su significación estadística (P).....	122
Tabla 4.2. Índice de fijación (ϕ_{ST}) entre poblaciones de delfín común de distintas áreas geográficas y su significación estadística (P).....	132
Tabla III.1. Distancias par a par entre los haplotipos de la región control de delfín mular del Archipiélago Canario.....	211
Tabla III.1. Continuación. Distancias par a par entre los haplotipos de la región control de delfín mular del Archipiélago Canario.....	212
Tabla III.2. Distancias par a par entre los haplotipos de la región control de calderón tropical del Archipiélago Canario.....	213
Tabla III.3. Distancias par a par entre los haplotipos de la región control de delfín común del Archipiélago Canario.....	214
Tabla III.3. Continuación. Distancias par a par entre los haplotipos de la región control de delfín común del Archipiélago Canario.....	215
Tabla III.4. Distancias par a par entre los haplotipos del gen COI de diversas especies de cetáceos del Archipiélago Canario.....	216
Tabla III.4. Continuación. Distancias par a par entre los haplotipos del gen COI de diversas especies de cetáceos del Archipiélago Canario.....	217
Tabla III.5. Distancias par a par entre los haplotipos del gen NADH5 de diversas especies de cetáceos del Archipiélago Canario.....	218



RESUMEN / ABSTRACT

RESUMEN

En el presente trabajo se realiza un estudio de la estructura de poblaciones en cuatro especies de cetáceos del Archipiélago Canario desde un punto de vista genético. Dos de las especies son residentes, el delfín mular (*Tursiops truncatus*) y el calderón tropical (*Globicephala macrorhynchus*) y las otras dos, son especies transeúntes, el delfín común (*Delphinus delphis*) y el rorcual tropical (*Balaenoptera edeni*). Para estas especies, se han secuenciado aproximadamente 400 pares de bases (pb) de un marcador mitocondrial, la región control o D-loop. Además, para un total de 9 especies de cetáceos, 7 odontocetos y 2 mysticetos, se han secuenciado dos genes mitocondriales, el COI y el NADH5, que hasta el momento no habían sido descritos para la mayoría de ellas, con el fin de establecer las relaciones filogenéticas entre las mismas.

En la región D-loop, los valores de diversidad nucleotídica fueron del 1,7% en el delfín mular, del 0,4% en el calderón tropical, del 1,5% en el delfín común y no se halló variabilidad en las muestras de rorcual tropical analizadas. Se encontraron 31 haplotipos distintos en las 42 muestras de delfín mular. Todos ellos fueron exclusivos del Archipiélago Canario. En el calderón tropical el número de haplotipos fue 11 en 33 muestras analizadas. Uno de ellos coincidió con un haplotipo descrito para el Océano Pacífico. Para las 28 muestras de delfín común se describieron 21 haplotipos, coincidiendo uno de ellos con un haplotipo hallado previamente en el Mar Negro. El único haplotipo hallado en las 8 muestras de rorcual tropical, que es la primera descripción genética de esta especie en el Océano Atlántico, fue igual a uno del Océano Índico.

La población canaria de delfín mular está subdividida en dos grupos atendiendo a la afinidad que muestra hacia otras poblaciones descritas previamente. Así, el grupo

Canarias Tt-1 está más relacionado con poblaciones atlánticas mientras que el grupo Canarias Tt-2 es más cercano a poblaciones chinas. Los valores de distancia genética de la población canaria con otras poblaciones de los morfotipos *Tursiops truncatus* y *Tursiops aduncus* apoyan la teoría de que ambos podrían ser especies distintas.

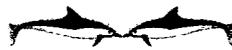
En el calderón tropical se ha comprobado la existencia de dos grupos genéticamente distintos que tienen cierta correspondencia con las áreas de muestreo Tenerife y Gran Canaria, pero entre los que existe flujo genético puesto que comparten los haplotipos más frecuentes. Para esta especie se ha detectado en Canarias, una variabilidad genética 8 veces superior a la descrita para las poblaciones atlántica y pacífica lo que podría indicar un signo de primitivismo.

El delfín común en Canarias está estructurado en dos subgrupos, Canarias Dd-1 y Canarias Dd-2, más relacionados con muestras del Mar Negro / Mediterráneo y muestras de California / Océano Pacífico, respectivamente, que entre ellos. El valor de distancia genética entre estos dos subgrupos fue del mismo orden de magnitud que el definido entre los morfotipos *Delphinus delphis* y *Delphinus capensis* que viven en simpatria en California, por lo que no da soporte a la hipótesis de que puedan ser especies distintas.

La secuenciación de la región control se erigió como una herramienta útil para la clasificación de un ejemplar de zifio como perteneciente a la especie *Mesoplodon europaeus* algo que no pudo realizarse previamente por técnicas de fotoidentificación.

La diversidad nucleotídica dentro del orden Cetacea fue de un 11,7% para el gen COI y de un 13,3% para el gen NADH5. En este último gen se han encontrado varias deleciones en diferentes especies (delfín mular, delfín común, delfín listado y calderón tropical) que lo hacen disfuncional. Tanto el COI como el NADH5 son válidos para establecer relaciones filogenéticas interfamiliares. Sin embargo, sólo el COI es capaz de resolver de forma adecuada la variabilidad intra e interespecífica en el orden Cetacea. El

análisis de ambos genes apoya la hipótesis que establece que no existe origen monofilético de las familias Physeteridae y Balaenopteridae.



ABSTRACT

The present dissertation displays a genetic study of the population structure of four cetacean species found in the Canarian archipelago. Two of these species are resident, the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and the short-finned pilot whale (*Globicephala macrorhynchus*) and the other two, the common dolphin (*Delphinus delphis*) and the Bryde's whale (*Balaenoptera edeni*), are non-resident. About 400 bp of the mitochondrial D-loop region have been sequenced for each of these species. On the other hand, and in order to establish phylogenetic relationships between 9 species of cetaceans - 7 odontocetes and 2 mysticetes - two mitochondrial genes (COI and NADH5) that have not previously been described for most of them, have also been analyzed.

The nucleotide diversity values for the D-loop were found to be 1.7% for bottlenose dolphins, 0.4% for short-finned pilot whales and 1.5% for common dolphins. No variability was found in the Bryde's whale samples. 31 different haplotypes were encountered in the 42 samples of bottlenose dolphins. All of them particular for the Canarian Archipelago. The number of haplotypes for the 33 pilot whale samples was 11, one of them agreeing with one previously found in the Pacific Ocean. For the 28 common dolphin samples, 21 haplotypes were described, one of them identical to another one detected in the Black Sea. The only haplotype discovered in the 8 samples of Bryde's whale, which represents the first genetic description of this species in the Atlantic Ocean, was the same as one haplotype characterized in the Indian Ocean.

The Canarian bottlenose dolphin population is subdivided into two groups according to their affinity to other populations previously described. The Canarias Tt-1 group is more closely related to the Atlantic populations, whereas Canarias Tt-2 is closer to Chinese populations. Genetic distance values between the Canarian population and

other populations of the *T. truncatus* and the *T. aduncus* morphotypes support the theory that these might be different species.

The existence of two genetically different short-finned pilot whale groups has been established. There is a certain correspondence between each group and its sampling area (Tenerife and Gran Canaria), but as they share the most frequent haplotypes it can be stated that a genetic flow exist between them. This species presents, in the Canary Islands, a genetic variability 8 times higher than the one described for the Atlantic and Pacific populations. This could represent a sign of primitivism.

The common dolphin population of the Canary Islands is also divided into two groups, Canarias Dd-1 and Canarias Dd-2, which are closer respectively to the Mediterranean / Black Sea samples and to the California / Pacific samples than to one another. However, the genetic distance value between those two groups is of the same order of magnitude as the one defined between the Californian sympatric morphotypes *D. delphis* and *D. capensis*, so that there is no support for the theory of them being different species.

Sequencing the control region has also resulted a valuable tool for classifying an individual beaked whale, which could be identified as a Gervai's beaked whale (*Mesoplodon europaeus*), identification that had previously failed by photo-ID.

Nucleotide diversity within the Cetacea order was of 11.7% for the COI gene and 13.3% for the NADH5 gene. Several deletions were found in the latter in different species (bottlenose dolphin, common dolphin, striped dolphin and short-finned pilot whale) that made this gene non-functional. Both the COI gene and the NADH5 gene are useful for establishing phylogenetic relationships among families but only the COI is able to satisfactory resolve the variability among and within species of the order Cetacea. Analysis of both genes supports the theory that there is no monophyletic origin of the families Physeteridae and Balaenopteridae.



1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La importancia de los cetáceos en las Islas Canarias

En aguas del Archipiélago Canario se han citado hasta el momento 26 especies de cetáceos, lo que representa aproximadamente una tercera parte de las especies que actualmente se conocen en todo el mundo. Existen, además, otras 6 especies, que por su área de distribución, es probable que pudieran hallarse en las islas, aunque hasta el momento no se tiene constancia de ello (*Feresa attenuata*, *Peponocephala electra*, *Stenella clymene*, *Stenella longirostris*, *Stenella attenuata* y *Phocoena phocoena*). De estas 26 especies se sabe que al menos 4 (*Globicephala macrorhynchus*, *Tursiops truncatus*, *Grampus griseus* y *Physeter macrocephalus*) tienen poblaciones residentes (Heimlich-Boran, 1993; André, 1997; Martín, 1998), es decir, se encuentran en el Archipiélago a lo largo de todo el año. Un segundo grupo de especies, compuesto por algunos delfines de los géneros *Stenella* y *Delphinus*, son estacionales y se pueden observar sobretodo en los meses de invierno. Los rorcuales incluyen a las Islas Canarias en sus rutas migratorias. Algunas especies se han observado tan sólo de forma puntual (*Eubalaena glacialis*, *Megaptera novaeangliae* y *Balaenoptera musculus*) y otras (*Kogia simus*, *Mesoplodon mirus*, *Hyperoodon ampullatus* y *Globicephala melas*) se conocen en las Islas tan sólo por varamientos, no habiéndose constatado ningún avistamiento de animales vivos en su medio natural (Martín, 1998; Martín y Urquiola, 2001).

Esta enorme riqueza cetológica es debida a la posición geográfica de las islas, que las hace susceptibles de formar parte de las rutas migratorias de algunas especies. Las condiciones oceanográficas, permiten, además, la presencia tanto de especies típicas de aguas cálidas o tropicales como de ambientes más fríos y el hecho de ser islas oceánicas

con una plataforma casi inexistente, es decir, con grandes profundidades a poca distancia de la costa, hace que sea habitual la presencia de especies oceánicas.

Asimismo, de entre todas las localidades del mundo en las que existe turismo de observación de cetáceos (unas 295), las canarias ocupan la segunda posición, después de las de Estados Unidos, en cuanto a número de visitantes. Este número se estimó en aproximadamente un millón en el año 1998. Entre los factores que favorecen esta actividad se encuentran: el buen clima reinante en las islas, la elevada probabilidad de encontrar cetáceos y el poco esfuerzo que hay que realizar para encontrarlos. Gracias a este clima estable, en Canarias se puede realizar la actividad de observación de cetáceos a lo largo de prácticamente todo el año. La presencia de una colonia estable y residente de calderones tropicales (*Globicephala macrorhynchus*) en un área relativamente reducida (unos 250 km²) al sudoeste de Tenerife, garantiza el avistamiento de cetáceos en la casi totalidad de las salidas y además muy cerca de la costa (Urquiola & Sevilla, 1998). Condiciones muy similares pueden hallarse también en otras zonas de las islas como son el sur de La Gomera o el sur de Gran Canaria, dónde ya ha empezado el desarrollo de la actividad de observación turística de cetáceos.

Todos los factores que facilitan esta actividad turística son también aplicables a los estudios científicos, por lo que las Islas Canarias representan un laboratorio ideal para la investigación de estas especies. Ésta es además muy necesaria ya que la enorme presión que los cetáceos soportan por las actividades turísticas, la contaminación ambiental y acústica, la degradación de su hábitat y otras muchas causas, podrían estar afectando negativamente a las poblaciones de las islas.

1.2. El estudio científico de las poblaciones de cetáceos en Canarias y la necesidad de realizar estudios genéticos

La investigación en el campo de los cetáceos empezó en las Islas Canarias hace aproximadamente unos veinte años, aunque ha sido en estos últimos en los que se ha realizado la mayor parte de los estudios. Estos han sido fruto, por un lado, de observaciones directas de los animales en el mar, realizando trabajos de censo, fotoidentificación, comportamiento, acústica, etc. y, por otro, del análisis de los animales que han varado en las costas (Escorza *et al.*, 1992; Martín *et al.*, 1992 y 1998; Heimlich-Boran, 1993; Martín & Santiago, 1996; Politi *et al.*, 1996; Ritter, 1996; André, 1997; Martín, 1998).

Existe, sin embargo, una enorme cantidad de información que es difícil o incluso imposible de obtener a través de la observación directa de estos animales en el mar. Problemas, como las condiciones meteorológicas o la falta de un barco debidamente equipado, dificultan la permanencia de los investigadores durante largos períodos en el mar. También el comportamiento de los propios animales, que a menudo se dejan ver muy poco en la superficie, dificulta la labor de inferir datos más detallados sobre la estructura de una población o las relaciones sociales y de parentesco que existen entre los individuos de un mismo grupo. Por otro lado hay que tener en cuenta que la estructura de las poblaciones viene definida por fuerzas modificadoras genéticas y medioambientales, tales como la deriva genética, la selección natural, la influencia antropogénica, las migraciones, el cruzamiento, etc. Es decir, a pesar de que es posible describir la estructura de una población de cetáceos empleando tan sólo datos de distribución, demográficos o morfológicos, es realmente el análisis genético la herramienta que permite abordar elementos fundamentales en cualquier estrategia de conservación como pueden ser, el significado evolutivo del aislamiento y la necesidad de mantener la diversidad genética dentro y entre poblaciones.

El conocimiento de los niveles de variabilidad genética o de consanguinidad dentro de una población y del flujo genético con otras poblaciones, puede dar una idea del grado en que la población podría estar en peligro de extinción. Una población sin diversidad genética podría ver amenazada su supervivencia al no ser capaz de adaptarse a un cambio rápido en las condiciones de su medio. La desaparición de un solo stock puede significar la pérdida de alelos poco frecuentes e imprescindibles para la continuidad de la especie.

Todo ello ha hecho que las técnicas de análisis genético sean utilizadas cada vez con mayor frecuencia en estudios de poblaciones naturales con el fin de conocer su "estado de salud genético", fundamentalmente cuando el objetivo es la conservación. Esto ha sido posible gracias al rápido y pleno desarrollo alcanzado en el conocimiento del genoma y de la teoría matemática de la genética evolutiva. Especial relevancia han tenido el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988), las técnicas de ingeniería genética y el gran espectro de marcadores moleculares puestos a disposición de los laboratorios.

1.3. El ADN mitocondrial y su idoneidad para los estudios de genética de poblaciones

De entre los marcadores moleculares, el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) se ha erigido como uno de los más relevantes en estudios de genética evolutiva, debido a las características que reúne.

Se trata de un ADN extracromosómico de fácil obtención y que está constituido por un número pequeño de genes. Así, contiene 2 genes de ARN ribosómico (ARNr), 22 genes de ARN de transferencia (ARNt) y 13 genes que codifican para proteínas que intervienen en la cadena respiratoria. Cada molécula de ADNmt contiene, además, una

región control en la que hay secuencias que regulan los procesos en el inicio de la replicación y la transcripción (Moritz *et al.*, 1987) (Figura 1.1.).

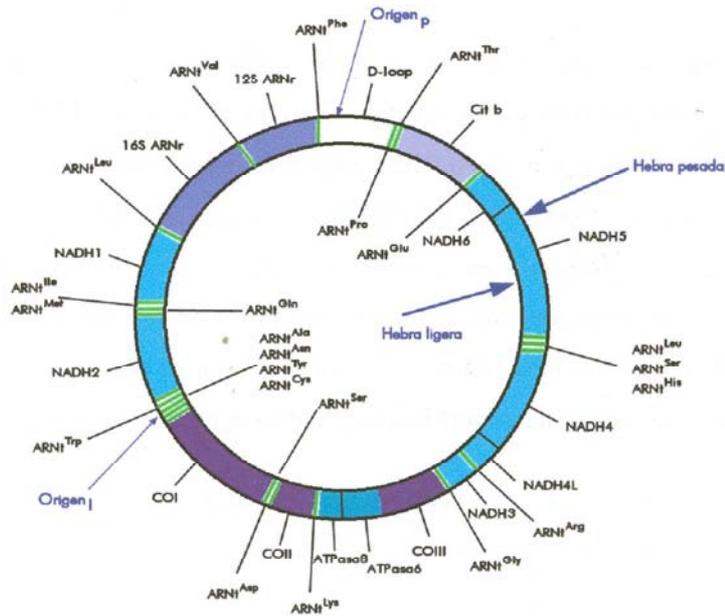


Figura 1.1. Disposición de los genes en el ADNmt de los mamíferos.

Es de herencia materna, es decir, en la división celular, el genoma mitocondrial no sigue las mismas reglas que los genes cromosómicos debido a su localización extranuclear. Cuando la célula se divide, cada una de las células hijas hereda la mitad de las mitocondrias de la madre y en la fecundación las mitocondrias del espermatozoide quedan fuera del huevo (Hutchinson *et al.*, 1974; Giles *et al.*, 1980). Así pues, las afinidades genéticas definidas por genotipos del ADNmt reflejan una filogenia matriarcal lo que permite el estudio de linajes maternos.

El hecho de que el ADNmt sea de herencia materna, hace también que genomas diferenciados no se junten durante la reproducción sexual, por lo que la recombinación entre moléculas de ADNmt es prácticamente inexistente. Ambas propiedades convierten

al ADNmt en un marcador muy apropiado para hacer un seguimiento de la historia evolutiva reciente, incluyendo eventos colonizadores, introducciones y cuellos de botella (Harrison, 1989).

Un estudio realizado por Brown *et al.* (1979) demostró que la tasa de evolución del genoma mitocondrial es muy elevada excediendo a la del ADN nuclear unas 5-10 veces. Esto es debido a que el ADNmt sufre una tasa de mutación alta, puesto que es extremadamente ineficiente en la reparación de errores de replicación y a que la tasa de fijación de estas mutaciones es también elevada, ya que el organismo es capaz de sobrevivir y de reproducirse aún y cuando existan errores en sus genes mitocondriales al ser poliploide para ellos. Esta rápida evolución hace que el genoma mitocondrial sea muy útil para examinar la variación genética tanto intra como interespecífica.

A pesar de todas las ventajas que presenta el ADNmt para los estudios genéticos, esas mismas características pueden resultar también inconvenientes por lo que siempre hay que tener precaución en la interpretación de los resultados que se obtienen al utilizar este tipo de genes. La ausencia de recombinación hace que el ADNmt se comporte como una sola entidad genética que se transmite por completo a la progenie. En *loci* independientes, los cambios al azar de las frecuencias génicas generados por la deriva genética en las poblaciones no ocurren de la misma forma, por lo que la estructura genética tanto espacial como temporal debería determinarse analizando distintos *loci*. Además, debido a la herencia materna el ADNmt reconstruye sólo linajes maternos. En especies en las que hay un comportamiento social complejo, existen diferencias en la dispersión entre machos y hembras por lo que la estructura poblacional que refleja el ADNmt puede diferir de la que reflejaría el ADN nuclear, de herencia biparental (Palumbi & Baker, 1994).

1.3.1. La región control o D-loop

En el ADNmt animal se encuentra, además de los genes estructurales, una amplia región no codificante que representa aproximadamente un 5-7% (unos 800-1200 pb) del total de la longitud del genoma mitocondrial (Southern *et al.*, 1988). Es la denominada región control o D-loop, que es el origen de replicación y transcripción del ADNmt. Está situada entre los genes ARNt^{Pro} y ARNt^{Phe} y su longitud varía según la especie. En cetáceos mide: 900 pares de bases (pb) en el delfín de Commerson (*Cephalorhynchus commersonii*) (Southern *et al.*, 1988), 946 pb en el rorcual aliblanco (*Balaenoptera acutorostrata*) y 921 pb en la orca (*Orcinus orca*) (Hoelzel *et al.*, 1991), 936 pb en el rorcual azul (*Balaenoptera musculus*) y 930 pb en el rorcual común (*Balaenoptera physalus*) (Árnason & Gullberg, 1993).

En muchas especies de mamíferos se ha comprobado que en la región D-loop las tasas de sustitución son muy elevadas. En humanos, por ejemplo, esta tasa es de 2,8 a 5 veces mayor a la del resto del ADNmt (Aquadro & Greenberg, 1982; Cann *et al.*, 1984). Hoelzel *et al.* (1991), en cambio, observaron que para varias especies de cetáceos la tasa de sustitución de la D-loop era de un orden de magnitud menor que la estimada para humanos y que no difería mucho de la del resto del genoma mitocondrial. Por el contrario, en el caso de las yubartas yubartas (*Megaptera novaeangliae*), Palsbøll *et al.* (1995) afirman que la variación genética en esta zona del ADNmt en la población del Atlántico Norte es de niveles similares a la de las poblaciones humanas.

La comparación de la región D-loop del delfín de Commerson publicada por Southern *et al.* (1988) con la de otras especies de mamíferos reveló la existencia de varios bloques conservados, concentrados mayoritariamente en una región central de unos 280 pb. También Hoelzel *et al.* (1991), que compararon la región D-loop del rorcual aliblanco y la orca con la del delfín de Commerson, indicaron que existe una región altamente conservada entre las tres especies entre las bases 325 y 585 aproximadamente. Sin

embargo, la secuenciación de la región control del cachalote (*Physeter macrocephalus*) (Dillon & Wright, 1993) demostró que muchos de los bloques conservados que se habían descrito anteriormente, no lo eran en esta especie, sugiriendo que no eran fragmentos esenciales para el funcionamiento del ADNmt. Árnason *et al.* (1993c), en un estudio en el que compararon las regiones D-loop de 11 especies de misticetos y 2 especies de odontocetos, comprobaron que la mayoría de las diferencias entre misticetos para esta región se encontraban entre las posiciones 1 y 171, habiendo numerosas diferencias en la longitud de la secuencia entre las bases 118 y 170. A partir de la base 172 las secuencias eran casi idénticas aunque a algunas especies les faltaba un fragmento de 11 bases alrededor de la 290. Las dos especies de odontocetos diferían de las de misticetos y además las diferencias entre ellas dos eran grandes en comparación con las diferencias entre especies de misticetos.

La región altamente variable del extremo 5' de la hebra ligera de la D-loop es la que se suele utilizar en los estudios filogenéticos ya que permite la distinción de especies o individuos genéticamente muy cercanos.

1.3.2. Los genes COI y NADH5

La región más estudiada del genoma mitocondrial de los cetáceos es, como ya se ha mencionado, la región control. Apenas se han secuenciado otros genes. Tan sólo de tres especies, el rorcual azul, el rorcual común y el cachalote, se conoce la secuencia completa del ADNmt (Árnason *et al.*, 1991a; Árnason & Gullberg, 1993, Árnason *et al.*, 2000) y en algunas especies (p. ej. el delfín de Commerson y el cachalote) se han secuenciado también total o parcialmente algunos ARNt, el 12S y el 16S ARNr, el NADH3, el NADH5, el COI o el citocromo *b* (Southern *et al.*, 1988; Árnason *et al.*, 1993a).

La inmensa mayoría de los estudios que utilizan el ADNmt en cetáceos se basan en la comparación de la región D-loop, aunque en algunos se ha empleado también la secuencia del citocromo *b*, sobre todo para establecer relaciones filogenéticas entre especies (Rosel *et al.*, 1994; Siemann, 1994; Árnason & Gullberg, 1994; Rosel *et al.*, 1995b; Árnason & Gullberg, 1996; LeDuc *et al.*, 1999; Yoshida & Kato, 1999; Yang *et al.*, 2002b).

En ocasiones, cuando se establece una filogenia con métodos genéticos se producen conflictos con taxonomías establecidas previamente, generalmente por métodos morfológicos. Cuando esto sucede es recomendable comparar el árbol filogenético obtenido para un determinado gen con el que resulta analizando otros genes (LeDuc *et al.*, 1999). En el caso de los cetáceos, sin embargo, esto no siempre es posible debido a la mencionada falta de descripción de la mayoría de genes del ADNmt. Además, la utilización de otros genes permite aprovechar la información que proporcionan los distintos grados de divergencia que tienen los genes del ADNmt (López *et al.*, 1997).

Con la finalidad de ampliar los conocimientos sobre el genoma mitocondrial del orden Cetacea y poner a disposición de futuros trabajos de investigación una base de datos que permita la comparación entre especies, en este trabajo se propone la secuenciación de dos genes mitocondriales escasamente utilizados hasta el momento en cetáceos, el COI y el NADH5.

El COI (citocromo c oxidasa subunidad 1) y el NADH5 (nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa subunidad 5) son genes codificantes para péptidos del ADNmt y se encuentran entre los genes ARNt^{Tyr} y ARNt^{Ser} y los genes ARNt^{Leu} y NADH6, respectivamente. En un estudio comparativo de las secuencias del ADNmt del rorcual común y el rorcual azul, la diferencia nucleotídica entre las regiones control de ambas especies fue del 6,4%, mientras que las regiones COI y NADH5 se diferenciaron en un 7,4 y un 8,4% respectivamente (Árnason & Gullberg, 1993). Estas últimas son, por tanto, zonas más variables.

Según los estudios de variabilidad del ADNmt del delfín listado (*Stenella coeruleoalba*), realizados por García-Martínez *et al.* (1995), los genes del complejo NADH y el COI concentran la mayor parte de los lugares polimórficos por lo que, sobre todo, el COI sería más indicado para los estudios de variabilidad genética en poblaciones de cetáceos que la región control.

En general, se cumple para la mayoría de las especies de mamíferos, que los genes del complejo NADH presentan las tasas de evolución más elevadas del genoma mitocondrial, mientras que las del gen COI son de un valor intermedio entre aquellos y los genes más conservados (López *et al.*, 1997).

1.4. Antecedentes de los estudios genéticos en cetáceos utilizando ADNmt

En 1989 se celebró en La Jolla, California, una reunión de trabajo de la Comisión Ballenera Internacional (IWC) en la que se trató la aplicación de las técnicas de análisis genético al estudio de los cetáceos. Se discutió la idoneidad de los métodos existentes en ese momento para abordar diversos aspectos como pueden ser la estima del tamaño efectivo y total de una población, el reconocimiento individual, la organización social, la endogamia, la paternidad, la determinación del sexo, la variación genética inter e intrapoblacional o la migración (Hoelzel (ed.), 1991).

Hasta ese momento se habían realizado varios estudios, aplicando diversas técnicas, de la variación genética dentro y entre poblaciones, y de la migración de diferentes especies de cetáceos (calderones, orcas y varias especies de rorcuales, delfines y marsopas). Estas técnicas se basaban sobre todo en análisis isoenzimáticos y cariotípicos, estudios del ADNmt comparando patrones de fragmentos de restricción generados por

endonucleasas (RFLP) y análisis del ADN nuclear utilizando regiones repetitivas o satélite. También se empezaba ya a utilizar técnicas de secuenciación que, como se reconoció en la reunión, daban una mayor resolución pero eran mucho más caras y consumían mucho tiempo (Hoelzel (ed.), 1991).

Actualmente los métodos más empleados en cualquier estudio genético son la secuenciación del ADNmt (sobre todo de la región D-loop) para la determinación de la estructura de las poblaciones, la identificación de especies, etc., y los análisis de ADN nuclear, mediante la amplificación de *loci* microsátélites, para la identificación individual o de las relaciones de parentesco, haciendo uso en ambos casos de la PCR como herramienta fundamental.

1.4.1. Estudios de estructuración genética en poblaciones de cetáceos

Uno de los primeros trabajos de estudio de la estructura poblacional en cetáceos, utilizando datos de secuencias de ADNmt, fue el realizado en por Baker *et al.* (1993). En él se analizó la región control o D-loop de 90 individuos que representaban seis subpoblaciones de tres áreas oceánicas distintas, Atlántico Norte, Pacífico Norte y océanos meridionales. La diversidad nucleotídica para la totalidad de las poblaciones fue de un 3%, siendo la diversidad en las poblaciones del Atlántico y de los océanos meridionales un 82% y 76%, respectivamente, de la diversidad total. También, dentro de las diferentes subpoblaciones, hubo una elevada variación genética, excepto para las de Hawaii y el sudeste de Alaska donde se determinó un único haplotipo para 7 y 5 muestras, respectivamente. Estos investigadores concluyen que, a pesar de la intensa explotación a la que ha sido sometida esta especie, la mayoría de las poblaciones no han sufrido una pérdida de diversidad genética importante.

Otro estudio sobre yubartas, aunque utilizando en este caso muestras tomadas en diversas zonas de alimentación del Atlántico Norte y del Antártico, fue realizado por Palsbøll *et al.* (1995). La diversidad nucleotídica para la totalidad de la muestra fue de un 2,6%. Para cada una de las poblaciones los valores de diversidad fueron muy similares a la total, a excepción de la población de Islandia cuya diversidad fue tres veces menor. Se encontraron también diferencias genéticas significativas entre las poblaciones de la Antártida, de Islandia y del resto del Atlántico Norte, a pesar de que no existen barreras geográficas que separen Islandia del resto de zonas de alimentación del Atlántico Norte. Al parecer la segregación entre estas dos poblaciones se mantiene debido a un mecanismo de fidelidad hacia las zonas de alimentación dirigido maternalmente. Es decir, que el comportamiento puede influir en la estructura de una población a una escala de tiempo evolutiva. Contrariamente, en zonas de reproducción del Pacífico Norte, Medrano-González *et al.* (1995) encontraron una diversidad nucleotídica media menor (0,89%) en tres poblaciones de México y 0,63% en una población de Hawaii. Además, detectaron un grado de subdivisión geográfica significativa entre estas zonas de reproducción e incluso entre las poblaciones costeras e insulares de México.

Finalmente un estudio sobre los movimientos migratorios de las yubartas que durante el invierno austral se encuentran en Brasil, basado en la secuenciación de la región control del ADNmt (Engel *et al.*, 1999), indica que estos animales podrían alimentarse en aguas antárticas, a pesar de que, hasta el momento, esto no se haya podido constatar por fotoidentificación.

Sobre la familia Phocoenidae se han realizado también numerosas investigaciones utilizando la secuenciación del ADNmt. Mediante esta técnica, Rosel *et al.* (1995b) analizaron las relaciones filogenéticas entre las 6 especies de marsopas. Los datos de ADNmt indicaron que la marsopa sin aleta (*Neophocaena phocaenoides*) constituye el linaje más antiguo dentro de la familia Phocoenidae y que la reclasificación morfológica reciente de la marsopa de anteojos (*Australophocaena dioptrica*) en la subfamilia

Phocoenoidinae, no tiene una justificación genética. Además, esta especie debería ser de nuevo incluida en el género *Phocoena* tal como lo estuvo en un principio.

La ausencia de haplotipos compartidos y los altos niveles de divergencia en las secuencias en poblaciones de marsopa común (*Phocoena phocoena*) de tres cuencas oceánicas indica que, las poblaciones del Pacífico Noreste, el Atlántico Norte y el Mar Negro están reproductivamente aisladas (Rosel *et al.*, 1995a). Dentro de la cuenca pacífica se detectaron diferentes grupos de haplotipos sugiriendo una subdivisión en la población, a pesar de que se mantiene un cierto grado de flujo génico entre ellos. Puesto que esta especie se ve afectada por una elevada mortandad, debida a las interacciones con actividades pesqueras comerciales en toda su área de distribución, las distintas poblaciones regionales deberían ser tratadas de forma independiente en el momento de establecer estrategias para su conservación. También en el Atlántico Norte se ha comprobado que la marsopa común no forma una única población panmíctica sino que existen al menos tres poblaciones que deberían ser manejadas como unidades distintas (Rosel *et al.*, 1999). Así pues, los estudios genéticos proporcionan información útil para definir las unidades mínimas de manejo en la aplicación de un plan de conservación.

Con esa finalidad se realizó también un estudio de la estructura de la población de marsopa común en aguas noruegas, donde esta especie se ve afectada por las pesquerías de salmón. Se observó que las hembras podían clasificarse en grupos genéticos distintos acordes a su procedencia geográfica, mientras que los machos resultaron menos filopátricos (Tolley *et al.*, 1999).

Una variabilidad genética extraordinariamente baja ha sido descrita para otra especie de marsopa, la vaquita (*Phocoena sinus*). Esta marsopa es una de las especies de cetáceos menos comunes y más amenazadas. Su rango de distribución es el más restringido de todas las especies de cetáceos marinos y se limita a la parte alta del Golfo de California. En un estudio genético realizado sobre 43 individuos, Rosel & Rojas-

Bracho (1999) comprobaron que todos presentaban la misma secuencia de D-loop del ADNmt. Esta falta de variabilidad junto al hecho de que la población está estimada en tan sólo 567 animales hace que la vaquita sea vulnerable a problemas genéticos asociados a la endogamia, lo que aumenta su riesgo de extinción.

En el Sudeste Asiático, la marsopa sin aleta es también una especie amenazada ya que, al ser de hábitos costeros, es susceptible a ser capturada en artes de pesca, a la interacción con embarcaciones, a la contaminación ambiental y a la pérdida de hábitat. Con el fin de conocer su estructura poblacional se han llevado a cabo varios estudios genéticos secuenciando la D-loop del ADNmt. Estos trabajos indican diferencias moleculares significativas entre las marsopas sin aleta de Corea y China (Curry *et al.*, 1999) y dentro de la población china, diferencias entre los animales muestreados en el Mar Amarillo, el Mar del Sur y el río Yangtzé (Yang *et al.*, 2002a).

En el caso de los cachalotes, la secuenciación de la región control del ADNmt puso de manifiesto una diversidad genética seis veces menor que la de las yubartas y siete veces menor que la de las marsopas. Como no se encontraron indicios de una tasa de sustitución menor en el ADNmt del cachalote que la de las otras especies, la explicación para esta diversidad tan baja podría ser un cuello de botella que sufrió el tamaño de la población coincidiendo con las glaciaciones del Pleistoceno tardío. La bajada de las temperaturas disminuyó la disponibilidad de alimento, sobre todo para las hembras y las crías que no son capaces de migrar tanto como los machos a aguas frías (Lyrholm *et al.*, 1996).

Otro estudio realizado con muestras de cachalote procedentes de tres océanos distintos; Pacífico, Atlántico e Índico; mostró que los miembros de un mismo grupo están relacionados formando una estructura matrilineal. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre las poblaciones de los tres océanos indicando una falta de variación genética en esta especie a nivel mundial (Dillon, 1997).

Resultados similares fueron obtenidos por Mesnick *et al.* (1998) con muestras de cachalote del Golfo de California, el Pacífico Norte oriental y el Pacífico Norte central. Los grupos del Golfo de California están compuestos por 2-3 matrilineas que viajan juntas y no forman una única población, pero a nivel global no existen evidencias de una estructuración geográfica.

Siemann (1994) secuenció la región D-loop y el citocromo *b* del ADNmt de 59 individuos de calderón común (*Globicephala melas*) procedentes de varias poblaciones del Atlántico Norte muestreadas a lo largo de varios años. Cincuenta y cinco de estos individuos presentaron exactamente la misma secuencia en la región D-loop y tan sólo cuatro individuos, muestreados en Terranova y Nueva Escocia, difirieron en una y dos bases, respectivamente, del haplotipo más común. Estos resultados sugieren que las poblaciones orientales y occidentales del Atlántico Norte no están genéticamente aisladas y que existe una única población. Según la autora, esta variabilidad inusualmente baja puede ser el resultado del sistema social matriarcal de los calderones. En el estudio incluyó también 13 individuos de calderón tropical (*Globicephala macrorhynchus*), 11 procedentes del Atlántico Norte y dos procedentes del Pacífico. De nuevo los resultados indicaron una variabilidad muy baja siendo iguales todas las secuencias de los animales atlánticos y diferenciándose de los animales del Pacífico en tan sólo una y dos bases respectivamente. Las secuencias del citocromo *b* fueron idénticas dentro de los grupos de calderón común, calderón tropical atlántico y calderón tropical pacífico. Sin embargo, para el delfín mular (*Tursiops truncatus*) los resultados fueron muy distintos. Los 11 individuos secuenciados tuvieron todos haplotipos de región control distintos y su diversidad nucleotídica fue del 1,25%, lo que representa una diversidad unas 41 veces mayor a la del calderón común (0,03%) y 25 veces mayor a la del calderón tropical (0,05%).

Otra especie que tiene estructura matrilineal es la orca. En el Pacífico Norte oriental, desde California hasta Alaska, existen dos poblaciones aparentes que viven en

simpatría y que se diferencian en su comportamiento social y de alimentación. La población residente se alimenta de pescado mientras que la transeúnte basa su alimentación en otros mamíferos marinos. La variación genética dentro de cada una de las poblaciones es baja comparada con otras especies de cetáceos pero entre ellas existe una diferenciación genética significativa y un intercambio genético reducido (Hoelzel *et al.*, 1998).

Existen más casos en los que poblaciones distintas de una misma especie viven en simpatría y en los que los análisis genéticos pueden determinar si esas poblaciones pueden alcanzar el grado de subespecies o incluso de especies distintas. Uno de estos casos es el del delfín común (*Delphinus delphis*). Frente a las costas de California cohabitan dos morfotipos de delfín común cuya principal diferencia morfológica es la longitud del hocico. Rosel *et al.* (1994) realizaron un estudio comparativo de la región control y del citocromo *b* del ADNmt de ambos morfotipos y hallaron mutaciones características que los diferenciaban genéticamente. La diversidad nucleotídica en la región control fue de un 2,1% para la totalidad de las muestras y de un 1,8% y un 1,2% para las poblaciones de hocico corto y largo respectivamente. La divergencia media entre secuencias de muestras de los dos morfotipos presentes en California fue de un 1,09%. En el análisis cladístico, los individuos pertenecientes al morfotipo de hocico largo formaron un grupo totalmente aparte al de los especímenes de hocico corto y la divergencia genética entre las dos poblaciones simpátricas de California fue unas 50 veces mayor que la divergencia entre poblaciones de delfín común de hocico corto separadas miles de kilómetros (Océano Pacífico y Mar Negro). Estos autores postularon que ambos morfotipos estaban reproductivamente aislados y que podrían representar especies separadas. Desde entonces el morfotipo de hocico largo se considera una especie distinta a la de hocico corto y se le ha denominado *Delphinus capensis*.

Algo similar ha sucedido con el delfín mular (*Tursiops truncatus*). A pesar de que se considera que el género *Tursiops* está formado por una única especie, existen marcadas

diferencias morfológicas entre animales costeros y animales oceánicos a nivel mundial. La secuenciación de la región control del ADNmt de individuos pertenecientes a ambos morfotipos del Atlántico Norte occidental y el Golfo de México, reveló la existencia de diferencias nucleotídicas fijas entre ambos. El análisis de parsimonia indicó la separación de las dos formas en grupos distintos. Estos datos, junto con la información sobre la morfología y la ecología de la especie, establecen que existen diferencias al nivel de especie entre las formas costera y oceánica, denominándose la primera *Tursiops aduncus* (Curry, 1997). Es más, en China, donde ambos morfotipos viven en simpatria, Wang *et al.* (1999) calcularon la diversidad nucleotídica para la forma *truncatus* (1,9%) y para la forma *aduncus* (1,6%) y la divergencia entre ambas (4,4%). Ésta resultó ser unas cuatro veces mayor que la existente entre las dos posibles especies de delfín común, mencionadas anteriormente, lo que indica que los linajes de *Tursiops* divergieron mucho antes que los de *Delphinus*, hace unos 6,6-11 millones de años, dando aún mayor apoyo a la hipótesis de que los dos morfotipos de delfín mular representan especies separadas.

Utilizando como referencia las secuencias del D-loop del ADNmt de ambas especies de delfín mular ya publicadas, Möller & Beheregaray (2001) determinaron que dos poblaciones costeras de delfín mular del sudeste de Australia, que hasta el momento se habían considerado de la especie *Tursiops truncatus*, pertenecían en realidad a la especie *Tursiops aduncus*.

La aplicación de estudios genéticos han permitido también evaluar en qué grado una elevada mortandad puede afectar a una población y estimar la evolución futura de la misma. Un ejemplo claro de estudios de este tipo es el que se realizó con el delfín de Héctor (*Cephalorhynchus hectori*), una especie endémica de las costas de Nueva Zelanda, de población muy reducida y amenazada por la mortalidad accidental relacionada con las actividades pesqueras. Pichler *et al.* (1998) secuenciaron 360 pares de bases (pb) de 34 individuos y vieron que los 11 haplotipos resultantes formaban tres grupos en concordancia con las tres zonas geográficas muestreadas, la Isla del Norte y las costas este

y oeste de la Isla del Sur. Un análisis posterior de Pichler & Baker (2000) en el que se comparaba la diversidad genética de muestras contemporáneas y muestras históricas de 1870, demostró que la población de la Isla del Norte se había reducido de, al menos, tres linajes a tan sólo uno. Esto, junto a su reducido tamaño y aislamiento reproductivo hace que esta población esté al borde de la extinción. También la diversidad de la población de la costa este de la Isla del Sur se había reducido considerablemente y es posible que esta diversidad se pierda por completo en los próximos 20 años.

Asimismo, Dizon *et al.* (1994) realizaron un estudio sobre una especie que también está sometida a intensas capturas accidentales ocasionadas por redes de deriva, el delfín sin aleta boreal (*Lissodelphis borealis*). Sin embargo, se desconocía el impacto real de estas capturas sobre la especie, ya que se sospechaba de la existencia de dos poblaciones distintas, una costera y una oceánica. La comparación genética de muestras de animales capturados en alta mar en el Pacífico y de muestras obtenidas en las costas de California no dio evidencias estadísticas de una estructuración geográfica.

No sólo las especies matrilineales, aquellas poco abundantes o cuya población ha sufrido un declive, presentan bajos niveles de variabilidad sino que estos pueden indicar también que la especie ha sufrido un cuello de botella histórico, previo a la intervención humana. Este es el caso del calderón de hocico boreal (*Hyperoodon ampullatus*). Dalebout *et al.* (2001) estudiaron dos poblaciones de este cetáceo del Atlántico Norte occidental (The Gully, frente a las costas de Nueva Escocia y el Estrecho de Davis). Ambas poblaciones resultaron ser genéticamente distintas, con bajos niveles de intercambio entre las dos regiones, presentando la especie una muy baja diversidad nucleotídica (0,15%). En el caso de The Gully, estos valores bajos podrían explicarse por un tamaño de población muy pequeño, pero las actividades balleneras no son una explicación suficiente para la baja diversidad en el Estrecho de Davis. Es más probable que la baja diversidad sea una característica común para toda la especie y sea debida a un cuello de botella,

posiblemente asociado a una restricción del rango de distribución durante las últimas glaciaciones hace unos 18.000 años.

Hay casos en los que la preferencia por un hábitat determinado influye mucho más en la estructura genética de una población que la existencia de varios morfotipos de una misma especie. Para el delfín de hocico largo (*Stenella longirostris*) se han definido cuatro subespecies atendiendo a diferencias morfológicas. Sin embargo, la variación genética no siempre está correlacionada con la morfología. Por el contrario, se ha observado que existe un alto nivel de flujo genético entre morfotipos diferentes que habitan aguas pelágicas y que los animales que habitan islas o aguas someras, se han aislado de igual forma que lo han hecho animales procedentes de océanos distintos (Garrison, 1999).

En el suborden misticetos, las ballenas francas también han sido sometidas a varios análisis genéticos. A pesar de que no existen evidencias morfológicas claras, se acepta la existencia de dos especies, la ballena franca del hemisferio norte (*Eubalaena glacialis*) y la ballena franca del hemisferio sur (*Eubalaena australis*), ya que sus hábitos migratorios en cada hemisferio son considerados una barrera al flujo genético. En un estudio de Rosenbaum *et al.* (2000a), que incluyó poblaciones representativas de ambas especies de las tres principales cuencas oceánicas, se puso de manifiesto no sólo que las ballenas francas del norte y del sur son genéticamente distintas, sino que además existe un tercer linaje maternal que hace que *E. glacialis* del Pacífico Norte esté genéticamente más cercano a *E. australis* que a *E. glacialis* del Atlántico Norte. Los autores recomiendan que estos datos sean tenidos en cuenta en futuras revisiones taxonómicas de este grupo y que se adopte el nombre de *Eubalaena japonica* para la ballena franca del Pacífico Norte. Además, la comparación de los datos obtenidos de muestras recientes con datos de muestras históricas indicó que los animales del hemisferio norte han sufrido una considerable reducción en su diversidad genética, debido a la fuerte caza comercial a la que esta especie ha sido sometida. Tal y como indican los resultados de otro estudio

llevado a cabo por Rosenbaum *et al.* (2000b), en el Atlántico Norte occidental, esta reducción ocurrió antes de finales del siglo XIX, ya que la mayoría de la diversidad de linajes maternos que estaba presente en ese momento aún se conserva, gracias a las últimas seis décadas de protección de la especie.

Malik *et al.* (2000) realizaron un trabajo con muestras de ballena franca de ambos hemisferios del Atlántico y también constataron la existencia de una diferencia genética entre las dos especies, además de dos grupos genéticamente distintos en el Atlántico Sur a pesar de que todos los individuos se muestrearon en aguas de la Península de Valdés. Es posible que en esta zona confluyan dos poblaciones distintas durante los meses de junio a diciembre. La diversidad nucleotídica para los animales del hemisferio norte fue de un 0,6% mientras que en el hemisferio sur fue de un 2%, lo que es consistente con los datos de pérdida de variabilidad genética que han sufrido las ballenas francas del norte.

Dentro del género *Balaenoptera*, Bakke *et al.* (1996) no observaron una estructura poblacional correlacionada con el origen geográfico de muestras de rorcual aliblanco (*Balaenoptera acutorostrata*) del Atlántico Norte, utilizando secuenciación del ADNmt. Estos resultados contradicen los encontrados previamente mediante técnicas de análisis de ADN nuclear y que llevaron a la conclusión de que las distintas áreas de gestión de la Comisión Ballenera Intenacional correspondían a distintas poblaciones de rorcual aliblanco. La diversidad nucleotídica de la población del Atlántico Norte fue considerablemente menor a la de la población del Antártico (0,64% frente a 1,59%) y entre estas dos poblaciones sí se encontraron diferencias genéticas.

Para el rorcual tropical (*Balaenoptera edeni*) las secuencias de la región control indicaron que animales de Japón, del Océano Pacífico y las Islas Solomon habían divergido a niveles mayores que el de población, ya que las distancias genéticas entre ellas eran mayores que las que se habían descrito entre animales del Pacífico, el Índico y Suráfrica, que sí son poblaciones distintas. Incluso las secuencias del citocromo *b*

sugirieron que los rorcuales tropicales de las Islas Solomon podrían no pertenecer a esta especie (Yoshida & Kato, 1999).

Un estudio realizado tanto con datos de ADNmt como de ADN nuclear para el rorcual común por Bérubé *et al.* (1998) demostró que existía un grado significativo de divergencia entre los animales del Atlántico Norte / Mediterráneo y el Mar de Cortés. Sin embargo, el tiempo estimado de divergencia entre las dos poblaciones era menor al transcurrido desde la formación del istmo de Panamá por lo que ha habido un flujo genético ocasional entre el Pacífico Norte y el Atlántico Norte después de la separación de los dos océanos. Dentro de la población del Atlántico Norte / Mediterráneo, el ADNmt indicó también diferencias entre los animales del Mediterráneo, del Atlántico Norte oriental y del Atlántico Norte occidental.

1.4.2. Identificación de especies mediante técnicas moleculares

Los estudios genéticos no sólo son útiles para la determinación de la estructura de una población con diversos fines, sobre todo el de la conservación, sino que pueden utilizarse también para la identificación de especies. En cetáceos, las técnicas moleculares se han empleado principalmente en la identificación de especies poco conocidas pertenecientes a la familia Ziphiidae. Los miembros de esta familia son los más desconocidos dentro de los cetáceos. De las 20 especies que se reconocen en la actualidad, algunas de ellas son conocidas sólo por varamientos y la gran mayoría son difíciles de avistar debido a su distribución pelágica y sus hábitos elusivos (Gales *et al.*, 2002).

Henshaw *et al.* (1997) y Dalebout *et al.* (1998), utilizando animales varados o capturados accidentalmente en redes de pesca, secuenciaron un fragmento variable de la región control de casi la totalidad de las especies de zifios existentes, para construir una base de datos de referencia que permita la identificación de estos animales. En la base de

datos se incluyeron sólo aquellos especímenes examinados por expertos y de los que se disponían evidencias fotográficas u óseas para su identificación. Posteriormente se compararon las secuencias de otros animales que no se habían podido identificar de forma concluyente con esa base de datos y se comprobó que varios de ellos habían sido mal identificados, incluso uno de ellos podría ser una especie nueva (Dalebout *et al.*, 1999), lo que demuestra la gran utilidad del trabajo. Los autores establecieron las diferencias entre secuencias de una misma especie alrededor del 2% mientras que las secuencias de especies distintas generalmente divergían más de un 4,7%. La base de datos fue también utilizada para confirmar la identificación de un zifio de Gray (*Mesoplodon grayi*) y para identificar un zifio de Héctor (*Mesoplodon hectori*) que aparecieron en la costa oeste de Australia en el año 1999 (Gales *et al.*, 2002).

Puesto que el ADNmt es de herencia materna se utiliza además en la identificación de la especie materna en el caso de híbridos. Así, Árnason *et al.* (1991b) comprobaron que la hibridación entre rorcuales azules y rorcuales comunes podía producirse en cualquiera de las dos direcciones y que si el híbrido es macho, éste suele ser estéril, mientras que si el híbrido es hembra, puede ser fértil.

Para los híbridos entre marsopa común y marsopa de Dall (*Phocoenoides dalli*), en cambio, la especie materna es siempre la segunda (Willis, 1999).

Otra aplicación de las técnicas moleculares que utilizan el ADNmt, asimismo relacionada con la identificación de especies, es la que está llevando a cabo un grupo de investigadores en los mercados comerciales de Corea y Japón. Gracias a la identificación genética de lo que comercialmente se vende como "carne de ballena" se ha podido comprobar, entre otras cosas, que muchas de las especies que se venden no están en consistencia con los registros de capturas declarados a la Comisión Ballenera Internacional y que incluso son especies protegidas o delfínidos; que se están comercializando productos procedentes de la "caza científica"; que se vende de forma

ilegal e indocumentada carne procedente de animales varados o capturados accidentalmente en redes de pesca o que algunos productos han estado almacenados hasta 10 años (Baker & Palumbi, 1994; Baker *et al.*, 1996; Cipriano & Palumbi, 1999a y b; Dizon *et al.*(eds.), 2000).

1.4.3. Estudios de filogenia

El análisis del ADNmt también es utilizado para estudios de macroevolución. En este sentido, y desde el punto de vista morfológico, el orden Cetacea se subdivide en los subórdenes Mysticeti y Odontoceti. Los odontocetos (cetáceos con dientes) incluyen a los delfínidos, delfines de río, zifios y cachalotes, mientras que los misticetos (cetáceos con barbas) están constituidos por las ballenas francas, ballena gris, ballena pigmea y rorcuales (Barnes *et al.*, 1985).

Sin embargo, Milinkovitch *et al.* (1993) analizaron las secuencias de dos genes ribosómicos mitocondriales (12S y 16S) en 16 especies de cetáceos, entre los cuales incluyeron delfínidos, cachalotes y ballenas. Como grupo externo utilizaron, entre otros, las secuencias de la vaca y del ser humano. A tenor de sus resultados, propusieron que existe una relación más estrecha entre cachalotes y ballenas, que entre los primeros y el resto de los odontocetos. Así, establecieron que dentro de los misticetos, los linajes de los cachalotes y las ballenas debieron separarse hace unos 10–13 millones de años y que el linaje de las ballenas perdió la dentición que caracteriza a los odontocetos y la capacidad de ecolocalización. Comprobaron además que el grupo de los delfínidos era parafilético y que dentro de él, los zifios se unían a los delfínidos después del grupo formado por cachalotes y ballenas.

Contrariamente, Árnason & Gullberg (1994) revisaron las relaciones filogenéticas de los subórdenes misticetos y odontocetos mediante la secuenciación de 1.140 pb del

citocromo b y utilizando 14 especies que incluían a once misticetos, dos delfínidos y un cachalote. Como grupo externo utilizaron la secuencia de la vaca. Según sus resultados, la topología del árbol establece que los misticetos se agrupan de modo monofilético, mientras que los cachalotes están más alejados de las ballenas que de los delfínidos, aunque no se puede afirmar un origen monofilético para los odontocetos.

Todo ello ha generado una controversia, aún no resuelta, que propone tres hipótesis para las relaciones filogenéticas de las especies del orden Cetacea y que se ilustran gráficamente en la figura 1.2.

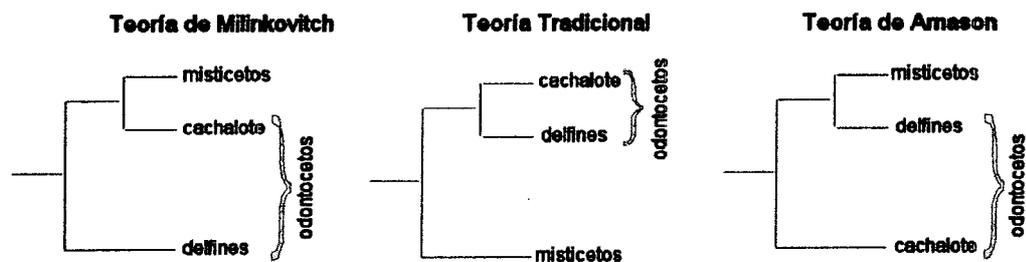


Figura 1.2. Las tres teorías sobre las relaciones filogenéticas en el orden Cetacea.

Para reafirmar su teoría, Milinkovitch *et al.* (1994) realizaron un nuevo estudio con los mismos genes que el primero, pero incluyendo un mayor número de especies para cada una de las familias, sosteniendo así su hipótesis de relación más estrecha entre cachalotes y ballenas. Arnason & Gullberg (1996) también reanalizaron sus resultados incrementando tanto la representación de las especies de cetáceos como de las especies utilizadas como grupo externo, sin poder resolver satisfactoriamente la disyuntiva.

Adachi & Hasegawa (1995) aportaron información adicional con el fin de discernir entre las tres posibles hipótesis, considerando la secuencia del citocromo *b* y once especies y combinaciones de ellas como grupo externo. Comprobaron que la topología del árbol filogenético era muy sensible a las especies utilizadas como grupo externo. De las 35 combinaciones realizadas, sólo obtuvieron 5 veces una topología como la de Árnason, 11 veces una topología que cumplía la hipótesis Tradicional y la topología de Milinkovitch en 19 ocasiones.

Sin embargo, la conjugación de información procedente del análisis de caracteres morfológicos y marcadores genéticos mitocondriales (citocromo *b*, 12S y 16S) dan un mayor soporte a la hipótesis tradicional, como demostraron Messenger & McGuire (1998). Por otro lado la combinación de marcadores mitocondriales y nucleares apoya la hipótesis de Árnason. Así, Gatesy *et al.* (1999) analizando la secuencia del exon 1 del gen IRBP (proteína retinoide interfotoreceptor), el factor von Willebrand y varios genes mitocondriales (citocromo *b*, 12S y 16S) y nucleares publicados previamente para varias especies de artiodáctilos y cetáceos, no detectan una relación monofilética entre cachalotes y ballenas.

Árnason *et al.* (2000) secuenciaron el ADNmt completo de cachalote y lo compararon con el del rorcual común y el rorcual azul (Árnason *et al.*, 1991a y Árnason & Gullberg, 1993) frente a artiodáctilos y otros mamíferos, para dar mayor soporte a sus resultados, encontrando que no existe la relación hermana entre Physeteridae y Balaenopteridae que postula la hipótesis de Milinkovitch.

1.5. Breve descripción de las especies incluidas en el estudio

SUBORDEN: ODONTOCETOS

FAMILIA DELPHINIDAE

GÉNERO *TURSIOPS*

1.5.1. Delfín mular - *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821)

Se trata de un delfín muy robusto. El tamaño oscila entre los 1,9 y 4 m según las poblaciones. En el caso de Canarias se ha constatado una longitud media de los machos adultos maduros de 310 cm y de las hembras de 284,3 cm. (Martín, 1998).

Tiene un melón bien diferenciado del morro, que es corto. La capa dorsal es gris oscura, siendo los flancos más claros. El vientre es de coloración gris clara, marfil o incluso rosada (Jefferson *et al.*, 1993). Los delfines mulares observados en Canarias parecen presentar una coloración más clara que aquéllos de la costa africana y el norte de Europa (Martín, 1998).



La aleta dorsal es ancha, triangular y ligeramente falcada en su parte superior y se halla aproximadamente a la mitad del eje longitudinal del cuerpo.

Figura 1.3. Delfín mular

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en aguas desde moderadamente frías hasta tropicales de todos los mares y océanos del planeta y ocupa hábitats tanto costeros como oceánicos (Jefferson *et al.*, 1993).

La presencia de esta especie en Canarias se conoce por varios estudios realizados desde 1989 hasta la actualidad. Suelen viajar formando grupos de menos de veinte animales. Las poblaciones más conocidas son las del sudoeste de Tenerife donde se ha estimado la presencia de unos 60 animales que podrían ser residentes de la zona (Martín, 1998) y la del sur y sudoeste de Gran Canaria, ampliamente estudiada durante los años 1999 y 2000 en el marco del proyecto *Apoyo a la conservación del delfín mular (Tursiops truncatus) y la tortuga boba (Caretta caretta) en Canarias (LIFE-B4-3200/97/247)*.

Esta especie está incluida en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (BOC, 2001/097) como "vulnerable", lo que significa que exige la redacción de un Plan de Conservación ya que, si los factores adversos que actúan sobre ella no son corregidos, corre el riesgo de entrar en la categoría de "en peligro de extinción".

GÉNERO *GLOBICEPHALA*

1.5.2. Calderón tropical - *Globicephala macrorhynchus* Gray, 1846

Existen grandes variaciones en cuanto a su tamaño entre las distintas poblaciones. En Canarias, la longitud media de los machos adultos y subadultos varados es de 456 cm, mientras que la de las hembras es 367,3 cm (Martín, 1998). Es de coloración oscura con una mancha más clara en forma de ancla en la zona pectoral, que discurre hasta el vientre y manchas claras alargadas detrás de los ojos y detrás de la aleta dorsal. Es característica su cabeza globosa y su aleta ancha en la base y baja en forma de gancho (Martín (ed.), 1990).

Figura 1.4. Calderón tropical

Son típicos de aguas oceánicas aunque en algunas zonas aparecen de manera habitual cerca de la costa. Se encuentran distribuidos en aguas tropicales, subtropicales y moderadamente cálidas de todos los océanos (Jefferson *et al.*, 1993).



Es una especie con una estructura social marcadamente matrilineal, en la que las manadas están formadas principalmente por hembras con sus crías y las cópulas tienen lugar entre miembros de distintas manadas (Martín, 1998).

En Canarias han sido catalogados mediante técnicas de fotoidentificación unos 500 individuos al sur de Tenerife, 300 de los cuales se consideran residentes (Hemlich-Boran, 1993). En aguas de Gran Canaria se han fotoidentificado por el momento 219 individuos distintos (Servidio, 2001).

Es la principal especie objeto del turismo de observación de cetáceos en el Archipiélago Canario, por lo que su amenaza más importante es el creciente desarrollo turístico y el tráfico marítimo.

Esta especie está incluida en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (BOC, 2001/097) como "vulnerable".

GÉNERO *DELPHINUS*

1.5.3. Delfín común - *Delphinus delphis* Linnaeus, 1758

Éste es un delfín relativamente esbelto y de forma muy hidrodinámica. Tanto su tamaño como su coloración es muy variable geográficamente.

Figura 1.5. Delfín común

La longitud media de los adultos oscila entre 1,7 y 2,4 m. El estudio de los animales varados en el Archipiélago Canario reveló longitudes medias de 212,6 cm para los machos adultos y 204,1 cm para las hembras adultas (Martín, 1998). Su coloración es muy característica lo que permite una fácil identificación. La capa dorsal es oscura mientras que la zona ventral es blanca.



En los flancos se puede diferenciar una zona anterior amarilla o color crema y una posterior gris clara separadas ambas por el dibujo en V que forma la capa dorsal bajo la aleta dorsal. Ésta última es alta y alargada (Jefferson *et al.*, 1993).

El delfín común habita aguas desde tropicales hasta moderadamente cálidas y prefiere aguas abiertas y profundas aunque también puede encontrarse en zonas costeras poco profundas. En Canarias la especie es abundante durante los meses de enero a mayo y forma grupos de una veintena de animales aproximadamente (Martín, 1998).

Esta especie está incluida en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (BOC, 2001/097) como "de interés especial", por lo que es merecedora de una atención particular, bien sea por su valor científico, ecológico o cultural o por su singularidad y exige la redacción de un Plan de Manejo.

GÉNERO *STENELLA***1.5.4. Delfín moteado atlántico - *Stenella frontalis* (Cuvier, 1829)**

Es el más robusto de los delfines del género *Stenella*. El delfín moteado atlántico puede alcanzar un tamaño de unos 2,3 m. Sin embargo los ejemplares estudiados en Canarias no superan los 195 cm. (Martín, 1998).

Figura 1.6. Ejemplares juveniles de delfín moteado.



Los animales adultos son muy fáciles de identificar por las manchas que cubren todo su cuerpo. Estas manchas son oscuras sobre fondo claro en la zona ventral y claras sobre fondo oscuro en la zona dorsal. Los animales juveniles, en cambio, tienen una coloración gris más uniforme lo que puede llevar a su confusión con ejemplares juveniles de delfín mular.

Esta especie se encuentra sólo en el Océano Atlántico, preferentemente en aguas cálidas, entre los 48°N y 24°S (Martin (ed.), 1990). En Canarias podemos encontrarla formando grandes grupos de hasta cientos de individuos a lo largo de todo el año, excepto en los meses de verano.

1.5.5. Delfín listado - *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833)

Los adultos tienen una longitud de entre 180 y 250 cm, siendo las longitudes medias de los animales varados en Canarias de 215 cm para los machos y 197,9 cm para las hembras (Martín, 1998). En cuanto a la coloración, la zona dorsal es oscura, los



flancos gris claro y la ventral blanca. La capa dorsal presenta una incisión más clara que llega hasta la aleta dorsal.

Figura 1.7. Delfín listado

La principal característica de la coloración de este delfín es una serie de listas oscuras que parten de la parte posterior del ojo y recorren el cuerpo longitudinalmente. Una de ellas llega hasta la zona anal, separando los flancos grises del vientre blanco, otra, que puede ser doble, llega hasta la aleta pectoral y una tercera más fina y corta, discurre paralela a la primera y llega aproximadamente hasta la altura de la aleta pectoral (Martín (ed.), 1990).

Se distribuye por aguas moderadamente cálidas hasta tropicales de todos los océanos y tiene preferencia por aguas oceánicas hallándose siempre fuera de la plataforma continental en caso de encontrarse cerca de la costa (Jefferson *et al.*, 1993). En Canarias puede observarse prácticamente todo el año formando grupos de unos 40-50 individuos.

Esta especie está incluida en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (BOC, 2001/097) como "de interés especial".

FAMILIA ZIPHIIDAE

GÉNERO *MESOPLODON*

1.5.6. Zifio de Gervais - *Mesoplodon europaeus* Gervais, 1855

Esta especie pertenece a una de las familias más desconocidas de cetáceos. En Canarias era conocida tan sólo por varamientos hasta el año 1998 cuando se realizó el



primer avistamiento frente a la costa noroeste de Tenerife (Carrillo & Martín, 1999).

La longitud media de los machos varados en Canarias es de 430 cm y la de las hembras de 437 cm. Su coloración dorsal es gris oscura y el cuerpo está comprimido lateralmente.

Figura 1.8. Zifio de Gervais

La cabeza es pequeña y cónica y la mandíbula inferior sobresale de la superior. Los dos dientes, típicos en esta familia, se encuentran en el extremo de la mandíbula inferior (Martín, 1998).

Su distribución se conoce principalmente en aguas de tropicales a moderadamente cálidas del Atlántico Norte y es de hábitos oceánicos (Martin (ed.), 1990).

FAMILIA PHYSETERIDAE

GÉNERO *PHYSETER*

1.5.7. Cachalote - *Physeter macrocephalus* Linnaeus, 1758

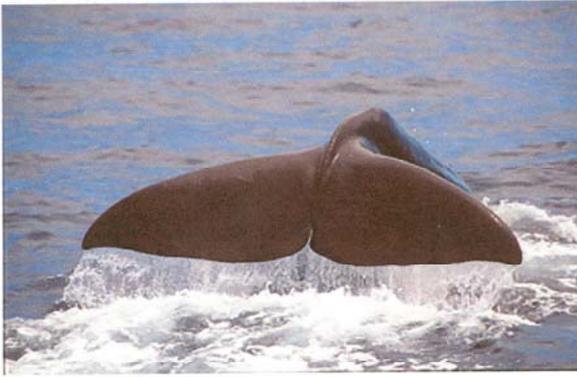


Figura 1.9. Aleta caudal de cachalote

Es la mayor especie de odontoceto. Los machos pueden alcanzar una longitud media de 15 m, mientras que las hembras son algo más pequeñas, unos 11 m de longitud media. Se distingue fácilmente por su enorme cabeza cuadrada que, en los machos, alcanza un tercio de la longitud total del cuerpo. Como todos los odontocetos posee un sólo espiráculo, que en esta especie se encuentra desplazado hacia el lado izquierdo y frontal de la cabeza. Es de coloración gris oscura con una mancha más clara en la zona ventral y alrededor de la boca. No tiene una aleta caudal marcada sino una serie de pequeñas jorobas a lo largo de la zona dorsal trasera (Martin (ed.), 1990).

Es capaz de sumergirse a profundidades superiores a los 1000 m durante periodos de tiempo que pueden alcanzar los 90 minutos.

Se encuentra distribuida en todos los océanos del mundo aunque durante las migraciones sólo los machos superan los 45° de latitud en ambos hemisferios.

Al igual que los calderones, los cachalotes tienen una estructura social matrilineal formando grupos de hembras maduras e individuos inmaduros de ambos sexos

relacionados matrilinealmente. Los machos abandonan sus grupos natales alrededor de los 6 años de edad (Richard *et al.*, 1996)

A pesar de ser una especie típica de océanos abiertos, en Canarias es frecuente encontrarla cerca de la costa gracias a las grandes profundidades existentes entre islas. Es relativamente abundante en el Archipiélago y está presente durante todo el año. Su población "base" o constante ha sido estimada en unos 3-24 a 459 individuos (André, 1997.)

Es una especie considerada "vulnerable" en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (BOC, 2001/097).

SUBORDEN: MISTICETOS

FAMILIA BALAENOPTERIDAE

GÉNERO *BALAENOPTERA*

1.5.8. Rorcual común - *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758)



Figura 1.10. Rorcual común

Es la segunda especie de cetáceo de mayor tamaño, después del rorcual azul. Las hembras son algo más grandes, con un tamaño corporal medio de 22,3 m frente a los 21 m de los machos. Su color es gris oscuro aunque la zona ventral y la

parte inferior de las aletas pectorales y caudal son blancas. Es fácil de distinguir de otras especies de rorcuales por la pigmentación asimétrica de la cabeza, siendo blanco el lado derecho de la mandíbula inferior (Jefferson *et al.*, 1993).

Se distribuye por todos los océanos, desde los trópicos hasta ambas regiones polares. Es de hábitos principalmente pelágicos pero en algunas zonas puede observarse también cerca de la costa (Martín (ed.), 1990). En Canarias es más abundante a finales de invierno y principios de primavera.

Esta especie ha sido el blanco de la caza comercial de ballena durante muchos años, lo que ha mermado considerablemente sus poblaciones en varios océanos (Bérubé *et al.*, 1998). En Canarias está incluida en el Catálogo de Especies Amenazadas (BOC, 2001/097) como "en peligro de extinción", lo que exige un Plan de Recuperación, ya que de seguir actuando los factores que causan su situación actual, su supervivencia es poco probable.

1.5.9. Rorcual tropical - *Balaenoptera edeni* Anderson, 1878

Rorcual de tamaño algo más reducido que el rorcual común. El tamaño medio de las hembras es de unos 14,5 m y el de los machos de 13,7 m (Martín (ed.), 1990). La coloración es gris oscura en todo el cuerpo y clara en la zona ventral. Se distingue de las demás especies de rorcuales por las tres crestas craneales (Jefferson *et al.*, 1993).



Esta especie puede encontrarse tanto en océano abierto como en aguas costeras, prefiriendo las temperaturas cálidas y no superando los 40° de latitud en ambos hemisferios (Jefferson *et al.*, 1993). Es la especie de rorcual más abundante en Canarias donde viene a alimentarse sobre todo en verano.

Figura 1.11. Cabeza de rorcual tropical en la que se aprecian las tres crestas craneales.

1.6. Objetivos del estudio

Los principales objetivos del presente estudio son:

- 1- Describir la estructura genética de 4 especies de cetáceos presentes en aguas del Archipiélago Canario, dos de ellas consideradas como residentes (delfín mular y calderón tropical) y dos como transeúntes (delfín común y rorcual tropical), mediante secuenciación de la región control del ADNmt.
- 2- Establecer las relaciones genéticas entre las poblaciones canarias y otras poblaciones de la misma especie descritas previamente en otras partes del mundo.
- 3- Describir la variación genética de dos genes del ADNmt (COI y NADH5) en nueve especies de cetáceos presentes en el Archipiélago Canario y definir, a través de ellos, las relaciones filogenéticas entre odontocetos y misticetos.
- 4- Aplicar la secuenciación de la región control con el fin de identificar ejemplares difíciles de clasificar por otras técnicas.





2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. *Obtención del material biológico*

Las muestras que se han utilizado en la elaboración de este trabajo proceden de dos fuentes distintas. Una ha sido la toma de biopsias de animales vivos en el mar y la otra a partir de animales que han quedado varados en las costas de las distintas islas del Archipiélago Canario durante los últimos años.

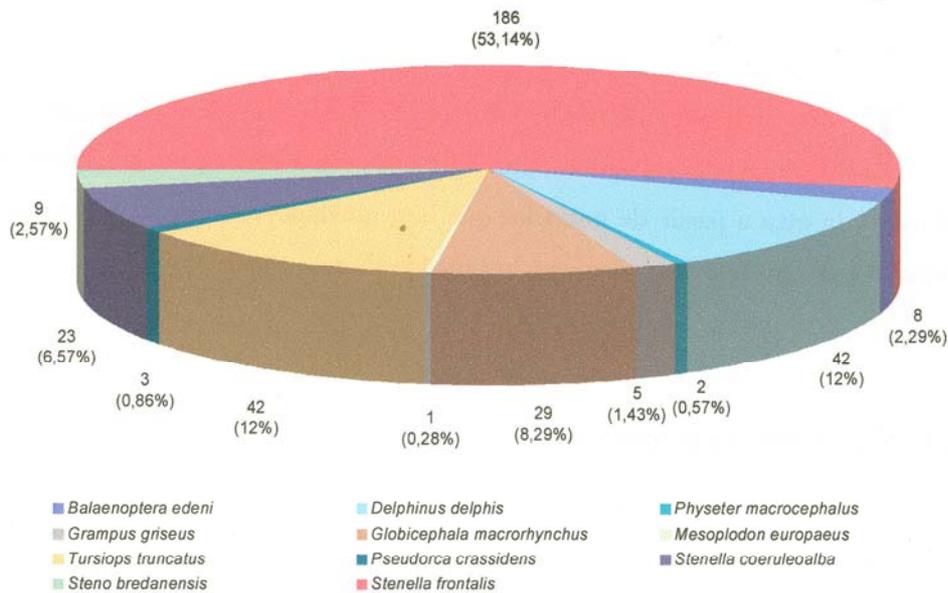
2.1.1. **Muestras de biopsias**

Entre los meses de enero de 1999 y junio de 2000 se llevaron a cabo campañas científicas en el Archipiélago Canario con la finalidad de estudiar sus poblaciones de cetáceos, haciendo especial hincapié en el delfín mular, en el marco del proyecto *Apoyo a la conservación del delfín mular (*Tursiops truncatus*) y la tortuga boba (*Caretta caretta*) en Canarias* (LIFE-B4-3200/97/247), financiado por la Unión Europea y la Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. Durante dichas campañas se realizó un esfuerzo total de 137 días navegados (917,9 horas) y 6529,5 millas náuticas recorridas, durante las cuales se tomaron 350 muestras de piel de 11 especies distintas de cetáceos (Figura 2.1.).

Cuando se avistaba un grupo de cetáceos, antes de tomar la biopsia, se procedía a la identificación de la especie y a una estima del tamaño del grupo. Además se observaba al grupo para determinar su comportamiento y su estructura social, así como su

composición por sexos y clases de edad. También se trataba de fotoidentificar el mayor número posible de los animales que componían el grupo.

Figura 2.1. Representación del número de biopsias de cetáceos tomadas en las campañas



durante los años 1999 y 2000, clasificadas por especies. En paréntesis aparece el porcentaje con respecto al número total de muestras (n=350).

Las muestras se tomaban disparando un dardo cilíndrico, de acero inoxidable y de 8 mm. de diámetro, 2,5 cm. de longitud y 3,8 g de peso (Ceta-Dart), desde la proa de una embarcación a motor de 13 m. de eslora, con una ballesta Panzer III de 125 lb. de potencia (Barnett International, Ltd.). Este dardo iba enroscado en una flecha de fibra de carbono (Ceta-Dart) que en su parte anterior llevaba un flotador de espuma de poliestireno de unos 3 cm. de diámetro que a la vez actuaba de tope para que la flecha no penetrara en el cuerpo del animal. Este flotador era el que hacía que, después del

impacto, la flecha rebotara en el cuerpo y quedara flotando en la superficie del agua (Figura 2.2.).

Esta técnica es muy similar a la utilizada por otros investigadores como Lambertsen (1987), Palsbøll *et al.* (1991), Weinrich *et al.* (1992), Clapham & Mattila (1993), Brown *et al.* (1994), Patenaude & White (1995), Gauthier & Sears (1999) o Hooker *et al.* (2001). Otros han utilizado ligeras variaciones como es disparar el dardo mediante un arco (Mathews *et al.*, 1988; Amos & Hoelzel, 1990), una escopeta (Winn *et al.*, 1973; Kasamatsu *et al.*, 1991; Kreutzen *et al.*, 1999) o un proyector de dardos (Barret-Lennard *et al.*, 1996; Bearzi, 2000).

Para recuperar la flecha se dirigía el barco hacia el lugar donde ésta permanecía flotando y se recogía con un salabre. Posteriormente se introdujo una modificación en el sistema que consistía en adaptar un carrete de nylon de pesca a la ballesta y atar la flecha con el nylon para una recuperación más rápida. Este método ha sido utilizado también por Lambertsen (1987) y Whitehead, *et al.* (1990). En un principio no se utilizó esta modificación por temor a que los animales pudieran quedar enredados en el nylon. No obstante, se comprobó que con el método usado inicialmente se perdía mucho tiempo, se corría el riesgo de perder la flecha, a la vez que los animales sufrían un mayor stress al maniobrar con el barco para llegar al lugar de la flecha.

En el interior del dardo hay unas pequeñas púas que sujetan la muestra una vez extraída, evitando que se pierda cuando la flecha flota en el agua. La muestra de piel y grasa extraída tenía normalmente el diámetro del dardo y medía de 0,5 a 1 cm. de longitud. Sin embargo, cuando la flecha no impactaba en sentido perpendicular al cuerpo del animal sino que incidía tangencialmente, la muestra era mucho más superficial, es decir, sin tomar apenas grasa y su longitud era variable.

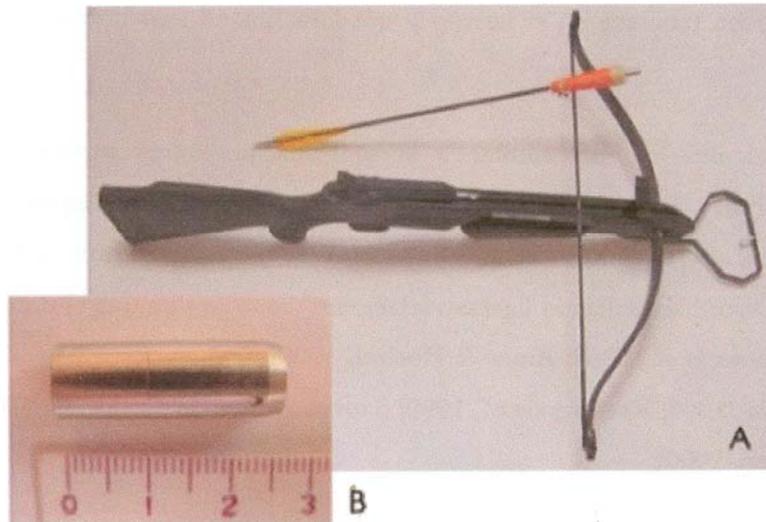


Figura 2.2. Material utilizado en la toma de muestras. A. Ballesta y flecha de fibra de carbono con flotador de espuma de poliestireno. B. Punta de biopsia de acero inoxidable.

Se procuraba siempre tomar la muestra del lomo, en la parte anterior a la aleta dorsal y de animales que se encontraban a menos de cuatro metros de la proa del barco, para evitar errar el disparo. Los animales muestreados eran siempre individuos adultos o juveniles con el fin de no molestar a las crías.

Siempre que era posible, se fotografiaba o se grababa en vídeo el animal del que se había tomado la muestra para poder identificarlo posteriormente.

En los momentos que seguían al disparo se evaluaba la reacción del animal. No se observó nunca ningún comportamiento fuerte de rechazo hacia la toma de biopsias, tal y como confirman también numerosas investigaciones realizadas con el mismo objetivo (Aguilar y Nadal, 1984; IWC, 1991; Brown *et al.*, 1991 y 1994; Weinrich *et al.*, 1991 y 1992; Clapham & Mattila, 1993; Barret-Lennard *et al.*, 1996; Gauthier & Sears, 1999; Hooker *et al.*, 2001). Existe un único caso recogido en la bibliografía en el que la

penetración de un dardo de biopsia en un delfín común tuvo consecuencias fatales. La muerte del animal se produjo unos minutos después de que el dardo quedara clavado en su cuerpo en lugar de rebotar. Análisis posteriores del cuerpo demostraron que la muerte no fue una consecuencia directa de la herida producida, ya que no fue muy profunda, por lo que se postuló que la causa pudo ser el estrés ocasionado por el incidente o por el posterior manejo del animal al intentar salvarlo (Bearzi, 2000).

Una vez recuperada la flecha, la muestra se extraía del dardo con unas pinzas esterilizadas y se almacenaba a temperatura ambiente en una solución sobresaturada de NaCl al 20% de dimetilsulfóxido (DMSO). Este producto incrementa la permeabilidad celular por lo que la sal, que actúa como conservante, actúa más rápidamente (Amos & Hoelzel, 1991). Los dardos se lavaban a conciencia con un cepillo y agua jabonosa para eliminar cualquier resto de muestra que pudiera quedar entre las púas y se esterilizaban con dietilpírocarbonato al 0.8% (v/v) y etanol 100% para su uso posterior. De esta forma se evitaba tanto la posible infección en los animales muestreados como la contaminación entre muestras.

Todos los datos referentes a la muestra tomada se anotaban en el estadillo que la Comisión Ballenera Internacional ha diseñado con el propósito de unificar la información relativa a muestras genéticas (Mesnick *et al.*, 1999). (Ver anexo IV).

Existen otros métodos para la obtención de muestras de piel de animales vivos que podrían resultar menos intrusivos. Por ejemplo, el utilizado por Whitehead *et al.* (1990) que consiste en adaptar un estropajo de nylon al final de la flecha y con él raspar superficialmente la piel del animal al dispararla o el utilizado por Harlin *et al.* (1999) en el que el estropajo se coloca en el extremo de un palo de madera y desde la proa de una embarcación neumática se raspa la piel de los animales que se acercan a la misma. Ambos sistemas fueron probados durante el periodo de toma de muestras de este trabajo. En el primer caso se comprobó que la proporción de disparos fallidos era muy alto, en

muchos casos irritaban a los animales y las veces que se conseguía raspar la piel de un animal, las cantidades obtenidas eran mínimas. El método del palo de madera no fue viable debido a la altura de la embarcación empleada. Así pues, ninguno de los dos métodos resultó ser eficiente y se optó por usar el sistema descrito con el fin de optimizar el tiempo y los recursos.

Otra fuente no intrusiva de muestras de piel para análisis genéticos es recoger la piel que algunas especies pierden de forma natural por el roce con el agua o con otros individuos del grupo (Amos *et al.*, 1992; Clapham *et al.*, 1993; Valsecchi *et al.*, 1998; Gendron & Mesnick, 1999), pero durante las campañas realizadas nunca se observó que hubiesen fragmentos de piel flotando en el área del avistamiento.

2.1.2. Muestras de necropsias

Las muestras procedentes de animales varados fueron aportadas tanto por la Sociedad para el Estudio de los Cetáceos en el Archipiélago Canario (SECAC), como por la Unidad de Histología y Anatomía Patológica Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Siempre que el estado de conservación y el tamaño del animal lo permitía, investigadores de estas instituciones tomaban como mínimo los datos biológicos básicos del animal como son: especie, medidas morfológicas, peso, sexo, estado de desarrollo, etc. y si era posible, el animal era sometido a una necropsia con el fin de obtener indicios sobre la causa de su muerte. Hasta el momento se han recolectado 118 muestras pertenecientes a animales de 14 especies diferentes de cetáceos (Figura 2.3.) que vararon en las costas canarias, entre los años 1991 y 2001. De estos animales se dispone de muestras de hígado o de piel que han sido conservadas a -80 °C.

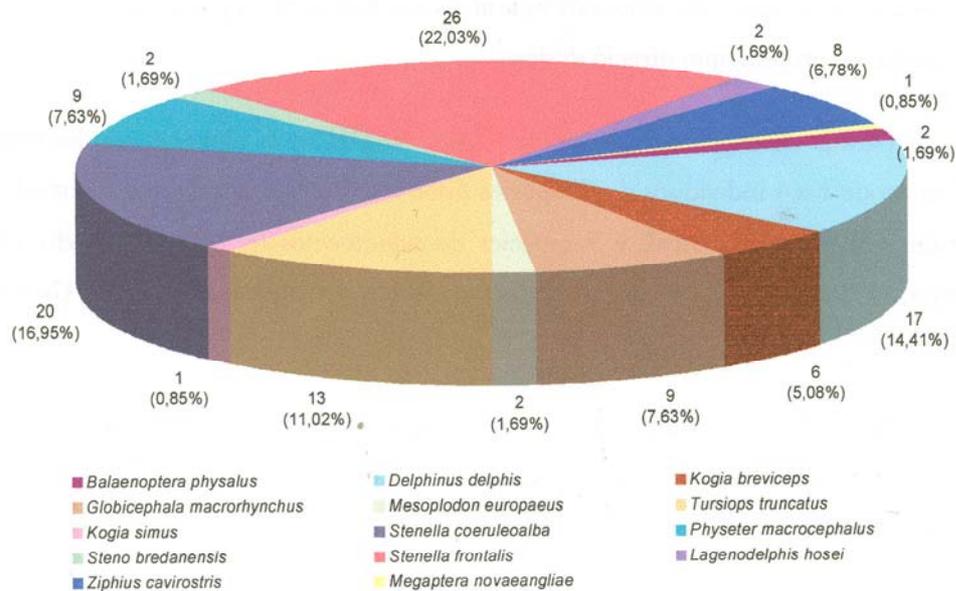


Figura 2.3. Representación del número de muestras de necropsias de cetáceos varados durante los años 1991 a 2001 clasificadas por especies. El número total de muestras es n=118.

2.2. Muestras utilizadas en la realización de este trabajo

El estudio de la estructura poblacional utilizando la secuenciación de la región D-loop se ha aplicado a cuatro especies, dos de ellas consideradas residentes en el Archipiélago Canario (el delfín mular y el calderón tropical) y dos consideradas transeúntes (el delfín común y el rorcual tropical).

La secuenciación de la región D-loop se ha utilizado también en la identificación genética de una especie de zifio, cuya clasificación taxonómica por observación directa y fotografía, en un principio ofreció dudas.

Para la descripción de los genes COI y NADH5 y la filogenia con los mismos se utilizaron de 1 a 4 individuos de 9 especies distintas, dos especies de misticetos (el rorcual común y el rorcual tropical) y 7 especies de odontocetos (el delfín moteado, el delfín común, el delfín listado, el delfín mular, el calderón tropical, el zifio de Gervais y el cachalote).

En las figuras 2.4 a 2.8. se ha representado la localización geográfica de todas las muestras utilizadas en el estudio. Una descripción exhaustiva de cada muestra puede consultarse en las tablas 3.4., 3.6., 3.11., 3.16. 3.17. y 3.21. del capítulo de resultados.

2.3. Extracción del ADN genómico de las muestras

Para la extracción del ADN total se siguió el método de Sambrook *et al.* (1989), mediante la digestión de 50 mg de tejido troceado (piel o hígado) en 600 µl de tampón de lisis (50 mM Tris pH=8, 100 mM EDTA pH=8, 1% (v/v) SDS, 20 µg/ml Rnasa y 100 µg/ml ProteinasaK), durante una noche a 50 °C y con agitación. El ADN se extrajo con 2 fenolizaciones (fenol equilibrado con Tris 0,5 M) y un lavado con cloroformo/isoamílico (24:1). Finalmente el ADN se precipitó de la fase acuosa con 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol al 100%. El sedimento de ADN resultante se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50 - 80 µl de TE 1X.

En el anexo II puede consultarse el protocolo detallado seguido para la extracción del ADN.

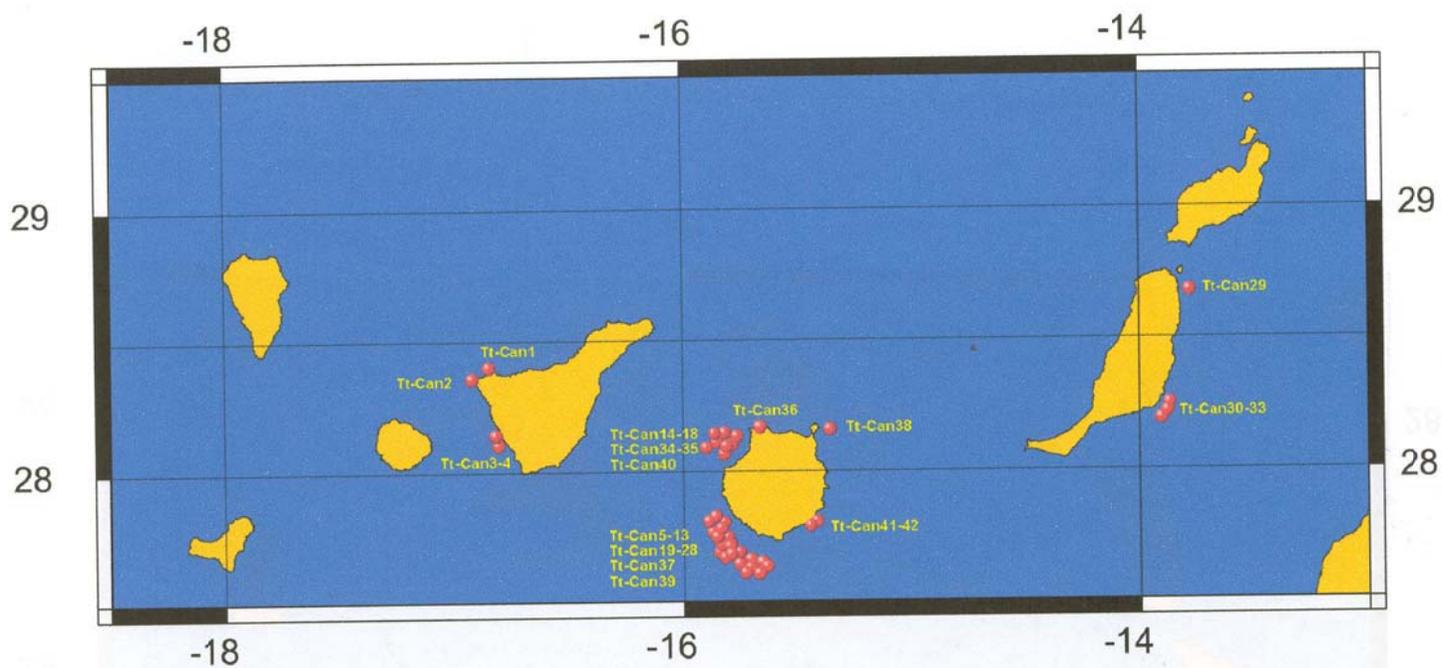


Figura2.4. Localización de las muestras de delfin mular analizadas en el presente trabajo.

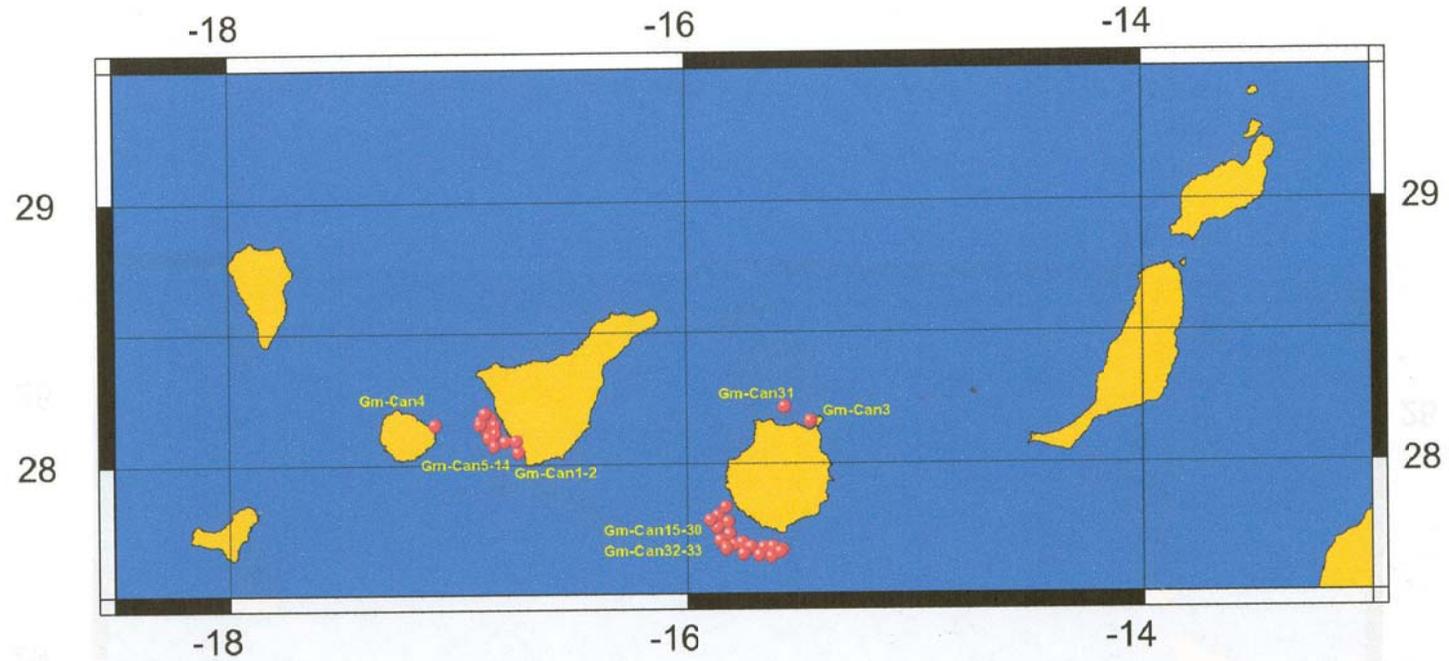


Figura2.5. Localización de las muestras de calderón tropical analizadas en el presente trabajo.

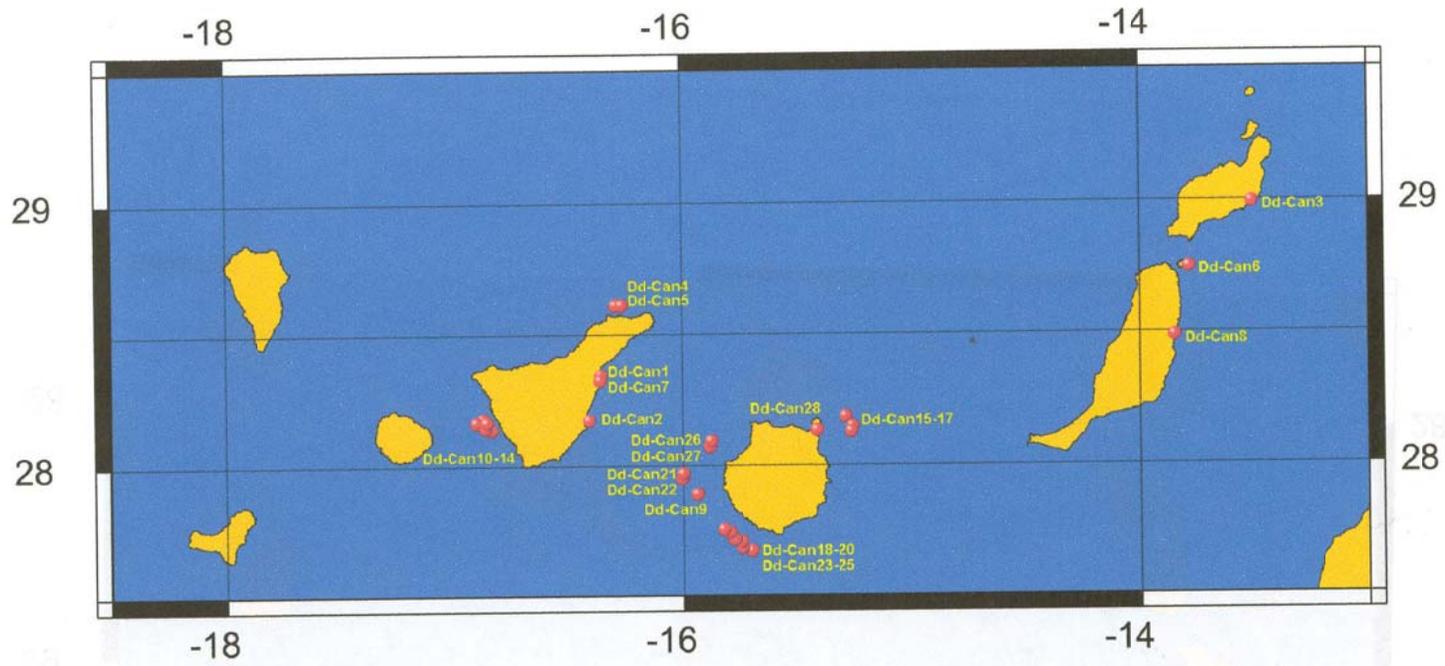


Figura 2.6. Localización de las muestras de delfín común analizadas en el presente trabajo.

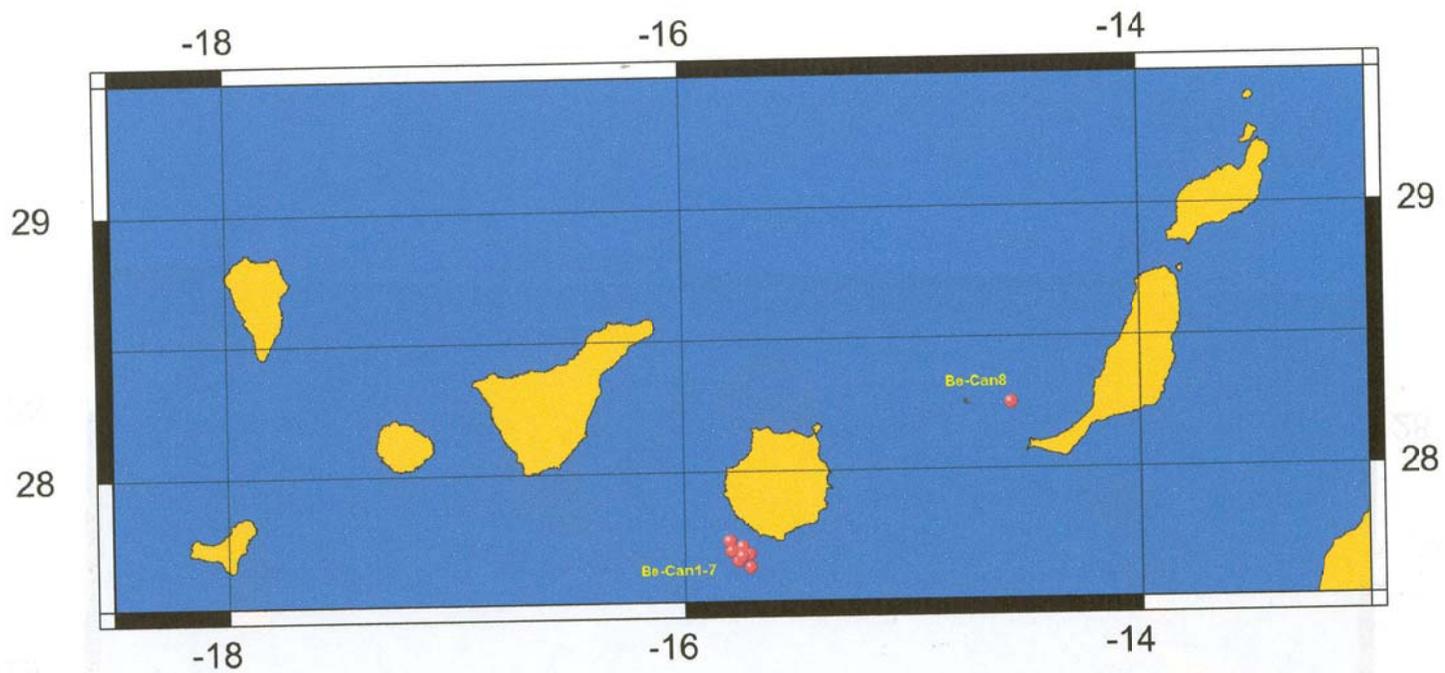


Figura 2.7. Localización de las muestras de rorcual tropical analizadas en el presente trabajo.

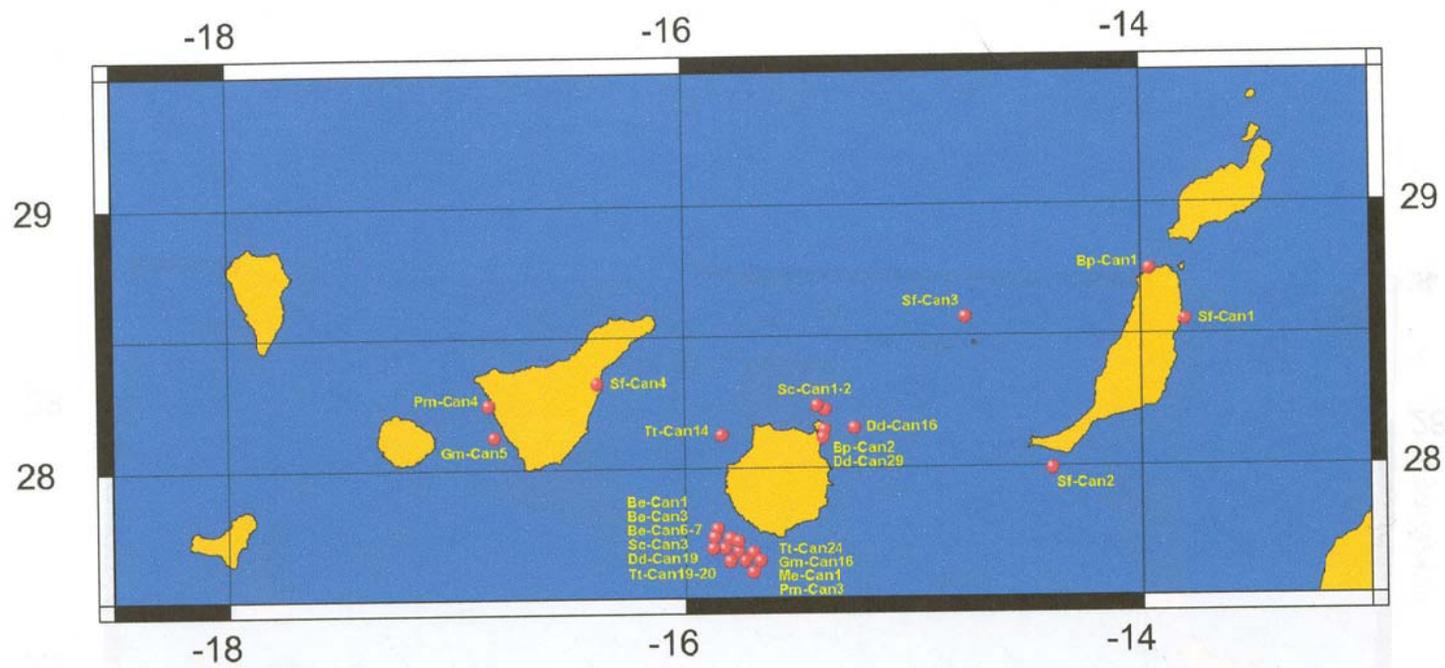


Figura 2.8. Localización de las muestras para las que se ha secuenciado el gen COI.

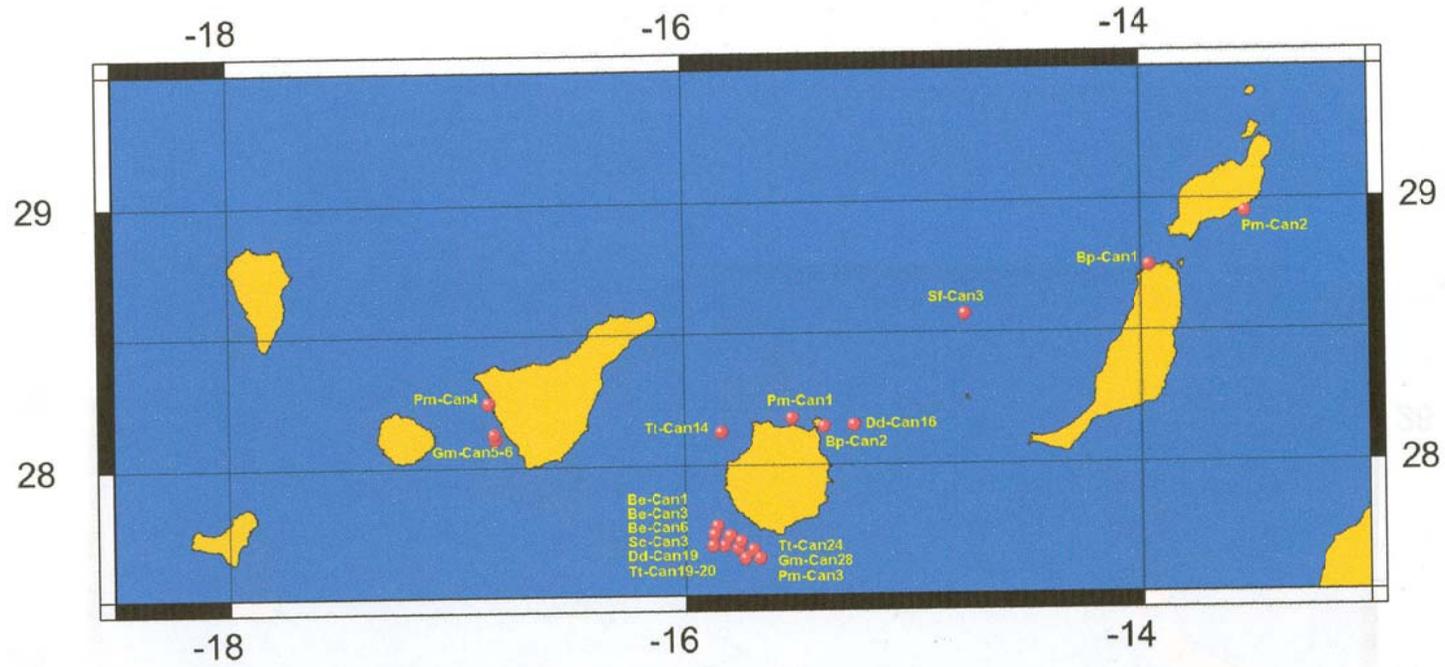


Figura 2.9. Localización de las muestras para las que se ha secuenciado el gen NADH5.



2.4. Determinación de la concentración de ADN

La evaluación de la concentración de ADN resultante se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa.

En un gel de agarosa al 1% se cargaban 0,5 μ l de muestra, 4,5 μ l de TE 1X y 1 μ l de tampón de carga (300 μ l de glicerol, 700 μ l de H₂O_{dd} y 5 mg de azul de bromofenol y xylene cianol) (Figura 2.10.). Las muestras se dejaban correr durante 60 minutos a 16 V/cm en TAE 1X utilizando, como marcador de pesos moleculares e indicador de la concentración, 125 ng de plásmido λ cortado con la enzima Hind III. Posteriormente el gel era teñido durante 15 minutos en una solución de 0,5 μ g /ml de bromuro de etidio en oscuridad y lavado 15 minutos sobre un agitador orbital en agua destilada. Para comprobar los resultados, el gel era inspeccionado sobre un transiluminador de luz ultravioleta (UVP) y fotografiado con el sistema "Ultra Violet Products Gel Documentation System" utilizando el software Imagestore 5000 v.7.01. La fotografía era posteriormente sometida al software GelWorks 1D con el que se estimaba la concentración del resultado del ADN extraído.

2.5. Amplificación de las regiones de ADN

Para amplificar las regiones del genoma que se deseaban estudiar se aplicó el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988).

Se amplificaron 4 fragmentos del genoma distintos. Tres de ellos correspondientes al ADN mt (la región control o D-loop, la subunidad I del gen de la citocromo c oxidasa

(COI) y la subunidad 5 del gen nicotinamida adenina dinucleótido dehidrogenasa subunidad 5 (NADH5)), para su posterior secuenciación y uno del ADN nuclear, el gen SRY, para la determinación del sexo de los animales muestreados.



Figura 2.10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN genómico de muestras de piel de varias especies de cetáceos. Como marcador de pesos moleculares y de concentración se han utilizado 125 ng y 50 ng de plásmido λ cortado con la enzima Hind III.

2.5.1. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción de la PCR tiene como finalidad crear un gran número de copias de una región determinada de ADN para tener una concentración lo suficientemente elevada para su uso en análisis posteriores. La reacción consiste en someter una mezcla de ADN molde, cebadores o pequeños fragmentos de ADN que delimitan la región deseada, cada uno de los cuatro nucleótidos trifosfatos libres (dNTPs) y una polimerasa termoestable (Taq ADN polimerasa) capaz de sintetizar moléculas de ADN en un amplio

rango de temperaturas, a una concentración de Mg^{2+} adecuada y durante un número determinado de ciclos compuestos de tres fases:

- **Fase de desnaturalización:** La mezcla se pone a 95 °C de forma que la cadena molde se separa en las dos hebras que la componen.
- **Fase de hibridación:** Se usa una temperatura por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores para favorecer la unión de estos a cada una de las hebras de ADN molde y sus complementarias.
- **Fase de elongación:** La temperatura se sube a 72 °C para que la enzima Taq ADN polimerasa reproduzca copias de ADN molde en condiciones óptimas de actividad enzimática.

Previo a estos ciclos la mezcla se somete a un ciclo de 95 °C, de duración algo mayor, con el fin de asegurar la desnaturalización de la cadena e inactivar las nucleasas y proteasas, que podrían disminuir el rendimiento de la reacción y al final del proceso se lleva a cabo un ciclo algo más largo de elongación para finalizar la síntesis de las copias incompletas.

Como resultado final se obtienen 2^n copias de cada cadena original, siendo n el número de ciclos. Las temperaturas exactas, los tiempos que dura cada fase, el número de ciclos, así como las concentraciones a las que debe estar cada uno de los componentes de la reacción deben determinarse de forma empírica para cada juego de cebadores y ADN molde.

2.5.2. Diseño de los cebadores usados en las reacciones de PCR

Para amplificar cada una de las regiones es necesario el uso de un par de cebadores que delimiten el fragmento deseado. En el caso de la región control y del gen SRY se utilizaron cebadores descritos previamente en otros trabajos. Las regiones COI y NADH5, en cambio no habían sido amplificadas anteriormente para ninguna especie de cetáceo, por lo que no existían cebadores específicos y tuvieron que ser diseñados.

La región D-loop es una de las regiones del ADNmt más estudiadas en un gran número de especies de cetáceos, por lo que se incluyó en el estudio para poder comparar las muestras tomadas en Canarias con otras de las mismas especies tomadas en diferentes partes del mundo.

Para su amplificación se utilizaron los cebadores L15867 y H16329 que Henshaw *et al.* (1997) diseñaron para amplificar dicha región en varias especies de zifios. Estos cebadores dieron buen resultado para la amplificación de unos 400 pb de la región control en el delfín mular, calderón tropical, delfín común, rorcual tropical y el zifio de Gervais.

Para determinar el sexo de los animales muestreados se utilizó una secuencia conservada de ADN localizada en el cromosoma Y denominada SRY (región determinante del sexo del gen Y), tal y como recomiendan Palsbøll *et al.* (1992). Los cebadores, en este caso, fueron el SRYA y el SRYB, diseñados a partir de la secuencia del SRY de cachalote por Richard *et al.* (1994). Con estos cebadores se obtiene un producto de 147 pb en las muestras procedentes de animales machos y ninguno en las muestras de hembras.

Para diseñar los cebadores que se usaron para amplificar los fragmentos COI y NADH5 se partió de la secuencia completa del ADNmt del rorcual común publicada por

Árnason *et al.* (1991a) (Número de acceso de GenBank: X61145). De esta secuencia se extrajeron los genes COI y NADH5 de 1551 pb (de la base 5782 a la 7332) y 1821 pb (de la base 12208 a la 14028) de longitud respectivamente.

En ambos casos, las secuencias fueron analizadas con los programas Primer Premier ver. 4.04, Oligo ver. 5.0 (Rychlik & Rychlik, 1994) y Gen Runner ver. 3.00 utilizando como condiciones una longitud de 20 pb para cada cebador, un contenido en G + C alrededor del 50% y una diferencia menor o igual a 5 °C entre las Tm de ambos cebadores. La longitud del fragmento a amplificar se estableció en 1000 - 1200 pb.

Para elegir uno de los pares de cebadores que resultaron de los análisis, se tomaron las regiones COI y NADH5 del rorcual común, el rorcual azul y el cachalote (Árnason & Gullberg., 1993; Árnason *et al.*, 2000) y se alinearon las secuencias homólogas con el programa ClustalW. Se eligió un par de cebadores que coincidiera en una zona que fuese altamente conservada entre las tres secuencias, con el fin de que los cebadores amplificaran bien la región deseada en cualquier especie de cetáceo.

Finalmente se decidió utilizar los pares SH-COI-5' y SH-COI-3' para COI y SH-NADH5-5' y SH-NADH5-3' para NADH5 (Tabla 2.1.) ya que además de cumplir las condiciones citadas anteriormente no formaban estructuras secundarias, no producían hibridaciones inespecíficas ni hibridaciones entre el cebador 3' y el 5' o en el caso de producirse alguno de estos fenómenos, tenían muy poca estabilidad lo que es importante para obtener un buen rendimiento en la PCR.

Los cebadores fueron sintetizados en las empresas Invitrogen Life Technologies y Pharmacia Biotech.

Tabla 2.1. Características de los cebadores usados en las reacciones de PCR correspondientes a la amplificación de las regiones COI, NADH5, D-loop y SRY. Se indican el nombre con el que se ha identificado el cebador en el presente trabajo, la secuencia en el sentido 5'-3', la longitud en pb del mismo, la posición que ocupa el extremo 3' del cebador en la secuencia del ADNmt completo del roscual común (Árnason et al., 1991a) (en el caso de las regiones D-loop, COI y NADH5), la Tm (temperatura de hibridación) y la región y el tamaño del fragmento que amplifican.

Cebador	Secuencia	Longitud (pb)	Posición	Tm. (°C)	Región amplificada	Tamaño del fragmento (pb)
SH-COI-5'	GCT TCT GAC TAC TCC CTC CT	20	6102	59	COI	1154
SH-COI-3'	GAC ACC CAT TTA GTC ATT CA	20	7257	56,4		
SH-NADH5-5'	GCC CTC CAA GCA ATC CTA TA	20	12728	63,9	NADH5	1068
SH-NADH5-3'	GTA GGC GGT GTA TGA TTG TG	20	13797	60,1		
L15867	TCA CCA YCA RCA CCM AAA GCT GA	23	15867	65,5	D-loop	461
H16329	ATG GCC CTG AAG GTA AGA ACC	21	16329	65,1		
SRY A	CAT TGT GTG GTC TCG TGA TC	20		61,7	SRY	210
SRY B	AGT CTC TGT GCC TCC TCG AA	20	-	64,1		

2.5.3. La reacción de amplificación

Las reacciones de amplificación de los fragmentos COI, NADH5 y D-loop se realizaron en un volumen final de 50 µl con las siguientes concentraciones: 50-100 ng de ADN molde procedente de la extracción, 1X tampón de PCR (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween-20) (Bioline), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Pharmacia Biotech), 1,25 unidades BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline) y 0,25 µM de cada uno de los cebadores correspondientes.

Tabla 2.2. Condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos utilizadas en las reacciones de PCR de amplificación

COI	NADH5	D-Loop	SRY
95 °C - 4min	95 °C - 4min	94 °C - 5 min	95 °C - 5 min
95 °C - 30 seg	95 °C - 30 seg	94 °C - 1 min	96 °C - 1 min
53 °C - 30 seg	53 °C - 30 seg	53 °C - 1 min	58 °C - 1 min
72 °C - 30 seg	72 °C - 30 seg	72 °C - 10 seg	72 °C - 10 seg
30 ciclos	30 ciclos	35 ciclos	35 ciclos
72 °C - 5 min			
4 °C - ∞			

La amplificación del gen determinante del sexo (SRY) se hizo en un volumen total de 30 µl con 30-60 ng de ADN de la muestra, 1X tampón de PCR (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween-20) (Bioline), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Pharmacia Biotech), 0,75 unidades BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline) y 0,25 µM de los mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween-20) (Bioline), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM

dNTPs (Pharmacia Biotech), 0,75 unidades BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline) y 0,25 μM de los cebadores SRYA y SRYB. Las reacciones se cargaron indistintamente en un termociclador "iCycler" de Biorad o en un termociclador "Mastercycler" de Eppendorf. Para cada uno de los fragmentos se establecieron las condiciones que aparecen en la tabla 2.2. para obtener una amplificación óptima.

2.6. Comprobación del resultado de la reacción de PCR.

Una vez finalizada la reacción de PCR se cargaban 2 μl de dicha reacción, 3 μl de TE 1X y 1 μl de tampón de carga en un gel de agarosa al 1% y se realizaba una electroforesis a 100 V durante 45 minutos en TAE 1X. Como marcador de pesos moleculares se utilizaba 125 ng de plásmido λ cortado con la enzima HindIII o 100 ng de plásmido pGEM3z cortado con HinfI, según el tamaño del fragmento que se deseaba evaluar. El gel se teñía 15 minutos. en bromuro de etidio 0,5 μg /ml y se lavaba otros 15 minutos en agua destilada en agitación. El resultado de la reacción de PCR era evaluado sobre un trasiluminador de luz ultravioleta (UVP) y fotografiado con el sistema "Ultra Violet Products Gel Documentation System" utilizando el software Imagestore 5000 v.7.01. (Figura 2.11.). La concentración de ADN en los fragmentos amplificados se cuantificaron con el software GelWorks 1D.

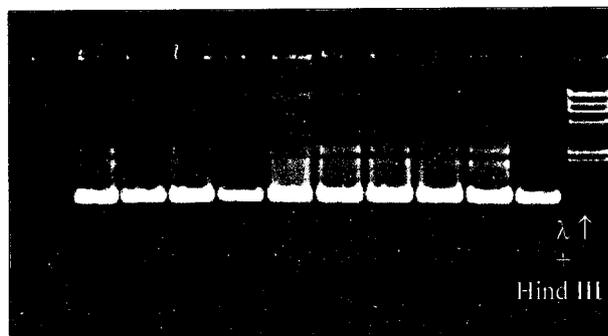


Figura 2.11. Gel de agarosa al 1% en el que se ha cargado el producto de la reacción de PCR para amplificar el gen NADH5 en distintas especies de cetáceos. Como marcador de pesos moleculares se ha utilizado el plásmido λ cortado con la enzima HindIII.

2.7. Secuenciación de los fragmentos

Todos los fragmentos se secuenciaron mediante el método de los Dideoxy (Sanger, 1981) utilizando dos técnicas distintas para la lectura de la secuencia final: la tinción de plata y la secuenciación automática. A pesar de que, en general, los resultados obtenidos por ambos métodos fueron muy parecidos, se comprobó que el de la tinción de plata posee más factores que pueden inducir a un error en la lectura. Así, las ligeras variaciones de volumen al preparar las reacciones o al cargarlas en el gel de acrilamida pueden provocar intensidades distintas en las cuatro bandas que aparecen en el gel. También en el proceso de preparación o de tinción del gel y de la electroforesis se pueden producir fenómenos que ocasionan manchas en los geles y que dificultan su lectura.

Tabla 2.3. Características de los cebadores usados en las reacciones de PCR correspondientes a la secuenciación de las regiones COI, NADH5 y D-loop. Se indican el nombre con el que se ha identificado el cebador en el presente trabajo, la secuencia en el sentido 5'-3', la longitud en pb del mismo, la posición que ocupa el extremo 3' del cebador en la secuencia del ADNmt completo del rorcual común (Árnason et al., 1991a), la Tm (temperatura de hibridación) y la región amplificada.

Cebador	Secuencia	Longitud (pb)	Posición	Tm. (°C)	Región amplificada
SH-COI-5'	GCT TCT GAC TAC TCC CTC CT	20	6102	59	COI
SH-COI-int	GCT TCT CAG ATA ATG AAG AT	20	7186	52,3	
SH-NADH5-5'	GCC CTC CAA GCA ATC CTA TA	20	12728	63,9	NADH5
SH-NADH5-3'	GTA GGC GGT GTA TGA TTG TG	20	13797	60,1	
SH-D-loop-int	CGG TAA GTT AAA GCC CGT AT	20	16095	61,7	D-loop
H16329	ATG GCC CTG AAG GTA AGA ACC	21	16329	65,1	

La eliminación de muchos pasos y la automatización del proceso al utilizar un secuenciador automático, reduce las posibilidades de error en la interpretación de la secuencia por lo que la lectura es mucho más fiable.

En el caso del COI y el NADH5, al tratarse de fragmentos largos, de más de 1 kilobase, se secuenciaron desde ambos extremos, utilizando los cebadores SH-NADH5-5' y SH-NADH5-3' para el NADH5 y el cebador SH-COI-5' y uno interno, SH-COI-int para el COI.

La región D-loop se secuenció tan sólo desde el extremo 3' con el cebador H16329, pero además se diseñó un cebador interno, SH-D-loop-int, que permitía confirmar una zona de mayor variabilidad cerca del extremo 3'. En la tabla 2.3. se muestran las características de los cebadores empleados en las reacciones de secuenciación.

2.7.1. Secuenciación por tinción de plata

Las reacciones de secuenciación se realizaron con el kit "Silver Sequence™ DNA Sequencing System" de Promega, 4,5 pmol del cebador correspondiente y 50-100 ng de ADN amplificado, limpiado previamente con una columna MicroSpin™ S-400HR (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), siguiendo el protocolo del fabricante. Las reacciones se cargaban en un termociclador "Mastercycler" (Eppendorf), con las condiciones indicadas en la tabla 2.4.

Cuatro microlitros del resultado de las reacciones eran cargados en un gel desnaturante de acrilamida al 6% y de 0,4 mm de grosor y se realizaba una electroforesis a 50 W durante 1 hora y 15 minutos para leer las 160 primeras bases, contando desde el cebador. Para leer las bases restantes se realizaba una nueva

electroforesis empleando otros 4 μ l y dejando correr las muestras durante 5 horas. Los geles se revelaron mediante tinción de plata según indica el protocolo del manual técnico del "Silver Sequence™ DNA Sequencing System" (Promega) pero con algunas modificaciones (ver protocolos en el anexo III). En la imagen 2.12. se muestra un gel de acrilamida en el que se han corrido muestras de rorcual tropical y para las que se ha secuenciado un fragmento de la región control.

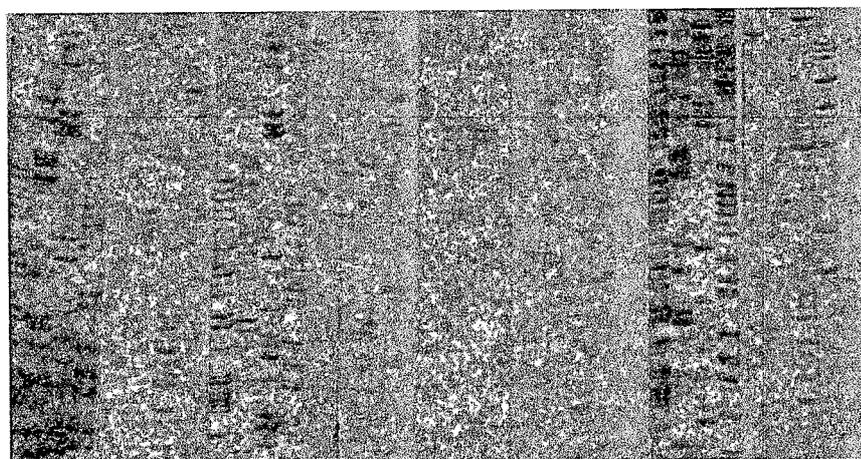


Figura 2.12. Gel de acrilamida teñido con el método de la tinción de plata en el que se ha secuenciado la región D-loop de varias muestras de rorcual tropical.

2.7.2. Secuenciación automática

Para las reacciones de secuenciación se utilizó el "ABI Prism® dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems), 0,8 pmol del cebador correspondiente y entre 30 y 90 ng de ADN amplificado, limpiado previamente con una columna MicroSpin™ S-400HR (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), siguiendo

el protocolo del fabricante. Las reacciones se cargaban en un termociclador "Mastercycler" (Eppendorf) con las condiciones indicadas en la tabla 2.4.

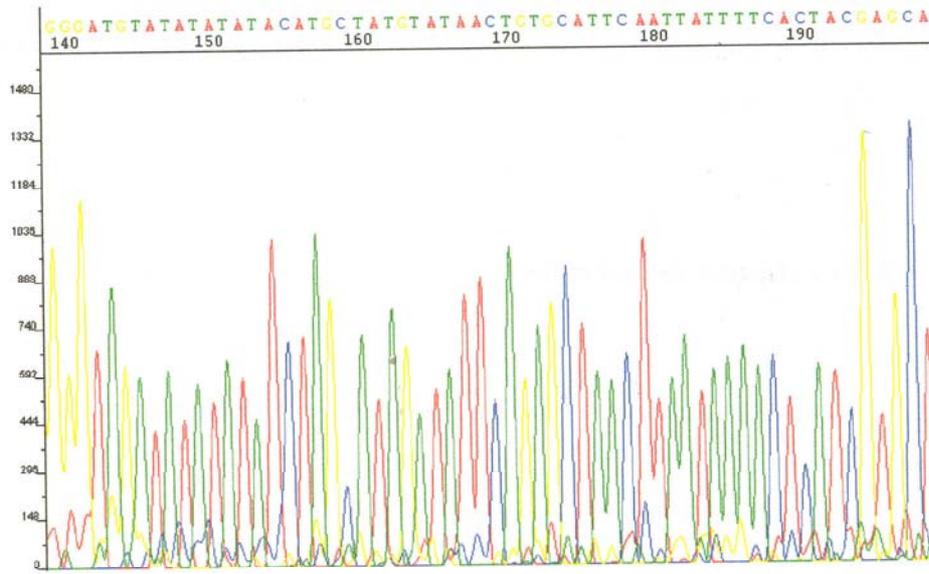


Figura 2.13. Fragmento de la región D-loop de la muestra Be2-29/8 secuenciado con el secuenciador automático ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer y leído con el programa Sequencing Analysis versión 3.7.

Tabla 2.4. Condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos utilizadas en las reacciones de PCR de secuenciación

Secuenciación manual	Secuenciación automática
94 °C - 2 min	94 °C - 3 min
94 °C - 30 seg 66 °C - 1 min 36 ciclos	96 °C - 30 seg 50 °C - 4 min 26 ciclos
72 °C - 5 min	72 °C - 5 min
4 °C - ∞	4 °C - ∞

Los 5 μl resultantes de la reacción se purificaron mediante precipitación por etanol/acetato de sodio y se resuspendieron en 20 μl de formamida antes de ser cargados en el secuenciador automático ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Ver protocolos en el anexo III). Las secuencias se leyeron con el programa Sequencing Analysis versión 3.7. (Figura 2.13.).

2.8. Análisis de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias, éstas se alinearon con el programa ClustalW (Thomson *et al.*, 1994). El número de haplotipos presentes en las secuencias y los lugares polimórficos se identificaron con el programa DNA Sequence Polymorphism (v. 3.53) (Rozas & Rozas, 1999).

Para cada gen se estimó la diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (π) según las fórmulas de Nei (1987):

$$h = \frac{n(1 - \sum x_i^2)}{n-1}$$

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i,j} x_i x_j d_{ij}$$

Donde n = número de individuos muestreados en la población.

x_i = la frecuencia en la población de la secuencia i -ésima.

x_j = la frecuencia en la población de la secuencia j -ésima.

d_{ij} = el número de diferencias nucleotídicas por lugar entre las secuencias i -ésima y j -ésima.

La divergencia genética entre poblaciones se calculó mediante la fórmula de la distancia neta media entre poblaciones que tiene en cuenta el polimorfismo dentro de cada una de las mismas (Nei, 1987):

$$d_A = d_{XY} - \frac{d_X + d_Y}{2}$$

Donde: d_{XY} = número medio de diferencias nucleotídicas por lugar entre las secuencias de las dos poblaciones.

d_X y d_Y = número medio de diferencias nucleotídicas por lugar dentro de cada población.

Para comprobar la existencia de subdivisión ya sea geográfica (por áreas de muestreo), temporal (por periodos de muestreo) o de otra índole (por ejemplo diferencias en la diversidad genética entre machos y hembras, entre animales varados o muestreados en su medio, etc.) se pueden aplicar dos tipos de tests. El primero de ellos es el test exacto, análogo al test exacto de Fisher pero en lugar de computar tablas 2 x 2 se utilizan tablas r x k, siendo r el número de grupos en los que se ha subdividido la muestra y k el número de haplotipos (Raymond & Rousset, 1995). La tabla de contingencia se construye utilizando las frecuencias con las que cada haplotipo aparece en un grupo determinado. Los valores de las filas y las columnas se permutan utilizando un número suficientemente elevado de pasos de la cadena de Markov. De esta forma se generan al azar todas las tablas posibles y se calcula un valor P, que es fracción de las tablas exploradas que son igual o menos probables que la tabla observada en la muestra, con la hipótesis nula de que existe panmixia, es decir, que los individuos se reproducen al azar, por lo que no hay estructuración poblacional según los criterios definidos (Excoffier, 2001).

El otro test es un análisis de la varianza molecular o AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992). Es una modificación del análisis de la varianza o ANOVA, teniendo en cuenta no

sólo la frecuencia de los haplotipos sino también la distancia (mutaciones) entre ellos, calculadas por el método de diferencias par a par. Con este test se estima un índice de fijación ϕ_{ST} que indica cuánto de la variabilidad genética total de la población es debida a la variabilidad entre grupos. Al definir una serie de grupos dentro de una población se determina una estructura genética que es la que se comprueba con el test. La varianza total de la población se compone de la covarianza debida a diferencias entre haplotipos dentro de un mismo grupo y a la covarianza debida a diferencias entre grupos de una población. Estos componentes de covarianza son los que se utilizan para calcular el índice de fijación según la fórmula:

$$\phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

Donde: σ_a^2 = componente de covarianza debida a diferencias entre los grupos.

σ_T^2 = varianza molecular total de la población.

La significación estadística de σ_a^2 y ϕ_{ST} se estima haciendo permutaciones no paramétricas de los haplotipos entre grupos.

Todos los cálculos de comprobación de estructuración genética en las poblaciones se realizaron con el programa ARLEQUIN ver. 2000 (Schneider *et al.*, 2000).

El análisis cladístico se realizó utilizando el programa MEGA (v.2.1) (Kumar *et al.* 2001). En los análisis de la región control, las distancias genéticas entre secuencias se calcularon utilizando la proporción (p) de lugares nucleotídicos en los que dos secuencias que se comparan son diferentes.

$$p = \frac{n_d}{n}$$

Donde: n_d = número de diferencias entre las secuencias que se están comparando.

n = longitud total de la secuencia.

Éste es un método muy sencillo y fácil de calcular, que no tiene en cuenta correcciones en el caso de sustituciones múltiples en un mismo lugar, si hay sesgos en las tasas de sustitución o si hay diferencias en las tasas de evolución entre lugares nucleotídicos. Sin embargo, para valores de distancia entre secuencias pequeños ($d < 0,05$) da resultados igual de fiables que métodos más complejos y tiene valores de varianza menores (Nei & Kumar, 2000). En los análisis de los genes COI y NADH5 las distancias se calcularon por el método de Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969), que es más indicado en el caso en que $0,05 < d < 1,0$, según la fórmula:

$$d = -\left(\frac{3}{4}\right) \ln \left[1 - \left(\frac{4}{3}\right) p \right]$$

Donde: p = proporción de nucleótidos distintos entre las secuencias que se están comparando.

Para la representación de los árboles filogenéticos se utilizó el método *Neighbor Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987). Éste es una versión simplificada del método de Mínima Evolución en el que la topología del árbol que finalmente se elige como correcto muestra el menor valor de la suma de todas las ramas (S). Sin embargo, para ello deben evaluarse

primero los valores de S para todas las topologías posibles, lo que puede llevar un tiempo considerable. En el caso del método NJ no se calcula S para todas las topologías y se produce un único árbol final.

Para estimar la fiabilidad del árbol inferido se ha utilizado el *Bootstrap Test* (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas. En este test se construye un árbol inicial a partir de las secuencias analizadas. Por sustituciones en las secuencias originales se crea un nuevo grupo de secuencias a partir de las cuales se crea un nuevo árbol. Éste es comparado con el árbol original. A las ramas que coinciden en ambos árboles se les da el valor 1, en caso contrario se les da el valor 0. Esto se repite de forma iterativa un determinado número de veces (en este caso 1000) y se va registrando el porcentaje de veces en los que a una rama se le da el valor 1. A este porcentaje se le denomina valor *bootstrap*. Al finalizar el proceso, se considera que una rama es estadísticamente significativa cuando su valor *bootstrap* es mayor o igual al 95%.





3. RESULTADOS



3. RESULTADOS

3.1. La región D-loop

3.1.1. El delfín mular

Haplotipos

En las 42 secuencias de delfín mular estudiadas se encontraron 31 haplotipos distintos para la región D-loop (Tabla 3.1.). Tres animales presentaron el mismo haplotipo, el TT-CAN-P, que es el más abundante. Las tres muestras procedieron de áreas de muestreo distintas: Fuerteventura (Tt-Can30), norte de Gran Canaria (Tt-Can36) y oeste de Gran Canaria (Tt-Can18). Seguidamente se encontraron cuatro haplotipos (TT-CAN-J, TT-CAN-K, TT-CAN-S y TT-CAN-U) que se repiten dos veces y que han sido hallados sólo en el área de muestreo del sur de Gran Canaria. Otros tres haplotipos (TT-CAN-H, TT-CAN-I y TT-CAN-R) también repetidos dos veces cada uno, se muestrearon tanto al sur como al oeste de la isla de Gran Canaria. Finalmente, el haplotipo TT-CAN-A se encontró en dos animales, uno muestreado al oeste de Gran Canaria (Tt-Can17) y otro varado en Tenerife (TT-Can1), y el haplotipo TT-CAN-B se halló en la muestra (Tt-Can33) de Fuerteventura y la muestra Tt-Can2 procedente de otro varamiento en Tenerife. Los 21 haplotipos restantes fueron únicos (Tabla 3.2.). (Consultar las secuencias completas en el anexo I).

Las diferencias par a par entre las secuencias de los distintos haplotipos fueron de 1 a 15 mutaciones (0,25%-3,77%). (Ver anexo III, tabla III.1.).

Tabla 3.1. Muestras de *Tursiops truncatus* secuenciadas. H: hembra, M: macho, N: necropsia, B: biopsia, Tf: Tenerife, NGC: norte de Gran Canaria, WGC: oeste de Gran Canaria, SGC: sur de Gran Canaria, Fv: Fuerteventura.

<i>Muestra</i>	<i>Nº archivo</i>	<i>Haplotipo</i>	<i>Sexo</i>	<i>Fecha de muestreo</i>	<i>B/N</i>	<i>Lugar de muestreo</i>	<i>Area de muestreo</i>
Tt-Can1	Tt20	TT-CAN-A	H	12/04/95	N	Garachico	Tf
Tt-Can2	Tt302/97	TT-CAN-B	H	04/04/96	N	Buenavista del Norte	Tf
Tt-Can3	Tt1v	TT-CAN-C	M	06/03/97	N	Punta Blanca	Tf
Tt-Can4	Tt1-1/3	TT-CAN-D	M	01/03/99	B	28°06',855N / 16°47',286W	Tf
Tt-Can5	Tt1-15/6	TT-CAN-E	H	15/06/99	B	27°46',499N / 15°50',680W	SGC
Tt-Can6	Tt1-21/6	TT-CAN-F	M	21/06/99	B	27°41',748N / 15°45',639W	SGC
Tt-Can7	Tt1-22/6	TT-CAN-G	M	22/06/99	B	27°39',508N / 15°44',721W	SGC
Tt-Can8	Tt2-22/6	TT-CAN-H	M	22/06/99	B	27°39',425N / 15°43',908W	SGC
Tt-Can9	Tt2-9/7	TT-CAN-I	M	09/07/99	B	27°39',381N / 15°41',940W	SGC
Tt-Can10	Tt3-9/7	TT-CAN-J	H	09/07/99	B	27°40',182N / 15°42',570W	SGC
Tt-Can11	Tt1-12/7	TT-CAN-K	M	12/07/99	B	27°40',810N / 15°45',499W	SGC
Tt-Can12	Tt1-14/7	TT-CAN-L	M	14/07/99	B	27°40',728N / 15°46',804W	SGC
Tt-Can13	Tt2-14/7	TT-CAN-M	H	14/07/99	B	27°43',965N / 15°49',744W	SGC
Tt-Can14	Tt1-15/7	TT-CAN-I	M	15/07/99	B	28°04',969N / 15°47',915W	WGC
Tt-Can15	Tt2-15/7	TT-CAN-N	H	15/07/99	B	28°04',538N / 15°47',919W	WGC
Tt-Can16	Tt3-15/7	TT-CAN-O	M	15/07/99	B	28°04',599N / 15°48',305W	WGC
Tt-Can17	Tt4-15/7	TT-CAN-A	M	15/07/99	B	28°04',676N / 15°46',794W	WGC
Tt-Can18	Tt6-15/7	TT-CAN-P	H	15/07/99	B	28°04',492N / 15°46',966W	WGC
Tt-Can19	Tt1-30/8	TT-CAN-K	M	30/08/99	B	27°39',117N / 15°39',020W	SGC
Tt-Can20	Tt1-4/9	TT-CAN-Q	M	04/09/99	B	27°38',720N / 15°42',713W	SGC
Tt-Can21	Tt1-5/9	TT-CAN-R	M	05/09/99	B	27°48',620N / 15°52',892W	SGC

Tabla 3.1. (Continuación). Muestras de *Tursiops truncatus* secuenciadas. H: hembra, M: macho, N: necropsia, B: biopsia, Tf: Tenerife, NGC: norte de Gran Canaria, WGC: oeste de Gran Canaria, SGC: sur de Gran Canaria, Fv: Fuerteventura.

<i>Muestra</i>	<i>Nº archivo</i>	<i>Haplotipo</i>	<i>Sexo</i>	<i>Fecha de muestreo</i>	<i>B/N</i>	<i>Lugar de muestreo</i>	<i>Area de muestreo</i>
Tt-Can22	Tt1-6/9	TT-CAN-S	H	06/09/99	B	27°40',940N / 15°45',967W	SGC
Tt-Can23	Tt2-7/9	TT-CAN-T	H	07/09/99	B	27°47',467N / 15°51',590W	SGC
Tt-Can24	Tt1-8/9	TT-CAN-J	H	08/09/99	B	27°40',975N / 15°46',471W	SGC
Tt-Can25	Tt1-9/9	TT-CAN-U	H	09/09/99	B	27°39',036N / 15°44',052W	SGC
Tt-Can26	Tt2-9/9	TT-CAN-V	M	09/09/99	B	27°38',906N / 15°43',663W	SGC
Tt-Can27	Tt1-17/10	TT-CAN-W	M	17/10/99	B	27°43',465N / 15°49',509W	SGC
Tt-Can28	Tt2-17/10	TT-CAN-S	M	17/10/99	B	27°45',845N / 15°50',698W	SGC
Tt-Can29	Tt1-23/10	TT-CAN-X	M	23/10/99	B	28°41',118N / 13°48',503W	Fv
Tt-Can30	Tt1-28/10	TT-CAN-P	M	28/10/99	B	28°13',130N / 13°53',216W	Fv
Tt-Can31	Tt2-28/10	TT-CAN-Y	M	28/10/99	B	28°12',043N / 13°54',205W	Fv
Tt-Can32	Tt3-28/10	TT-CAN-Z	H	28/10/99	B	28°11',864N / 13°54',547W	Fv
Tt-Can33	Tt4-28/10	TT-CAN-B	M	28/10/99	B	28°11',739N / 13°54',547W	Fv
Tt-Can34	Tt1-6/12	TT-CAN-R	H	06/12/99	B	28°08',191N / 15°50',502W	WGC
Tt-Can35	Tt2-6/12	TT-CAN-AA	H	06/12/99	B	28°07',618N / 15°51',707W	WGC
Tt-Can36	Ttv-16/3/00	TT-CAN-P	H	16/03/00	N	Gáldar	NGC
Tt-Can37	Tt1-26/3/00	TT-CAN-BB	H	26/03/00	B	27°41',309N / 15°49',750W	SGC
Tt-Can38	Tt1-14/4/00	TT-CAN-CC	H	14/04/00	B	28°09',575N / 15°22',275W	NGC
Tt-Can39	Tt1-16/5/00	TT-CAN-U	M	16/05/00	B	27°40',721N / 15°46',402W	SGC
Tt-Can40	Tt1-19/5/00	TT-CAN-H	H	19/05/00	B	28°05',330N / 15°53',906W	WGC
Tt-Can41	Tt144/01	TT-CAN-DD	M	03/10/01	N	Pozo Izquierdo	SGC
Tt-Can42	Tt145/01	TT-CAN-EE	H	03/10/01	N	Pozo Izquierdo	SGC

Tabla 3.2. Lugares variables en las 399 bases secuenciadas para la región control de los 31 haplotipos de delfín mular. Los números corresponden a las posiciones de los lugares variables dentro de la secuencia. Los puntos (.) indican identidad y los guiones (-) deleciones con respecto a la secuencia superior (TT-CAN-A). Se indica el número de individuos para cada haplotipo por áreas de muestreo (como definidas en tabla 3.1.) y en total (n). En negrita se indican los haplotipos pertenecientes al grupo Canarias Tt-2 tal y como se ha definido en el texto. El asterisco (*) indica la sustitución que diferencia los haplotipos de los grupos Canarias Tt-1 y Canarias Tt-2.

Haplotipos	1111	1122222222	2222222223	3333	Áreas de muestreo					
	1234670046	8900144666	6777778990	1258	Tf	Fv	NGC	WGC	SGC	n
TT-CAN-A	AATCGTATCT	ATCCACCTAC	CCCTTCCCCG	TCTC	1	-	-	1	-	2
TT-CAN-BT....T.T..	.TC.	1	1	-	-	-	2
TT-CAN-CT.	...T.T.CCA	...C..T..A	..C.	1	-	-	-	-	1
TT-CAN-DT....T.T..	.TCT	1	-	-	-	-	1
TT-CAN-E	..C..-CT.	T...T..T.	A..C....A	...T	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-F	..C....T.T..T.	...C....A	...T	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-G	GTC...CT.T..T.	...C....A	G.CT	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-H	..C....CT.C.	...C....A	..CT	-	-	-	1	1	2
TT-CAN-IT....	..-C.....	-	-	-	1	1	2
TT-CAN-JC.T..A	...T	-	-	-	-	2	2
TT-CAN-KT.....	...C..T.TA	...T	-	-	-	-	2	2
TT-CAN-L	..C....CT.	...T.T..CT	...C.T..A	..CT	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-MT....	-.....	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-N	..C....CT.T....	...C....A	..CT	-	-	-	1	-	1
TT-CAN-OG...	-.....	-	-	-	1	-	1
TT-CAN-PT..T....T..	-	1	1	1	-	3
TT-CAN-QT....T..	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-RT....T..	...T	-	-	-	1	1	2
TT-CAN-SC...T....	-	-	-	-	2	2
TT-CAN-TT....T..	.T.T	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-U	..C....CT.T..T.	...C....A	..CT	-	-	-	-	2	2
TT-CAN-V	..C..-CT.T..T.	...CC...A	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-WT....	-T.....	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-X	...TA...C	...T.....	...C....A	..CT	-	1	-	-	-	1
TT-CAN-Y	..C....CT.	...TTTT.CT	...C.T..A	..CT	-	1	-	-	-	1
TT-CAN-ZT....	...C...T..	-	1	-	-	-	1
TT-CAN-AA	..C....CT.	...T.T..CT	...C....A	..CT	-	-	-	1	-	1
TT-CAN-BBT..T.	...C....A	..C.	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-CCT....	..-C.....	...T	-	-	1	-	-	1
TT-CAN-DDT.....	.T.C..T..A	-	-	-	-	1	1
TT-CAN-EET..T.A	-	-	-	-	1	1

Polimorfismo

Aparecieron 33 posiciones nucleotídicas polimórficas en las 399 bases secuenciadas (Tablas 3.2. y 3.3.), lo que representa un 8,27% de lugares variables. En estas 33 bases hay 35 mutaciones de las cuales 28 son transiciones y 7 son transversiones ($R=4$). Hay dos deleciones, una en la base 77 en los haplotipos TT-CAN-E y TT-CAN-V y otra en la base 271 en otros 5 haplotipos (TT-CAN-I, TT-CAN-M, TT-CAN-O, TT-CAN-W y TT-CAN-CC).

Al contabilizar las posiciones polimórficas múltiples se observa la presencia de una región, entre las bases 241 y 300, de variabilidad más elevada que en el resto de la secuencia, con un 25,42% de posiciones polimórficas.

Al representar la diversidad nucleotídica (π) en intervalos de 30 bases a lo largo de la secuencia, se comprueba que, efectivamente, en dos de los intervalos, entre las bases 241 y 270 y las bases 271 y 300, el valor de la diversidad es superior al 4% en el primero y al 7% en el segundo, mientras que en el resto de la secuencia no supera el 2% (Figura 3.1.).

La diversidad nucleotídica promedio para toda la secuencia de la región D-loop de los haplotipos de delfín mular del Archipiélago Canario es $\pi=0,017 \pm 0,001$ y su diversidad haplotípica, $h=0,956 \pm 0,008$.

Estructura de las poblaciones de delfín mular en el Archipiélago Canario

Para comprobar el efecto del área de procedencia de la muestra sobre la variación genética, se han dividido las muestras en 5 posibles poblaciones geográficas:

Tenerife (n=4), Fuerteventura (n=5), norte de Gran Canaria (n=2), oeste de Gran Canaria (n=8) y sur de Gran Canaria (n=23). Las muestras subdivididas de esta forma se han sometido a un test exacto con 10.000 pasos en la cadena de Markov, lo que permite comprobar la hipótesis nula de que las muestras no están subestructuradas genéticamente, y a un análisis de la varianza molecular (AMOVA) con 10.000 permutaciones, que calcula la probabilidad (P) de tener una componente de la varianza y un estadístico Φ más extremos que los valores observados por casualidad.

Tabla 3.3. Lugares polimórficos de la región control del ADNmt en la población canaria de delfín mular, considerando las variantes dobles y triples para los lugares polimórficos simples y múltiples. En paréntesis se indican las posiciones de los lugares dentro de la secuencia.

		15
<i>Lugares polimórficos simples</i>	De dos variantes	(10, 24, 41, 62, 102, 164, 185, 213, 246, 261, 267, 271, 275, 277, 311)
	De tres variantes	0
		16
<i>Lugares polimórficos múltiples</i>	De dos variantes	(30, 107, 146, 191, 201, 202, 242, 276, 279, 280, 291, 292, 300, 326, 354, 388)
	De tres variantes	2 (262, 266)
<i>Lugares polimórficos totales</i>		33

Para ninguno de los dos tests, los resultados indicaron la existencia de una diferenciación geográfica significativa ($P < 0,05$) (Tabla 3.4.). En el caso del test exacto la probabilidad fue 0,674 mientras que para el análisis de la varianza tanto F_{ST} como ϕ_{ST} dieron un valor muy cercano a 0 con una probabilidad superior al 5%, lo que indica que la totalidad de la variación genética encontrada entre las muestras es debida a diferencias entre individuos y no a diferencias entre los grupos a los que pertenecen. Los valores

negativos obtenidos en el test AMOVA son debidos a que el valor del parámetro que se está estimando es cero.

Tabla 3.4. Resultados del análisis de la varianza molecular teniendo en cuenta las distancias genéticas entre las secuencias de D-loop calculadas por el método par a par y la frecuencia haplotípica (ϕ_{ST}) y sólo la frecuencia haplotípica (F_{ST}) de cinco posibles poblaciones de delfín mular en el Archipiélago Canario: Tenerife, Fuerteventura, norte de Gran Canaria, oeste de Gran Canaria y sur de Gran Canaria.

	% varianza entre poblaciones	% varianza dentro de poblaciones	ϕ_{ST} / F_{ST}	P
AMOVA usando información sobre distancia genética y frecuencia haplotípica (ϕ_{ST})	0	100	-0,006	0,46
AMOVA usando solamente frecuencias de haplotipos (F_{ST})	0	100	-0,007	0,72

Asimismo se ha subdividido la población muestreada en machos y hembras para saber si un posible sesgo en el sexo afecta el grado de estructuración. También se ha hecho una subdivisión de la población en animales muestreados por biopsia y animales varados. En ninguno de los dos casos el análisis de la varianza ha dado diferencias significativas. Para la división por sexos los valores obtenidos han sido $F_{ST}=-0,009$, $P=0,87$ y $\phi_{ST}=-0,021$, $P=0,81$ y para la división por animales vivos y animales varados se ha obtenido $F_{ST}=-0,011$, $P=0,86$ y $\phi_{ST}=0,028$, $P=0,21$.

La representación en forma de árbol cladístico de los haplotipos puede dar una idea de la estructura genética de la población. El árbol se ha construido a partir de datos de distancias entre haplotipos calculadas por el método de las diferencias par a par y para su representación se ha utilizado el método del *Neighbor Joining*. La fiabilidad del árbol final se ha comprobado con un test *bootstrap* de filogenia con 1000 réplicas (Figura3.2.).

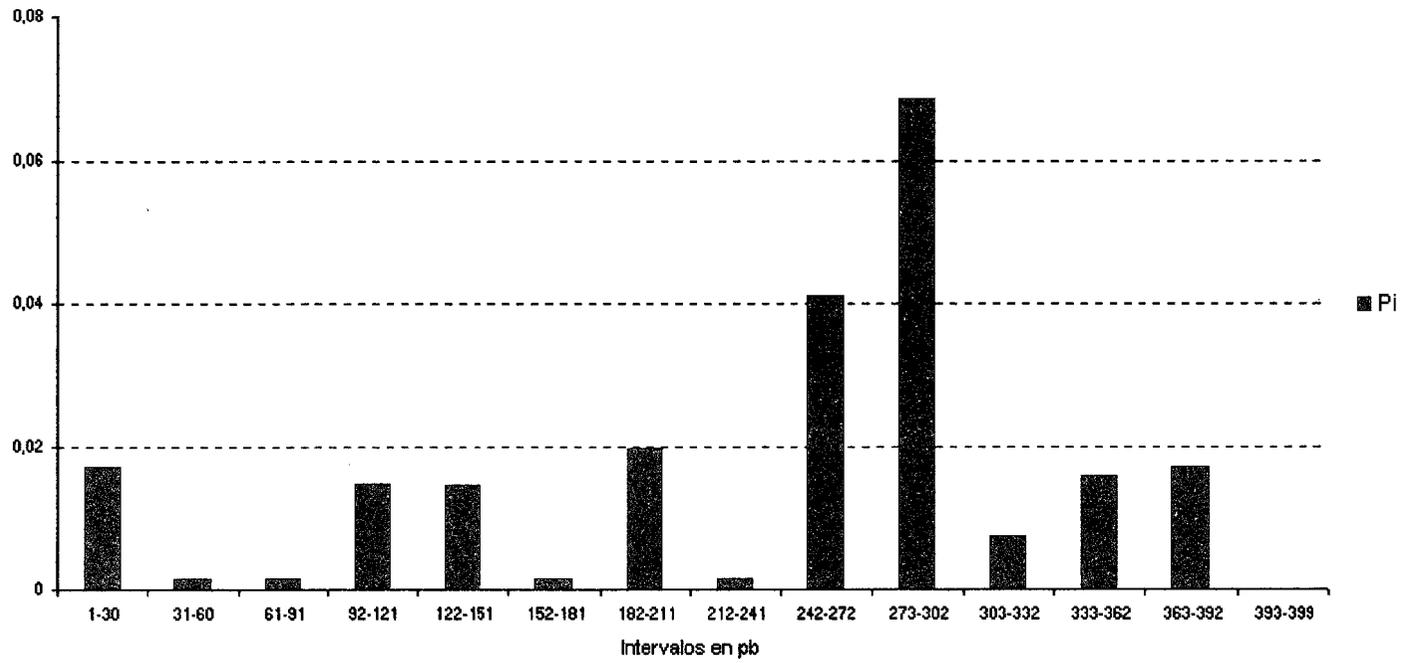


Figura 3.1. Diversidad nucleotídica π (Pi) de la región control, en intervalos de 30 bases, en el delfín mular del Archipiélago Canario.

Tal y como ya se había comprobado por el análisis de la varianza, en el árbol tampoco se ha apreciado una estructuración de los haplotipos por áreas de muestreo. No obstante, sí se observa una división de las muestras en dos grandes grupos que se han denominado Canarias Tt-1 y Canarias Tt-2. El primero es más numeroso y en él están representados haplotipos de todas las áreas de muestreo, en el segundo en cambio sólo hay animales del sur y del oeste de la isla de Gran Canaria y un animal muestreado en la isla de Fuerteventura (haplotipo TT-CAN-Y). La característica común de los haplotipos del grupo 2 es una C en lugar de una T en la posición 30 (Tabla 3.2.).

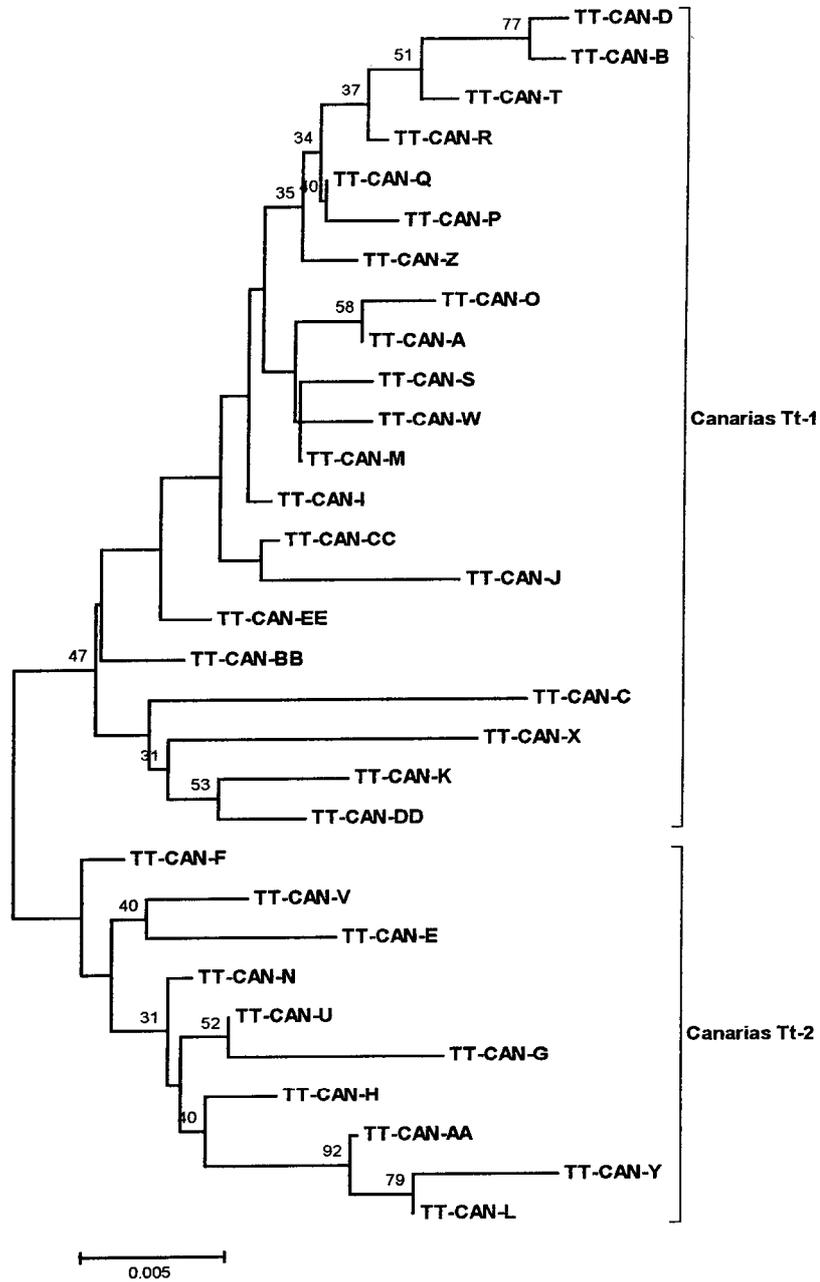
Para comprobar si esta división es real o es tan sólo un artefacto de la representación del árbol, se aplicó un análisis de la varianza subdividiendo las muestras en los dos grupos mencionados. Los resultados confirman que efectivamente existe una diferencia genética entre ellos ($\phi_{ST}= 0,493$, $P<0,0001$) y que las diferencias entre grupos y entre individuos son responsables casi en la misma medida de la diversidad genética total que existe entre las muestras (Tabla 3.5.).

Si no se consideran las diferencias en las bases que componen las secuencias de ambos grupos sino tan sólo las frecuencias con las que aparece cada haplotipo, también se observa diferencias genéticas entre los grupos aunque menos pronunciadas ($F_{ST}=0,026$, $P=0,008$).

Tabla 3.5. Resultados del análisis de la varianza molecular utilizando las distancias genéticas calculadas por el método par a par entre las secuencias de D-loop de los dos grupos de delfín mular en el Archipiélago Canario: Canarias Tt-1 y Canarias Tt-2.

Fuente de la variación	Varianza	Porcentaje del total	ϕ_{ST}	P
Entre poblaciones	2,441	49,32	0,493	<0,0001***
Dentro de poblaciones	2,508	50,68		

***Significativo estadísticamente al nivel $\alpha=0,001$



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Figura 3.2. Árbol filogenético construido por el método *Neighbor Joining* a partir de distancias genéticas calculadas par a par para la población de delfín mular del Archipiélago Canario. Los números en las ramas indican los valores *bootstrap* mayores al 30%.

3.1.2. El calderón tropical

Haplotipos

Hay 11 haplotipos de región control distintos en las 33 muestras de calderón tropical procedentes de Tenerife y Gran Canaria (Tabla 3.6.). El haplotipo más común (GM-CAN-A) está representado por 15 individuos (45,45%) de ambas áreas de muestreo. El segundo haplotipo más frecuente, con 6 animales (18,18%), es el GM-CAN-E que también es compartido por las dos islas. Encontramos otros tres haplotipos con tan sólo 2 representantes cada uno (6,06%): los haplotipos GM-CAN-C y GM-CAN-G con animales sólo de Gran Canaria y el haplotipo GM-CAN-D con animales sólo de Tenerife. Los 6 animales restantes, 5 muestreados en Gran Canaria y uno en Tenerife tienen todos haplotipos distintos (Tabla 3.7.). Las secuencias completas pueden consultarse en el anexo I.

Las diferencias par a par entre las secuencias de los distintos haplotipos han sido de 1 a 5 mutaciones (0,25%-1,24%). (Ver anexo III, tabla III.2.).

Polimorfismo

En las 402 bases que se han secuenciado, se han detectado tan sólo 7 posiciones polimórficas (1,74%) con una mutación en cada una de ellas, incluyendo 5 transiciones y 2 transversiones ($R=2,5$). Se ha encontrado también una delección dinucleotídica en las posiciones 103 y 104 que es exclusiva de las dos muestras del haplotipo GM-CAN-C.

Tabla 3.6. Muestras de *Globicephala macrorhynchus* secuenciadas. H: hembra, M: macho, N: necropsia, B: biopsia, Tf: Tenerife, GC: Gran Canaria. El animal de La Gomera se considera del área de muestreo Tf debido a la proximidad geográfica y a que se trata de un animal varado.

<i>Muestra</i>	<i>Nº archivo</i>	<i>Haplotipo</i>	<i>Sexo</i>	<i>Fecha de muestreo</i>	<i>B/N</i>	<i>Lugar de muestreo</i>	<i>Área de muestreo</i>
Gm-Can1	Gm23	GM-CAN-A	M	28/07/96	N	Los Cristianos, Tenerife	Tf
Gm-Can2	Gm11	GM-CAN-B	H	26/02/92	N	Caleta, Tenerife	Tf
Gm-Can3	Gm329/97	GM-CAN-C	H	16/09/97	N	La Cicer, Gran Canaria	GC
Gm-Can4	GmV-28/2	GM-CAN-A	M	28/02/99	N	San Sebastián, La Gomera	Tf
Gm-Can5	Gm1-28/2	GM-CAN-A	H	28/02/99	B	28°06',480N / 16°48',744W	Tf
Gm-Can6	Gm2-28/2	GM-CAN-D	H	28/02/99	B	28°06',480N / 16°48',744W	Tf
Gm-Can7	Gm3-28/2	GM-CAN-A	H	28/02/99	B	28°06',480N / 16°48',744W	Tf
Gm-Can8	Gm4-28/2	GM-CAN-D	M	28/02/99	B	28°06',480N / 16°48',744W	Tf
Gm-Can9	Gm5-28/2	GM-CAN-A	H	28/02/99	B	28°06',480N / 16°48',744W	Tf
Gm-Can10	Gm6-28/2	GM-CAN-A	M	28/02/99	B	28°06',480N / 16°48',744W	Tf
Gm-Can11	Gm7-28/2	GM-CAN-A	H	28/02/99	B	28°06',480N / 16°48',744W	Tf
Gm-Can12	Gm1-1/3	GM-CAN-E	H	01/03/99	B	28°09',355N / 16°53',377W	Tf
Gm-Can13	Gm2-1/3	GM-CAN-A	H	01/03/99	B	28°09',355N / 16°53',377W	Tf
Gm-Can14	CT1-1/3	GM-CAN-A	H	01/03/99	B	28°00',956N / 16°45',314W	Tf
Gm-Can15	Gm1-14/6	GM-CAN-F	H	14/06/99	B	27°41',832N / 15°45',620W	GC
Gm-Can16	Gm2-14/6	GM-CAN-G	H	14/06/99	B	27°41',514N / 15°45',276W	GC
Gm-Can17	Gm3-14/6	GM-CAN-A	H	14/06/99	B	27°41',242N / 15°44',854W	GC

Tabla 3.6. (Continuación). Muestras de *Globicephala macrorhynchus* secuenciadas. H: hembra, M: macho, N: necropsia, B: biopsia, Tf: Tenerife, GC: Gran Canaria. El animal de La Gomera se considera del área de muestreo Tf debido a la proximidad geográfica y a que se trata de un animal varado.

<i>Muestra</i>	<i>Nº archivo</i>	<i>Haplotipo</i>	<i>Sexo</i>	<i>Fecha de muestreo</i>	<i>B/N</i>	<i>Lugar de muestreo</i>	<i>Área de muestreo</i>
Gm-Can18	Gm4-14/6	GM-CAN-E	H	14/06/99	B	27°41',073N / 15°44',604W	GC
Gm-Can19	Gm5-14/6	GM-CAN-E	M	14/06/99	B	27°40',790N / 15°44',482W	GC
Gm-Can20	Gm6-14/6	GM-CAN-E	H	14/06/99	B	27°40',584N / 15°44',228W	GC
Gm-Can21	Gm1-15/6	GM-CAN-A	H	15/06/99	B	27°46',899N / 15°51',167W	GC
Gm-Can22	Gm2-15/6	GM-CAN-E	H	15/06/99	B	27°46',991N / 15°51',176W	GC
Gm-Can23	Gm1-19/6	GM-CAN-G	M	19/06/99	B	27°40',220N / 15°45',390W	GC
Gm-Can24	Gm1-10/7	GM-CAN-E	H	10/07/99	B	27°40',622N / 15°43',923W	GC
Gm-Can25	Gm1-12/7	GM-CAN-A	H	12/07/99	B	27°40',732N / 15°46',243W	GC
Gm-Can26	Gm1-14/7	GM-CAN-H	H	14/07/99	B	27°40',409N / 15°45',768W	GC
Gm-Can27	Gm1-30/8	GM-CAN-I	M	30/08/99	B	27°38',797N / 15°38',117W	GC
Gm-Can28	Gm2-30/8	GM-CAN-J	H	30/08/99	B	27°38',848N / 15°38',368W	GC
Gm-Can29	Gm1-26/3/00	GM-CAN-C	H	26/03/00	B	27°40',880N / 15°49',608W	GC
Gm-Can30	Gm2-26/3/00	GM-CAN-K	M	26/03/00	B	27°41',255N / 15°49',699W	GC
Gm-Can31	Gm1-12/5/00	GM-CAN-A	M	12/05/00	B	28°12',831N / 15°34',323W	GC
Gm-Can32	Gm1-14/5/00	GM-CAN-A	H	14/05/00	B	27°42',075N / 15°50',451W	GC
Gm-Can33	Gm2-14/5/00	GM-CAN-A	M	14/05/00	B	27°41',895N / 15°50',409W	GC

La diversidad haplotípica para la región secuenciada es $0,767 \pm 0,067$ y la diversidad nucleotídica es $0,004 \pm 0,0005$. Una representación de la diversidad nucleotídica en intervalos de 30 pb indica que esta diversidad no está distribuida de forma homogénea a lo largo de la secuencia, sino que se encuentra concentrada en los extremos 5' y 3' de la misma, siendo la región central muy conservada (Figura 3.3.). En las 60 primeras bases, la diversidad nucleotídica está alrededor del 1,6% y en las 100 últimas está cerca del 0,7%, mientras que en el resto de la secuencia no hay diversidad, es decir que las bases son idénticas en todas las secuencias analizadas.

Tabla 3.7. Lugares variables en las 402 bases secuenciadas para la región control de los 11 haplotipos de calderón tropical. Los números corresponden a las posiciones de los lugares variables dentro de la secuencia. Los puntos (.) indican identidad y los guiones (-) deleciones con respecto a la secuencia superior (GM-CAN-A). Se indica el número de individuos para cada haplotipo por áreas de muestreo (como definidas en la tabla 3.6.) y en total (n). En negrita se indican los haplotipos pertenecientes al grupo Canarias Gm-2 tal y como se ha definido en el texto. El asterisco (*) indica la sustitución que diferencia los haplotipos de los grupos Canarias Gm-1 y Canarias Gm-2.

Haplotipos	113 333			Áreas de muestreo		
	13	001	259	Tf	GC	n
	801	342	671			
	*					
GM-CAN-A	TAT	TAG	TCC	9	6	15
GM-CAN-B	CT.	1	-	1
GM-CAN-C	C..	--.	...	-	2	2
GM-CAN-DA	...	2	-	2
GM-CAN-E	.CA	1	5	6
GM-CAN-F	.CAT.	-	1	1
GM-CAN-GA	.T.	-	2	2
GM-CAN-H	.CA	..A	...	-	1	1
GM-CAN-I	.CAT	-	1	1
GM-CAN-J	..A	-	1	1
GM-CAN-KT.	-	1	1

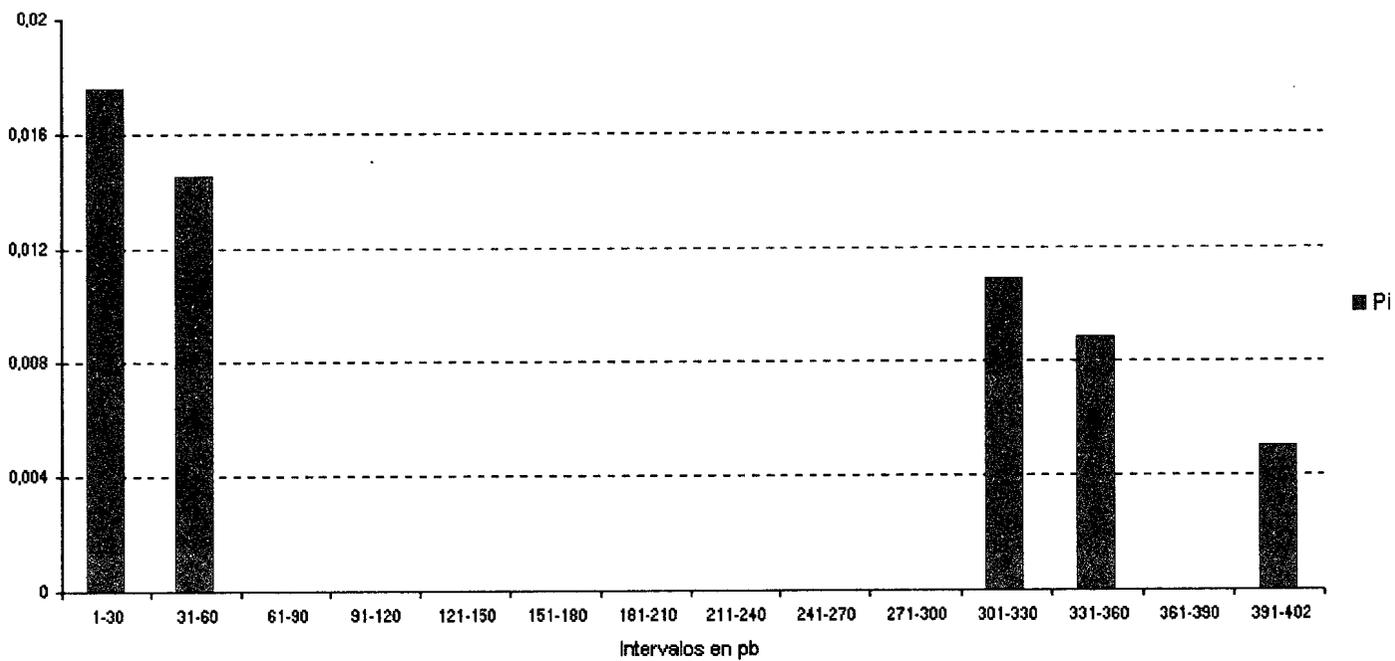


Figura 3.3. Diversidad nucleotídica π (Pi) de la región control, en intervalos de 30 bases, en el calderón tropical del Archipiélago Canario.

Tabla 3.8. Lugares polimórficos de la región control del ADNmt en la población canaria de calderón tropical, considerando los lugares polimórficos simples y múltiples. En paréntesis se indican las posiciones de los lugares dentro de la secuencia.

	Simple	2
<i>Lugares polimórficos</i>	De dos variantes	(326, 391)
	Múltiples	5
	De dos variantes	(8, 10, 31, 312, 357)
<i>Lugares polimórficos totales</i>		7

Estructura de las poblaciones de calderón tropical en el Archipiélago Canario

Los resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) indicaron la presencia de subdivisión en la población teniendo en cuenta las áreas de muestreo. Tanto utilizando valores de distancia genética y frecuencia de haplotipos (ϕ_{ST}) como utilizando tan sólo la frecuencia haplotípica (F_{ST}), los resultados indicaron que aproximadamente el 9,5% de la varianza molecular puede ser explicada por diferencias entre poblaciones pertenecientes a las áreas de muestreo de Tenerife y Gran Canaria (Tabla 3.9).

La división de las muestras por sexos o por animales varados y vivos no dio diferencias significativas. Tanto para los cálculos de ϕ_{ST} como de F_{ST} los resultados fueron muy cercanos a cero con una $P > 0,05$ ($\phi_{ST} = -0,032$, $P = 0,69$ y $F_{ST} = -0,035$, $P = 0,84$ para la división por sexos y $\phi_{ST} = 0,089$, $P = 0,10$ y $F_{ST} = -0,039$, $P = 0,59$ para la división por varamientos y biopsias).

Tabla 3.9. Resultados del análisis de la varianza molecular teniendo en cuenta las distancias genéticas entre las secuencias de D-loop calculadas por el método par a par y la frecuencia haplotípica (ϕ_{ST}) y sólo la frecuencia haplotípica (F_{ST}) de dos posibles poblaciones de calderón tropical en el Archipiélago Canario: Tenerife y Gran Canaria.

	% varianza entre poblaciones	% varianza dentro de poblaciones	ϕ_{ST}/F_{ST}	P
AMOVA usando información sobre distancia genética y frecuencia haplotípica (ϕ_{ST})	9,56	90,44	0,096	0,045
AMOVA usando solamente frecuencias de haplotipos (F_{ST})	9,52	90,48	0,095	0,017

Al igual que en el caso de los delfines mulares, al hacer una representación en forma de árbol cladístico de la estructura de la población se observó una nueva subdivisión de la misma. El árbol, representado por el método de *Neighbor Joining* y comprobado con un test *bootstrap* de filogenia con 1000 réplicas, indica una clara separación entre los haplotipos GM-CAN-E, GM-CAN-F, GM-CAN-H, GM-CAN-J y GM-CAN-K y el resto de haplotipos (Figura 3.4). Excepto una muestra del haplotipo GM-CAN-E, que fue tomada en Tenerife, el resto de muestras que componen el grupo Canarias Gm-2 fueron biopsias obtenidas en Gran Canaria. Al analizar con más detalle la secuencia de los haplotipos mencionados se observó que existe una diferencia fija entre la secuencias de ambos grupos y es la sustitución de una T por una A en la posición 31 (Tabla 3.7.).

La división de la población canaria de calderón tropical en dos subgrupos Canarias Gm-1 y Canarias Gm-2 se comprobó estadísticamente mediante un análisis de la varianza. Si se tiene en cuenta tan sólo la frecuencia con la que aparecen los haplotipos en cada grupo, la varianza entre grupos contribuye a la varianza total con un 38,94% ($F_{ST}=0,389$, $P<0,0001$) en cambio si se considera también las diferencias entre las

secuencias esta contribución es mucho mayor, alcanzando el 62,35% ($\phi_{ST} = 0,624$, $P < 0,0001$) (Tabla 3.10.).

Tabla 3.10. Resultados del análisis de la varianza molecular utilizando las distancias genéticas calculadas por el método par a par entre las secuencias de D-loop de los dos grupos de calderón tropical en el Archipiélago Canario: Canarias Gm-1 y Canarias Gm-2.

Fuente de la variación	Varianza	Porcentaje del total	ϕ_{ST}	P
Entre poblaciones	0,889	62,35	0,624	<0,0001***
Dentro de poblaciones	0,537	37,65		

***Significativo estadísticamente al nivel $\alpha=0,001$

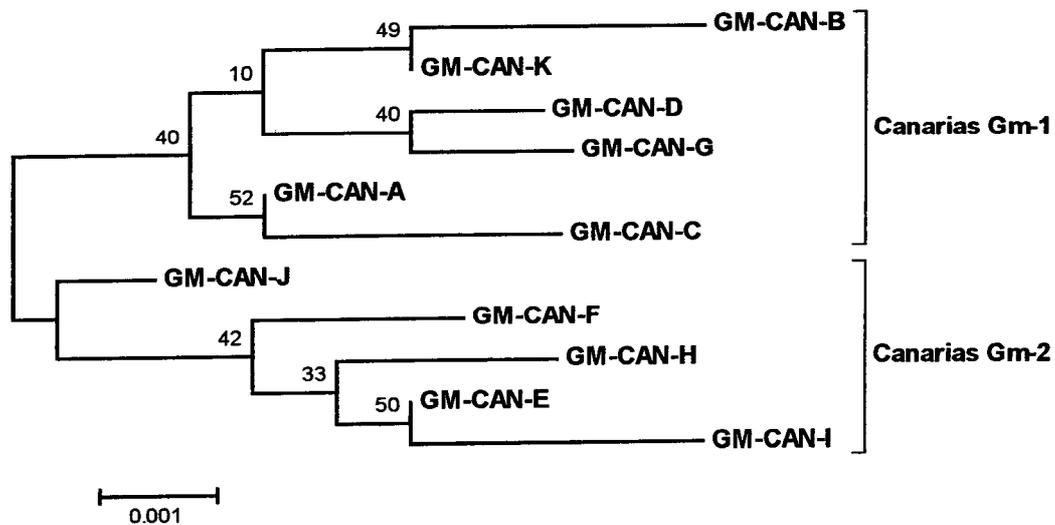


Figura 3.4. Árbol filogenético construido por el método *Neighbor Joining* a partir de distancias genéticas calculadas par a par para la población de calderón tropical del Archipiélago Canario. Los números en las ramas indican los valores *bootstrap* mayores al 30%.

3.1.3. El delfín común

Haplotipos

En las 28 secuencias analizadas se han detectado 21 haplotipos. El más abundante (DD-CAN-C) aparece en cinco animales (17,86%), dos de ellos procedentes del área de muestreo Lanzarote-Fuerteventura, uno del oeste de Gran Canaria y dos de Tenerife, uno muestreado al oeste de la isla y otro varado al este de la misma. Este haplotipo es compartido también por un animal perteneciente a la población del Mar Negro (3Dd2sb-BS1) (Rosel *et al.*, 1994). El segundo haplotipo más abundante es DD-CAN-N que aparece en dos animales muestreados al sur de Gran Canaria y uno al norte de esta isla (10,71%) y el tercer haplotipo en abundancia es DD-CAN-D que aparece en dos muestras, tomadas al norte de Tenerife y oeste de Gran Canaria (7,14%). Los 18 haplotipos restantes son únicos (Tabla 3.11.). Las secuencias completas aparecen en el anexo I.

Las diferencias par a par entre las secuencias de los distintos haplotipos fueron de 1 a 12 mutaciones (0,30%-3,00%). (Ver anexo III, tabla III.3.).

Polimorfismo

En las 398 pb aparecieron 25 posiciones nucleotídicas polimórficas (Tablas 3.12. y 3.13.), es decir un 6,28% del número total de bases, en las que se encuentran 28 mutaciones que son las que definen los haplotipos mencionados anteriormente. De estas mutaciones, 22 son transiciones y 6 son transversiones ($R=3,66$). No se han hallado deleciones al alinear todos los haplotipos de delfín común.

Tabla 3.11. Muestras de *Delphinus delphis* secuenciadas. H: hembra, M: macho, N: necropsia, B: biopsia, ETf: este de Tenerife, NTf: norte de Tenerife, Wf: oeste de Tenerife, NGC: norte de Gran Canaria, WGC: oeste de Gran Canaria, SGC: sur de Gran Canaria, Lz:-Fv: Lanzarote-Fuerteventura (se considera una única área de muestreo debido a la proximidad geográfica y por tratarse de animales varados).

<i>Muestra</i>	<i>Nº archivo</i>	<i>Haplotipo</i>	<i>Sexo</i>	<i>Fecha de muestreo</i>	<i>B/N</i>	<i>Lugar de muestreo</i>	<i>Área de muestreo</i>
Dd-Can1	Dd15	DD-CAN-A	H	12/04/95	N	Candelaria	ETf
Dd-Can2	Dd301/96	DD-CAN-B	H	04/04/96	N	Arico	ETf
Dd-Can3	Dd	DD-CAN-C	M	06/03/97	N	-----	Lz-Fv
Dd-Can4	Dc1-22/4/97	DD-CAN-D	M	22/04/97	B	28°38',833N / 16°15',933W	NTf
Dd-Can5	Dc2-22/4/97	DD-CAN-E	M	22/04/97	B	28°38',833N / 16°15',933W	NTf
Dd-Can6	Dd189/98	DD-CAN-F	H	02/03/98	N	Isla de Lobos	Lz-Fv
Dd-Can7	Ddv2	DD-CAN-C	H	12/04/98	N	Candelaria	ETf
Dd-Can8	Dd24	DD-CAN-C	H	04/05/98	N	Puerto del Rosario	Lz-Fv
Dd-Can9	Dc2-20/2	DD-CAN-G	M	20/02/99	B	27°51',575N / 15°56',153W	WGC
Dd-Can10	Dc1-27/2	DD-CAN-H	H	27/02/99	B	28°07',324N / 16°49',706W	Wf
Dd-Can11	Dc4-27/2	DD-CAN-I	M	27/02/99	B	28°07',324N / 16°49',706W	Wf
Dd-Can12	Dc7-27/2	DD-CAN-J	H	27/02/99	B	28°07',440N / 16°50',489W	Wf
Dd-Can13	Dc1-1/3	DD-CAN-C	H	01/03/99	B	28°06',825N / 16°47',158W	Wf
Dd-Can14	Dc1-2/3	DD-CAN-K	H	02/03/99	B	28°09',626N / 16°49',739W	Wf

Tabla 3.11. (Continuación). Muestras de *Delphinus delphis* secuenciadas. H: hembra, M: macho, N: necropsia, B: biopsia, ETf: este de Tenerife, NTf: norte de Tenerife, WTF: oeste de Tenerife, NGC: norte de Gran Canaria, WGC: oeste de Gran Canaria, SGC: sur de Gran Canaria, Lz:-Fv: Lanzarote-Fuerteventura (se considera una única área de muestreo debido a la proximidad geográfica y por tratarse de animales varados).

<i>Muestra</i>	<i>Nº archivo</i>	<i>Haplotipo</i>	<i>Sexo</i>	<i>Fecha de muestreo</i>	<i>B/N</i>	<i>Lugar de muestreo</i>	<i>Área de muestreo</i>
Dd-Can15	Dc1-25/3	DD-CAN-L	M	25/03/99	B	28°11',208N / 15°16',393W	NGC
Dd-Can16	Dc2-25/3	DD-CAN-M	M	25/03/99	B	28°09',322N / 15°14',716W	NGC
Dd-Can17	Dc3-25/3	DD-CAN-N	H	25/03/99	B	28°08',731N / 15°14',597W	NGC
Dd-Can18	Dc1-22/4	DD-CAN-O	M	22/04/99	B	27°44',608N / 15°50',877W	SGC
Dd-Can19	Dc3-22/4	DD-CAN-P	H	22/04/99	B	27°45',272N / 15°50',995W	SGC
Dd-Can20	Dc3-23/4	DD-CAN-N	M	23/04/99	B	27°39',993N / 15°43',426W	SGC
Dd-Can21	Dc1-23/1/00	DD-CAN-D	M	23/01/00	B	27°56',686N / 16°01',397W	WGC
Dd-Can22	Dc2-23/1/00	DD-CAN-Q	M	23/01/00	B	27°56',635N / 16°01',366W	WGC
Dd-Can23	Dc1-24/3/00	DD-CAN-R	M	24/03/00	B	27°40',857N / 15°48',223W	SGC
Dd-Can24	Dc1-27/3/00	DD-CAN-S	H	27/03/00	B	27°38',651N / 15°40',323W	SGC
Dd-Can25	Dc1-28/3/00	DD-CAN-N	M	28/03/00	B	27°42',662N / 15°49',953W	SGC
Dd-Can26	Dc1-29/3/00	DD-CAN-T	M	29/03/00	B	28°05',573N / 15°52',659W	WGC
Dd-Can27	Dc1-30/3/00	DD-CAN-C	H	30/03/00	B	28°04',578N / 15°53',088W	WGC
Dd-Can28	Ddv-13/6/00	DD-CAN-U	H	13/06/00	N	Las Palmas de Gran Canaria	NGC

Tabla 3.12. Lugares variables en las 398 bases secuenciadas para la región control de los 21 haplotipos de delfín común. Los números corresponden a las posiciones de los lugares variables dentro de la secuencia. Los puntos (.) indican identidad con respecto a la secuencia superior (DD-CAN-A). Se indica el número de individuos para cada haplotipo por áreas de muestreo (como definidas en tabla1) y en total (n). En negrita se indican los haplotipos pertenecientes al grupo Canarias Dd-2 tal y como se ha definido en el texto. El asterisco (*) indica la sustitución que diferencia los haplotipos de los grupos Canarias Dd-1 y Canarias Dd- 2.

Haplotipos	11111112	222222222	23333	Área de muestreo							n
	3800114440	4477778899	91258	Lz-Fv	NTf	Wf	ETf	NGC	WGC	SGC	
	8645467892	2556890901	92037								
			*								
DD-CAN-A	CCACTAATTT	CATCTTCTTC	GAATC	-	-	-	1	-	-	-	1
DD-CAN-B	..GT.....	.G..CC.C..	-	-	-	1	-	-	-	1
DD-CAN-C	...T.....	.C...C.CC.	2	-	1	1	-	1	-	5
DD-CAN-D	...T...A.	.GC...C..	T.G.T	-	1	-	-	-	1	-	2
DD-CAN-E	...T.....	.C.T.C..C.	...T	-	1	-	-	-	-	-	1
DD-CAN-F	...T.....	.C.....CC.	1	-	-	-	-	-	-	1
DD-CAN-G	...TC.....	TG...C.CC.	...CT	-	-	-	-	-	1	-	1
DD-CAN-H	A..T..G..C	.G...TCC.	..G.T	-	-	1	-	-	-	-	1
DD-CAN-I	...T.....	.C...CTCC.	...T	-	-	1	-	-	-	-	1
DD-CAN-J	...T.....	.G...C.CC.	.C...	-	-	1	-	-	-	-	1
DD-CAN-K	...T.....	.C..CC..C.	-	-	1	-	-	-	-	1
DD-CAN-L	...T..G..C	.G...TCC.	..G.T	-	-	-	-	1	-	-	1
DD-CAN-M	A.....GA.C	.G...TCC.	..G.T	-	-	-	-	1	-	-	1
DD-CAN-NG.....	-	-	-	-	1	-	2	3
DD-CAN-O	A.GT.....	.G..CCTC..	-	-	-	-	-	-	1	1
DD-CAN-P	AT.T...A.	.GC.....	T.G.T	-	-	-	-	-	-	1	1
DD-CAN-Q	A..T.....C	.C...C.CC.	-	-	-	-	-	1	-	1
DD-CAN-R	...T.....	.G..CC.CC.	AG...	-	-	-	-	-	-	1	1
DD-CAN-S	A..T.....	.C...C.CC.	-	-	-	-	-	-	1	1
DD-CAN-T	A...G....	.G.....C.	A....	-	-	-	-	-	1	-	1
DD-CAN-U	...T.....	.C...C.CCT	-	-	-	-	1	-	-	1

Tabla 3.13. Lugares polimórficos de la región control del ADNmt en la población canaria de delfín común, considerando las variantes dobles y triples para los lugares polimórficos simples y múltiples. En paréntesis se indican las posiciones de los lugares dentro de la secuencia.

<i>Lugares polimórficos simples</i>	De dos variantes	8 (86, 114, 116, 148, 242, 276, 291, 353)
	De tres variantes	1 (312)
<i>Lugares polimórficos múltiples</i>	De dos variantes	14 (38, 104, 105, 147, 149, 202, 275, 278, 279, 280, 289, 290, 320, 387)
	De tres variantes	2 (245, 299)
<i>Lugares polimórficos totales</i>		25

Considerando las posiciones polimórficas múltiples se ha hallado una región altamente variable, desde la base 275 hasta la 299, con un 36% de posiciones variables.

Al calcular la diversidad nucleotídica de la región control, en intervalos de 30 bases a lo largo de la secuencia, se ha observado un pico en el que la diversidad nucleotídica alcanza un valor cercano al 9%, entre las bases 271 y 300, mientras que en el resto de la secuencia la diversidad nucleotídica es muy baja, no superando apenas el 2% (Figura 3.5.). Esto es consistente con la región altamente variable definida anteriormente.

Para la totalidad de la secuencia, la diversidad nucleotídica promedio para las muestras de delfín común del Archipiélago Canario ha sido $\pi=0,015 \pm 0,001$ y la diversidad haplotípica, $h=0,963 \pm 0,024$.

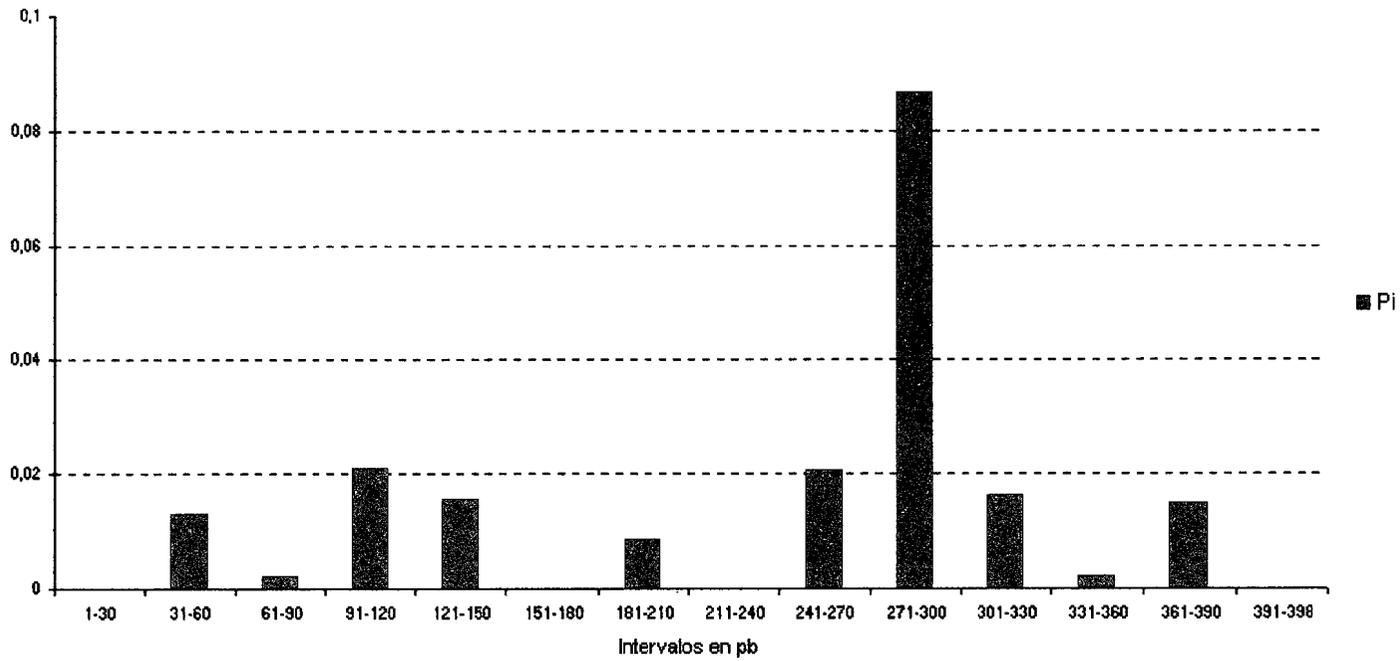


Figura 3.5. Diversidad nucleotídica π (P_i) de la región control, en intervalos de 30 bases, en el delfín común del Archipiélago Canario.

Estructura de las poblaciones de delfín común en el Archipiélago Canario

Puesto que el delfín común es una especie transeúnte en las Islas Canarias, carece de sentido el suponer la existencia de una diferenciación interinsular. Sin embargo, teniendo en cuenta que las muestras han sido obtenidas en diferentes años, podría resultar interesante comprobar si existe diferenciación genética temporal entre estos animales, es decir si los animales que visitan cada año el Archipiélago proceden de una misma población de origen o no. Con este fin se han clasificado las muestras por períodos anuales, durante 4 años consecutivos de muestreo (1997-2000) y se ha determinado el grado de diferenciación entre los años. No se consideraron los años 1995 y 1996 por contener tan sólo una muestra cada uno.

Los resultados del test exacto y del AMOVA no indicaron diferenciación significativa ($P < 0,05$) entre las muestras tomadas en distintos años.

El resultado del test exacto fue $P = 0,98$ mientras que para el análisis de la varianza tanto el valor de F_{ST} como el de ϕ_{ST} fueron aproximadamente 0 con una $P > 0,05$ (Tabla 3.14.) lo que indica que las muestras de delfín común no muestran diferencias genéticas de unos años a otros por lo que constituyen un único grupo heterogéneo sin diferenciación temporal.

Los animales muestreados tampoco presentan diferencias genéticas cuando se clasifican por sexos ($\phi_{ST} = 0,006$, $P = 0,344$ y $F_{ST} = 0,014$, $P = 0,173$), ni se aprecian diferencias desde el punto de vista genético entre los animales que se muestrearon en vivo y los que vararon en las islas ($\phi_{ST} = 0,059$, $P = 0,090$ y $F_{ST} = 0,037$, $P = 0,085$).

La ausencia de estructuración en la población según los criterios citados anteriormente queda patente en la representación del árbol filogenético, construido por el método *Neighbor Joining* (Figura 3.6.). Sin embargo, se aprecia que los haplotipos no

forman un grupo único, sino que la población se subdivide en dos grupos que se han denominado Canarias Dd-1 y Canarias Dd-2.

Tabla 3.14. Resultados del análisis de la varianza molecular teniendo en cuenta las distancias genéticas entre las secuencias de D-loop calculadas por el método par a par y la frecuencia haplotípica (ϕ_{ST}) y sólo la frecuencia haplotípica (F_{ST}) de cuatro posibles poblaciones de delfín común en el Archipiélago Canario: 1997, 1998, 1999 y 2000.

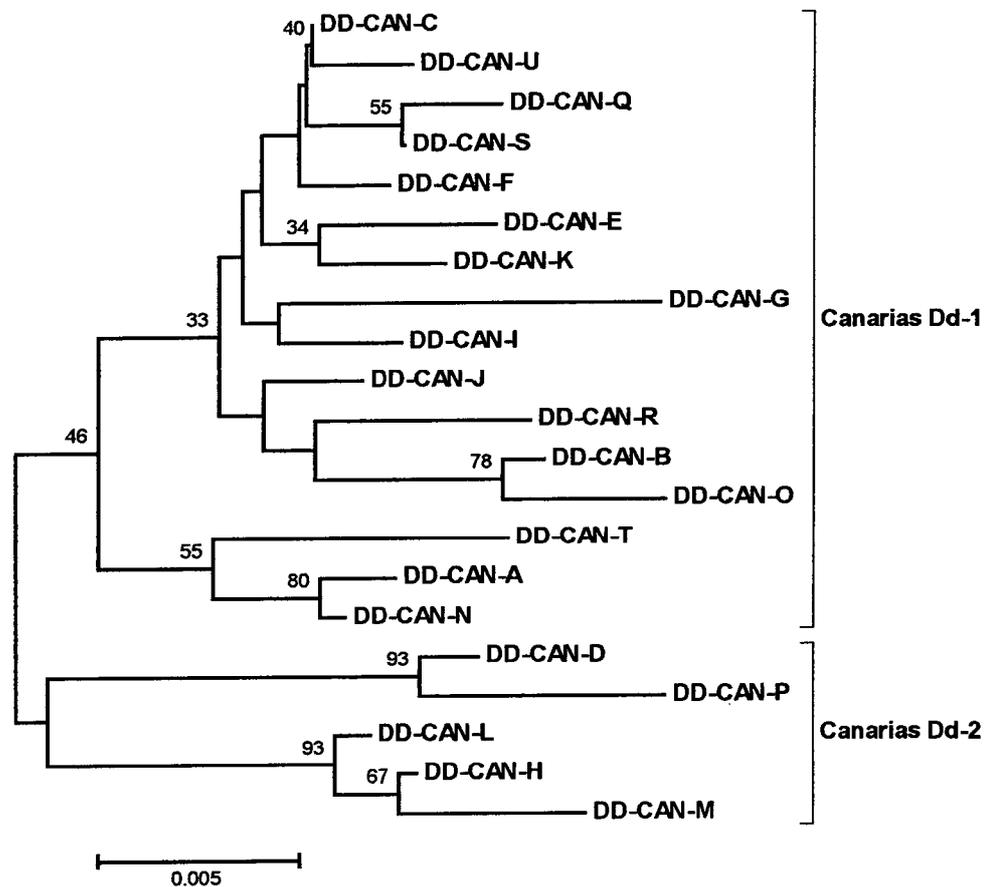
	% varianza entre poblaciones	% varianza dentro de poblaciones	ϕ_{ST} / F_{ST}	P
AMOVA usando información sobre distancia genética y frecuencia haplotípica (ϕ_{ST})	0	100	-0,011	0,52
AMOVA usando solamente frecuencias de haplotipos (F_{ST})	0	100	-0,008	0,61

Al someter la población de delfín común de Canarias, subestructurada de esta forma, a análisis estadísticos, se obtiene la confirmación de que, efectivamente, los haplotipos DD-CAN-D, DD-CAN-H, DD-CAN-L, DD-CAN-M y DD-CAN-P, que constituyen el grupo Canarias Dd-2, están genéticamente más relacionados entre ellos que con el resto de haplotipos, es decir, el grupo Canarias Dd-1. Mediante un análisis de la varianza se ha comprobado si es significativa la contribución de la diferencia entre grupos a la diferencia genética total que existe en la población y los resultados han dado positivos tanto teniendo en cuenta únicamente la frecuencia de los haplotipos que conforman los grupos ($F_{ST} = 0,061$, $P=0,022$) como teniendo en cuenta también las diferencias genéticas entre estos haplotipos ($\phi_{ST}=0,44$, $P<0,0001$) (Tabla 3.15.).

Tabla 3.15. Resultados del análisis de la varianza molecular utilizando las distancias genéticas calculadas por el método par a par entre las secuencias de D-loop de los dos grupos de delfín común en el Archipiélago Canario: Canarias Dd-1 y Canarias Dd-2.

Fuente de la variación	Varianza	Porcentaje del total	ϕ_{ST}	P
Entre poblaciones	1,864	43,99	0,440	<0,0001***
Dentro de poblaciones	2,373	56,01		

***Significativo estadísticamente al nivel $\alpha=0,001$



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Figura 3.6. Árbol filogenético construido por el método *Neighbor Joining* a partir de distancias genéticas calculadas par a par para la población común del Archipiélago Canario. Los números en las ramas indican los valores *bootstrap* mayores al 30%.

3.1.4. El rorcual tropical

Haplotipos

Durante los meses de verano y principios de otoño del año 1999 se realizaron varios avistamientos de rorcual tropical en el Archipiélago Canario. Se tuvo la ocasión de tomar 8 muestras de biopsia de estos animales, de las cuales se han secuenciado 415 pb de la región control del ADNmt.

Excepto una de las muestras, procedente de Fuerteventura, todas las demás se tomaron al sur de Gran Canaria, en la franja marina desde el Barranco de Arguinegún a la Punta de Tauro, a una distancia media de la costa de unas 7 millas náuticas (Tabla 3.16).

La determinación del sexo de los animales por técnicas moleculares, permitió identificar a cuatro machos y cuatro hembras.

Para el fragmento secuenciado no se encontró variabilidad entre los individuos, perteneciendo todos al mismo haplotipo (ver anexo I).

Tabla 3.16. Muestras de *Balaenoptera edeni* secuenciadas. H: hembra, M: macho, B: biopsia, SGC: sur de Gran Canaria, Fv: Fuerteventura.

<i>Muestra</i>	<i>Nº archivo</i>	<i>Haplotipo</i>	<i>Sexo</i>	<i>Fecha de muestreo</i>	<i>B/N</i>	<i>Lugar de muestreo</i>	<i>Área de muestreo</i>
Be-Can1	Be1-11/7	BE-CAN-A	H	11/07/99	B	27°39',798N / 15°43',367W	SGC
Be-Can2	Be2-11/7	BE-CAN-A	H	11/07/99	B	27°37',277N / 15°42',506W	SGC
Be-Can3	Be1-29/8	BE-CAN-A	M	29/08/99	B	27°39',097N / 15°44',160W	SGC
Be-Can4	Be2-29/8	BE-CAN-A	M	29/08/99	B	27°40',235N / 15°46',078W	SGC
Be-Can5	Be3-29/8	BE-CAN-A	M	29/08/99	B	27°40',543N / 15°45',354W	SGC
Be-Can6	Be1-30/8	BE-CAN-A	H	30/08/99	B	27°42',365N / 15°48',232W	SGC
Be-Can7	Be1-4/9	BE-CAN-A	H	04/09/99	B	27°39',946N / 15°42',787W	SGC

3.1.5. Identificación molecular de un zifio de Gervais

El 30 de agosto de 1999, se produjo un avistamiento de tres zifios a una distancia aproximada de 8,5 millas náuticas de Puerto Rico (Gran Canaria) y en aguas con una profundidad de 1243 m. (27°39',584N/15°48',373W). Posiblemente se tratara de un macho y dos hembras (Martín, com. pers.).

A través de la fotoidentificación de los animales se barajó la posibilidad de que pudiesen ser zifios de True (*Mesoplodon mirus*). De esta especie se conoce un varamiento en Lanzarote el 31 de marzo de 1984, sin embargo, nunca se han observado ejemplares vivos en el Archipiélago Canario (Martín, 1998).

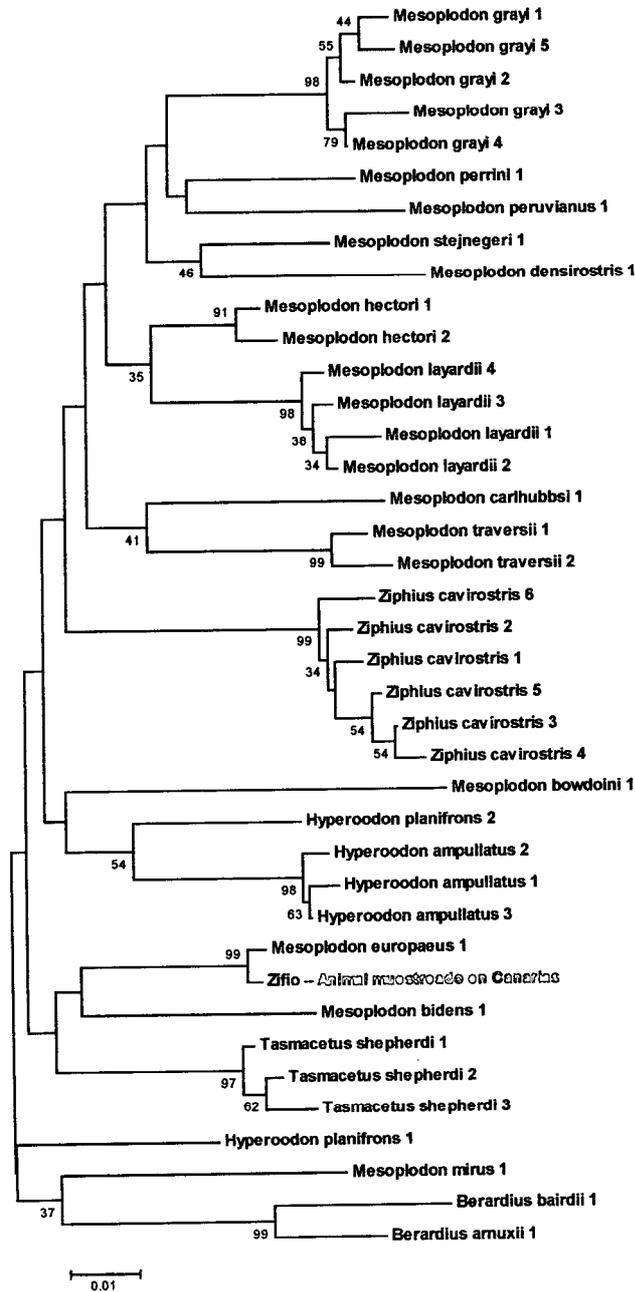
Gracias a la obtención de una biopsia de uno de los tres animales, se pudo secuenciar un fragmento de 363 pb de la región D-loop que se utilizó para identificar genéticamente la especie. La secuencia completa aparece en el anexo I.

La secuencia obtenida se cotejó con todas las secuencias de las distintas especies de la familia Ziphiidae disponibles en la base de datos Genbank. (Benson *et al.*, 1993). La coincidencia más elevada entre la secuencia del zifio muestreado y una de las secuencias de la base de datos fue de un 99,17%, con tan sólo tres diferencias en los 363 pb comparados y correspondió a un zifio de Gervais (*Mesoplodon europaeus*). Las diferencias con la secuencia de un zifio de True, en cambio, fueron 26 (92,83% de coincidencia).

Al representar en un árbol filogenético el fragmento común entre todas las secuencias de referencia y la secuencia "problema" (Figura 3.7.), utilizando el método *Neighbor Joining* y el cálculo de distancias par a par, el animal muestreado en Gran Canaria quedó incluido con un valor *bootstrap* de 99 en un mismo grupo con el único zifio de Gervais presente en la base de datos.

Esta especie se conoce en Canarias por más de una decena de varamientos ocurridos en las islas de Lanzarote, Fuerteventura y Tenerife, desde el año 1985. Sin embargo, hasta 1998 no se produjo el primer avistamiento en el mar (Carrillo & Martín, 1999) y desde entonces han sido muy escasos.





© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

Figura 3.7. Reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre las distintas especies de la familia Ziphiidae de la base de datos Genbank y el individuo no identificado muestreado en Canarias. Los números que aparecen en las ramas indican el valor *bootstrap*.

3.2. El gen COI

Han sido secuenciados 950 pb del gen COI en 25 cetáceos pertenecientes a 9 especies distintas (2 especies de misticetos y 7 especies de odontocetos).

Para cada una de las dos especies de misticetos secuenciadas se observó un único haplotipo, al igual que para las dos muestras de cachalote. Las demás muestras de odontocetos tuvieron todas haplotipos distintos. Así pues, en las 25 muestras secuenciadas se encontraron 20 haplotipos diferentes (Tabla 3.17.). Las secuencias detalladas aparecen en el anexo I.

Entre secuencias de la misma especie la menor diferencia, 0,11%, se encontró entre dos delfines moteados (SF-CAN-I y SF-CAN-II) y entre dos delfines mulares (TT-CAN-II Y TT-CAN-III). Este valor fue además la mínima diferencia de todas las encontradas. La diferencia intraespecífica máxima fue 3,26%, entre otros dos delfines mulares (TT-CAN-II y TT-CAN-IV). Las diferencias interespecíficas variaron de 0,84% (delfín moteado, SF-CAN-IV - delfín común, DD-CAN-I) a 17,89% (cachalote, PM-CAN-I - delfín listado, SC-CAN-II). Esta última fue también la diferencia máxima del total de los datos (ver anexo III, tabla III.4.). Las divergencias medias intra e interespecíficas se muestran en la tabla 3.18.

Para todo el conjunto de especies, el número de posiciones variables dentro de las 950 posiciones totales fue 303 (31,89%), en las que se encontraron 367 mutaciones. De éstas, 256 fueron transiciones y 111 fueron transversiones ($R=2,3$). No se encontraron deleciones al comparar las secuencias. La mayoría de las mutaciones ocurrieron en la tercera posición del codón (305) mientras que las mutaciones en la primera y segunda posición fueron menos frecuentes (53 y 9 respectivamente).

Tabla 3.17. Muestras secuenciadas para el gen COI. H: hembra, M: macho, N: necropsia, B: biopsia, Tf: Tenerife, NGC: norte de Gran Canaria, WGC: oeste de Gran Canaria, SGC: sur de Gran Canaria, Fv: Fuerteventura.

<i>Nº archivo</i>	<i>Haplotipo</i>	<i>Familia</i>	<i>Especie</i>	<i>Sexo</i>	<i>Fecha de muestreo</i>	<i>B/N</i>	<i>Lugar de muestreo</i>	<i>Área de muestreo</i>
SUBORDEN: MISTICETOS								
Bpv-15/4/00	BP-CAN-I	Balaenopteridae	Rorcual común (<i>Balaenoptera physalus</i>)	H	14/05/00	N	Majanicho	Fv
Bpv-45	BP-CAN-I	Balaenopteridae	Rorcual común (<i>Balaenoptera physalus</i>)	H	20/01/01	N	Las Palmas de Gran Canaria	NGC
Be2-11/7	BE-CAN-I	Balaenopteridae	Rorcual tropical (<i>Balaenoptera edeni</i>)	H	11/07/99	B	27°37',277N / 15°42',506W	SGC
Be1-29/8	BE-CAN-I	Balaenopteridae	Rorcual tropical (<i>Balaenoptera edeni</i>)	M	22/04/97	B	27°39',097N / 15°44',160W	SGC
Be1-30/8	BE-CAN-I	Balaenopteridae	Rorcual tropical (<i>Balaenoptera edeni</i>)	H	02/03/98	B	27°42',365N / 15°48',232W	SGC
Be1-4/9	BE-CAN-I	Balaenopteridae	Rorcual tropical (<i>Balaenoptera edeni</i>)	H	12/04/98	B	27°39',946N / 15°42',787W	SGC
SUBORDEN: ODONTOCETOS								
Sf-369/96	SF-CAN-I	Delphinidae	Delfín moteado (<i>Stenella frontalis</i>)	H	05/05/96	N	Fuerteventura	Fv
Dm7-29/10	SF-CAN-II	Delphinidae	Delfín moteado (<i>Stenella frontalis</i>)	H	29/10/99	B	27°59',256N / 14°23',417W	Fv
Dm1-14/4/00	SF-CAN-III	Delphinidae	Delfín moteado (<i>Stenella frontalis</i>)	M	14/04/00	B	28°34',070N / 14°46',212W	Fv
Sf-266/00	SF-CAN-IV	Delphinidae	Delfín moteado (<i>Stenella frontalis</i>)	M	28/04/00	N	Tenerife	Tf
Sc2-20/10	SC-CAN-I	Delphinidae	Delfín listado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	H	20/10/99	B	28°14',009N / 15°24',348W	NGC
Sc3-20/10	SC-CAN-II	Delphinidae	Delfín listado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	H	20/10/99	B	28°13',934N / 15°24',461W	NGC
DI2-23/4/00	SC-CAN-III	Delphinidae	Delfín listado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	H	23/04/00	B	27°39',639N / 15°45',073W	SGC
Dd-184/97	DD-CAN-I	Delphinidae	Delfín común (<i>Delphinus delphis</i>)	M	20/04/97	N	Las Palmas de Gran Canaria	NGC
Dc2-25/3	DD-CAN-II	Delphinidae	Delfín común (<i>Delphinus delphis</i>)	M	25/03/99	B	28°09',322N / 15°14',716W	NGC
Dc3-22/4	DD-CAN-III	Delphinidae	Delfín común (<i>Delphinus delphis</i>)	H	22/04/99	B	27°45',272N / 15°50',995W	SGC
Tt1-15/7	TT-CAN-I	Delphinidae	Delfín mular (<i>Tursiops truncatus</i>)	M	15/07/99	B	28°04',969N / 15°47',915W	WGC
Tt1-30/8	TT-CAN-II	Delphinidae	Delfín mular (<i>Tursiops truncatus</i>)	M	30/08/99	B	27°39',117N / 15°39',020W	SGC
Tt1-4/9	TT-CAN-III	Delphinidae	Delfín mular (<i>Tursiops truncatus</i>)	M	04/09/99	B	27°38',720N / 15°42',713W	SGC
Tt1-8/9	TT-CAN-IV	Delphinidae	Delfín mular (<i>Tursiops truncatus</i>)	H	08/09/99	B	27°40',975N / 15°46',471W	SGC
Gm1--28/2	GM-CAN-I	Delphinidae	Calderón tropical (<i>Globicephala macrorhynchus</i>)	H	28/02/99	B	28°06',480N / 16°48',744W	Tf
Gm2-14/6	GM-CAN-II	Delphinidae	Calderón tropical (<i>Globicephala macrorhynchus</i>)	H	14/06/99	B	27°41',514N / 15°45',276W	SGC
Mes-30/8	ME-CAN-I	Ziphiidae	Zifio de Gervais (<i>Mesoplodon europaeus</i>)	H	30/08/99	B	27°39',584N / 15°48',373W	SGC
Pm1-28/4/00	PM-CAN-I	Physeteridae	Cachalote (<i>Physeter macrocephalus</i>)	M	28/04/00	B	27°44',651N / 15°51',956W	SGC
Pm-338/00	PM-CAN-I	Physeteridae	Cachalote (<i>Physeter macrocephalus</i>)	M	12/06/00	N	Los Gigantes	Tf

Tabla 3.18. Porcentaje de divergencia media entre secuencias de ADN dentro de una misma especie (π) (a lo largo de la diagonal) y entre especies (D_{xy}) (debajo de la diagonal) y sus errores estándar para el gen COI en varias especies de cetáceos. BP: rorcual común, BE: rorcual tropical, SF: delfín moteado, SC: delfín listado, DD: delfín común, TT: delfín mular, GM: calderón tropical, ME: zifio de Gervais, PM: cachalote. N: número de individuos secuenciados.

	BP (N = 2)	BE (N = 4)	SF (N = 4)	SC (N = 3)	DD (N = 3)	TT (N = 4)	GM(N=2)	ME (N = 1)	PM (N = 2)
BP	0								
BE	8,21 ± 0,87	0							
SF	15,32 ± 1,14	14,16 ± 1,12	0,30 ± 0,13						
SC	15,40 ± 1,16	14,39 ± 1,13	1,55 ± 0,32	1,19 ± 0,30					
DD	15,54 ± 1,16	14,56 ± 1,12	1,31 ± 0,31	1,58 ± 0,29	0,91 ± 0,23				
TT	14,58 ± 1,09	13,03 ± 1,03	13,80 ± 1,08	13,89 ± 1,08	13,61 ± 1,07	2,49 ± 0,39			
GM	14,42 ± 1,11	13,05 ± 1,09	14,74 ± 1,13	14,82 ± 1,13	14,68 ± 1,13	5,63 ± 0,65	0,53 ± 0,24		
ME	15,16 ± 1,04	14,21 ± 1,02	15,42 ± 1,11	15,19 ± 1,10	15,12 ± 1,11	15,18 ± 1,06	14,89 ± 1,13	-	
PM	16,42 ± 1,18	17,37 ± 1,21	17,71 ± 1,18	17,44 ± 1,15	17,19 ± 1,18	16,61 ± 1,14	17,74 ± 1,24	16,53 ± 1,17	0

La gran mayoría de las mutaciones fueron cambios sinónimos (238), es decir, que al traducir la secuencia de ADN a una secuencia de aminoácidos (aa) la mutación no cambió el aa resultante. De los 316 aa obtenidos a partir de la secuencia de ADN, 35 (11,07%) fueron informativos.

En la tabla 3.19. se detallan las mutaciones por especie, clasificadas según su posición en el codón y según si han originado aa informativos. En tres de las especies de delfín en las que hubo mutaciones interespecíficas en sus secuencias de ADN (delfín moteado, delfín listado y delfín común), se observa que al traducir esas secuencias a aminoácidos todos los cambios son sinónimos, por lo que al nivel peptídico no existen diferencias ni inter ni intraespecíficas. Los únicos miembros de la familia Delphinidae que presentan una secuencia de aa distinta a la de los demás delfines son el delfín mular y el calderón tropical, que además muestran diferencias interespecíficas (Tabla 3.20.).

Tabla 3.19. Número de mutaciones, mutaciones por posición en el codón, cambios sinónimos y aminoácidos informativos para el gen COI en las diferentes especies de cetáceos secuenciadas. BP: rorcual común, BE: rorcual tropical, SF: delfín moteado, SC: delfín listado, DD: delfín común, TT: delfín mular, GM: calderón tropical, ME: zifio de Gervais, PM: cachalote. Los guiones (-) indican que el valor no se pudo calcular por disponer de un único haplotipo para la especie.

	Mutaciones	Mutaciones 1 ^a pos.	Mutaciones 2 ^a pos.	Mutaciones 3 ^a pos.	Cambios sinónimos	Aminoácidos informativos
BP	0	0	0	0	0	0
BE	0	0	0	0	0	0
SF	5	1	0	4	5	0
SC	17	1	0	16	17	0
DD	13	2	0	11	13	0
TT	36	9	1	26	27	9
GM	5	2	0	3	3	2
ME	-	-	-	-	-	-
PM	0	0	0	0	0	0



Al nivel peptídico la diversidad media dentro y entre especies es mucho menor que al nivel de ADN, puesto que la mayoría de las mutaciones no producen aa distintos (Tabla 3.21).

La diversidad haplotípica para el gen COI en todas las muestras fue $0,973 \pm 0,022$ y la diversidad nucleotídica $0,117 \pm 0,008$. La representación en intervalos de 30 pb de la diversidad nucleotídica (Figura 3.8.), muestra que ésta se encuentra repartida de forma homogénea a lo largo de toda la secuencia y que no hay regiones conservadas entre las distintas especies.

Tabla 3.20. Aminoácidos variables en la cadena peptídica que resulta de la traducción de las secuencias de COI del ADNmt de cada haplotipo. Los números indican la posición que el aa ocupa en la cadena peptídica. Ver detalles de los haplotipos en la tabla 1 y la secuencia de aa completa en el anexo 1.

Haplotipos de ADN	111	1111122222	2222222222	2333
	2246668011	2359901233	3457788899	9011
	5770483117	9902893968	9858925701	5701
BP-CAN-I	AVAVALTIGI	IPVVTAADV	LHMNTAHMFV	LGRR
BE-CAN-IT.....
SF-CAN-II.IPTQV..	M...
SF-CAN-III.IPTQV..	M...
SF-CAN-IIII.IPTQV..	M...
SF-CAN-IVI.IPTQV..	M...
SC-CAN-II.IPTQV..	M...
SC-CAN-III.IPTQV..	M...
SC-CAN-IIII.IPTQV..	M...
DD-CAN-II.IPTQV..	M...
DD-CAN-III.IPTQV..	M...
DD-CAN-IIII.IPTQV..	M...
TT-CAN-I	...V.A.AS	T....PI.I	.QI.P..VLL	.SWW
TT-CAN-II	...V.A.AS	TL..S.P.Y.	.QI.S.Y.LL	.SWW
TT-CAN-III	...V.A.AS	TL..S.P.Y.	.QI.S.Y.LL	.SWW
TT-CAN-IV	...V.A.AS	T....PI.I	.QI.P....L	.SWW
GM-CAN-I	VMT..F....SDPIY.	IQI.S.Y.LL	.SWW
GM-CAN-II	VMT..F....SDP.Y.	.QI.S.Y.LL	.SWW
ME-CAN-I	.A.....S..V..
PM-CAN-I	...I...V..	..II.....	...DP..L..

Tabla 3.21. Porcentaje de divergencia media entre secuencias de aa dentro de una misma especie (a lo largo de la diagonal) y entre especies (debajo de la diagonal) y sus errores estándar para el gen COI en varias especies de cetáceos. BP: rorcual común, BE: rorcual tropical, SF: delfín moteado, SC: delfín listado, DD: delfín común, TT: delfín mular, GM: calderón tropical, ME: zifio de Gervais, PM: cachalote. N: número de individuos secuenciados.

	BP (N = 2)	BE (N = 4)	SF (N = 4)	SC (N = 3)	DD (N = 3)	TT (N = 3)	GM(N=2)	ME (N = 1)	PM (N = 2)
BP	0								
BE	0,32 ± 0,31	0							
SF	2,22 ± 0,80	1,90 ± 0,74	0						
SC	2,22 ± 0,80	1,90 ± 0,74	0	0					
DD	2,22 ± 0,80	1,90 ± 0,74	0	0	0				
TT	5,38 ± 1,13	5,70 ± 1,18	6,17 ± 1,22	6,17 ± 1,22	6,17 ± 1,22	1,79 ± 0,56			
GM	5,70 ± 1,20	6,01 ± 1,25	6,96 ± 1,36	6,96 ± 1,36	6,96 ± 1,36	4,59 ± 1,03	0,63 ± 0,44		
ME	0,95 ± 0,53	1,27 ± 0,63	2,22 ± 0,81	2,22 ± 0,81	2,22 ± 0,81	5,70 ± 1,15	5,70 ± 1,20	-	
PM	2,22 ± 0,81	2,53 ± 0,86	3,48 ± 0,98	3,48 ± 0,98	3,48 ± 0,98	7,04 ± 1,27	7,59 ± 1,37	2,53 ± 0,87	0

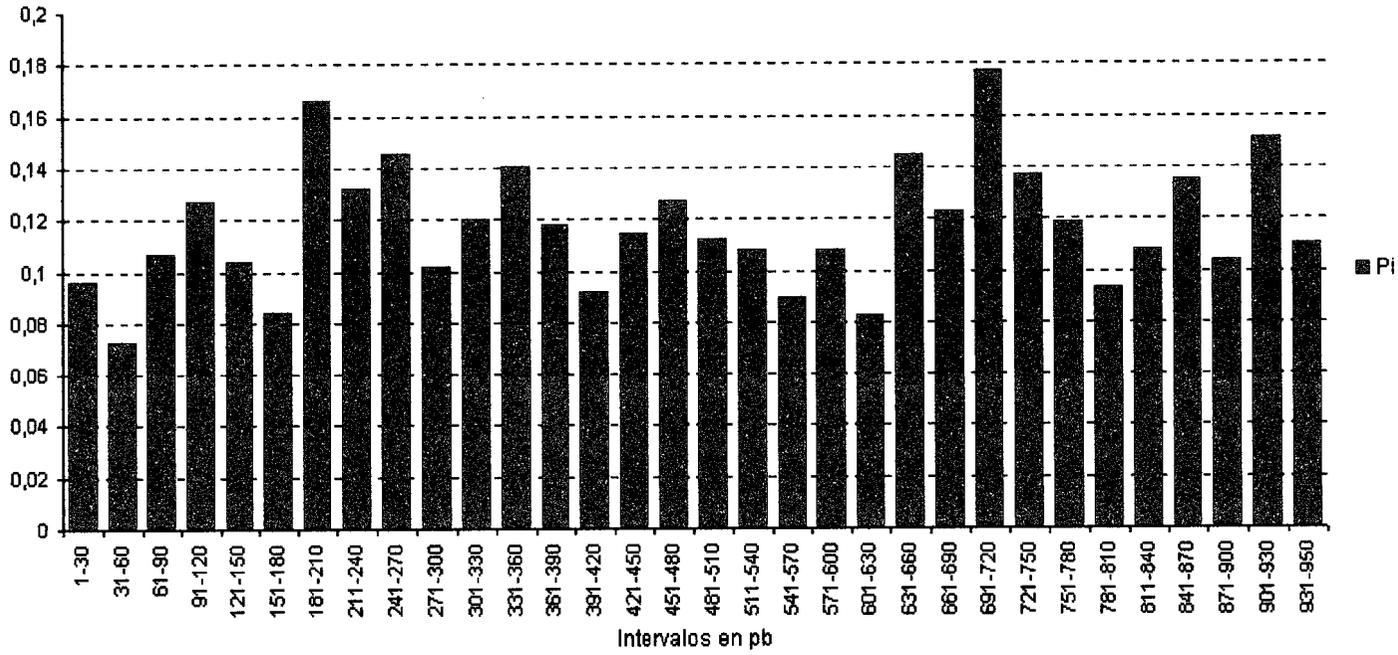
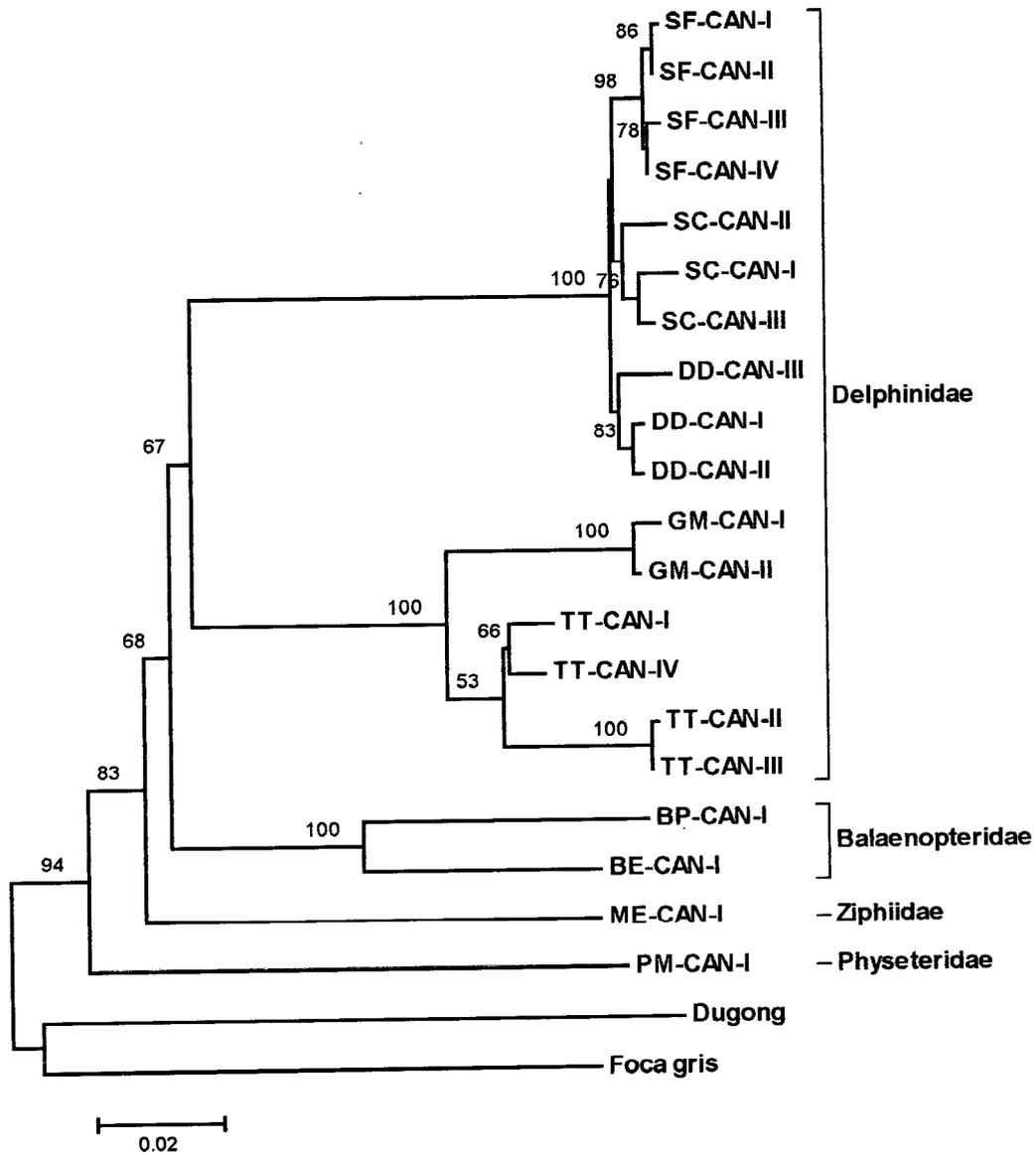


Figura 3.8. Diversidad nucleotídica π (Pi) del gen COI, en intervalos de 30 bases, considerando las 9 especies de cetáceos.



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Figura 3.9. Árbol filogenético construido por el método *Neighbor Joining* a partir de distancias genéticas en el gen COI, calculadas por el algoritmo de Jukes-Cantor para diversas especies de cetáceos. BP: rorcual común, BE: rorcual tropical, SF: delfín moteado, SC: delfín listado, DD: delfín común, TT: delfín mular, GM: calderón tropical, ME: zifio de Gervais, PM: cachalote. Como grupos externos se han utilizado el dugón (*Dugong dugong*) y la foca gris (*Halichoerus grypus*).

El árbol construido por el método *Neighbor Joining* a partir de distancias calculadas por el algoritmo de Jukes-Cantor, muestra una clara separación entre los haplotipos pertenecientes a las distintas familias de cetáceos secuenciadas. Dentro de las familias se observa además una mayor cercanía entre haplotipos pertenecientes al mismo género (Figura 3.9). Como grupo externo se han utilizado las secuencias del COI del dugón (*Dugong dugong*) y la foca gris (*Halichoerus grypus*) extraídas de la base de datos Genbank (números de acceso: AJ421723 y X72004) (Árnason *et al.*, 1993b; Árnason *et al.*, 2002).



3.3. El gen *NADH5*

Se han secuenciado 927 pb del gen *NADH5* para 20 individuos pertenecientes a 8 especies de cetáceos distintas (2 especies de mysticetos y 6 especies de odontocetos).

Las 20 secuencias representan 15 haplotipos diferentes. Excepto en dos especies, el rorcual común y el cachalote, en las que no se ha observado variabilidad entre las secuencias, para todas las demás especies representadas por más de una muestra se ha hallado también más de un haplotipo (Tabla 3.22.). Las secuencias detalladas aparecen en el anexo I.

La mínima diferencia intraespecífica, se halló entre dos rorcuales comunes (BE-CAN-2 y BE-CAN-3) y fue del 0,11%. Este valor representa también el mínimo de todas las secuencias. La diferencia máxima (14,35%) fue entre dos parejas de delfín mular (TT-CAN-1 y TT-CAN-2; TT-CAN-2 y TT-CAN-4) y entre la pareja de delfines comunes. Entre especies, la menor diferencia (1,08%) se halló entre un delfín mular (TT-CAN-3) y el delfín listado y entre uno de los haplotipos de calderón tropical y un delfín común (GM-CAN-1 y DD-CAN-1). La mayor (18,40%), fue la hallada entre los rorcuales comunes y un delfín común (DD-CAN-2). En la tabla 3.23. se muestran las divergencias medias intra e interespecíficas y en el anexo III (tabla III.5.) pueden consultarse los valores de distancia entre haplotipos.

Considerando todas las secuencias, se encontraron 309 posiciones variables de las 927 totales (33,33%). El número total de mutaciones fue 346, 262 de las cuales fueron transiciones y 84 fueron transversiones ($R=3,11$). Al alinear las secuencias se encontraron también varias deleciones. Una de ellas es la deleción de un fragmento de 9 pb desde la posición 536 a la posición 544 que ocurre en 6 haplotipos de especies distintas (SC-CAN-1, DD-CAN-1, TT-CAN-2, TT-CAN-3, GM-CAN-1 y GM-CAN-2). Estos mismos

individuos tienen otra deleción en la posición 780. Los dos haplotipos de calderón tropical tienen además una deleción en la base 752 y el haplotipo GM-CAN-1 tiene otra deleción doble en las posiciones 289 y 290.

La deleción del fragmento de 9 pb se pudo confirmar por secuenciación en ambos sentidos (tanto desde el extremo 5' como desde el extremo 3') en los haplotipos SC-CAN-1, DD-CAN-1 y GM-CAN-1. Sin embargo, en los haplotipos TT-CAN-2, TT-CAN-3 y GM-CAN-2 se observó que dicha deleción aparecía sólo en la secuencia leída desde el extremo 5', lo que podría ser el indicio de una posible heteroplasmia.

La mayoría de las mutaciones ocurrieron en la tercera posición del codón (229), mientras que las mutaciones en la primera y segunda posición fueron menos frecuentes (75 y 42 respectivamente). De estas mutaciones, 222 fueron cambios sinónimos y de los 309 aa obtenidos al traducir la secuencia de ADN, 72 (23,30%) fueron informativos.

En la tabla 3.24. se han clasificado las mutaciones en la cadena de ADN según la posición del codón en la que han ocurrido y se indica el número de cambios sinónimos y aminoácidos informativos para cada una de las especies, considerando los haplotipos que no tuvieron deleciones. Para esos mismos haplotipos, se indica, en la tabla 3.25, las mutaciones de aa por especies.

Al contrario de lo que sucedía con el gen COI, las de delfines cuyas secuencias de ADN eran distintas muestran también diferencias en su secuencia de aa. La única especie en la que todas las mutaciones en los nucleótidos son sinónimas es el rorcual tropical. Como se puede observar en la tabla 3.22. las secuencias de ADN de los tres animales analizados presentaron un 0,22% de divergencia entre las secuencias de ADN. Sin embargo, al traducir las secuencias a aa se obtiene el mismo haplotipo, siendo nula la diversidad entre ellos (Tablas 3.24. y 3.25.).

Tabla 3.22. Muestras secuenciadas para el gen NADH5. H: hembra, M: macho, N: necropsia, B: biopsia, Tf: Tenerife, NGC: norte de Gran Canaria, WGC: oeste de Gran Canaria, SGC: sur de Gran Canaria, Fv: Fuerteventura, Lz: Lanzarote.

<i>Nº archivo</i>	<i>Haplotipo</i>	<i>Familia</i>	<i>Especie</i>	<i>Sexo</i>	<i>Fecha de muestreo</i>	<i>B/N</i>	<i>Lugar de muestreo</i>	<i>Área de muestreo</i>
SUBORDEN: MISTICETOS								
Bpv-15/4/00	BP-CAN-1	Balaenopteridae	Rorcual común (<i>Balaenoptera physalus</i>)	H	14/05/00	N	Majanicho	Fv
Bpv-45	BP-CAN-1	Balaenopteridae	Rorcual común (<i>Balaenoptera physalus</i>)	H	20/01/01	N	Las Palmas de Gran Canaria	NGC
Be2-11/7	BE-CAN-1	Balaenopteridae	Rorcual tropical (<i>Balaenoptera edeni</i>)	H	11/07/99	B	27°37',277N / 15°42',506W	SGC
Be1-29/8	BE-CAN-2	Balaenopteridae	Rorcual tropical (<i>Balaenoptera edeni</i>)	M	22/04/97	B	27°39',097N / 15°44',160W	SGC
Be1-30/8	BE-CAN-3	Balaenopteridae	Rorcual tropical (<i>Balaenoptera edeni</i>)	H	02/03/98	B	27°42',365N / 15°48',232W	SGC
SUBORDEN: ODONTOCETOS								
Dm1-14/4/00	SF-CAN-1	Delphinidae	Delfín moteado (<i>Stenella frontalis</i>)	M	14/04/00	B	28°34',070N / 14°46',212W	Fv
DI2-23/4/00	SC-CAN-1	Delphinidae	Delfín listado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	H	23/04/00	B	27°39',639N / 15°45',073W	SGC
Dc2-25/3	DD-CAN-1	Delphinidae	Delfín común (<i>Delphinus delphis</i>)	M	25/03/99	B	28°09',322N / 15°14',716W	NGC
Dc3-22/4	DD-CAN-2	Delphinidae	Delfín común (<i>Delphinus delphis</i>)	H	22/04/99	B	27°45',272N / 15°50',995W	SGC
Tt1-15/7	TT-CAN-1	Delphinidae	Delfín mular (<i>Tursiops truncatus</i>)	M	15/07/99	B	28°04',969N / 15°47',915W	WGC
Tt1-30/8	TT-CAN-2	Delphinidae	Delfín mular (<i>Tursiops truncatus</i>)	M	30/08/99	B	27°39',117N / 15°39',020W	SGC
Tt1-4/9	TT-CAN-3	Delphinidae	Delfín mular (<i>Tursiops truncatus</i>)	M	04/09/99	B	27°38',720N / 15°42',713W	SGC
Tt1-8/9	TT-CAN-4	Delphinidae	Delfín mular (<i>Tursiops truncatus</i>)	H	08/09/99	B	27°40',975N / 15°46',471W	SGC
Gm1--28/2	GM-CAN-1	Delphinidae	Calderón tropical (<i>Globicephala macrorhynchus</i>)	H	28/02/99	B	28°06',480N / 16°48',744W	Tf
Gm2-28/2	GM-CAN-1	Delphinidae	Calderón tropical (<i>Globicephala macrorhynchus</i>)	H	28/02/99	B	28°06',480N / 16°48',744W	Tf
Gm2-30/8	GM-CAN-2	Delphinidae	Calderón tropical (<i>Globicephala macrorhynchus</i>)	H	30/08/99	B	27°38',848N / 15°38',368W	SGC
Pm-310/96	PM-CAN-1	Physeteridae	Cachalote (<i>Physeter macrocephalus</i>)	H	09/04/96	N	Costa norte	NGC
Pm-83/97	PM-CAN-1	Physeteridae	Cachalote (<i>Physeter macrocephalus</i>)	H	11/02/97	N	Arrecife	Lz
Pm1-28/4/00	PM-CAN-1	Physeteridae	Cachalote (<i>Physeter macrocephalus</i>)	M	28/04/00	B	27°44',651N / 15°51',956W	SGC
Pm-338/00	PM-CAN-1	Physeteridae	Cachalote (<i>Physeter macrocephalus</i>)	M	12/06/00	N	Los Gigantes	Tf

Tabla 3.23. Porcentaje de divergencia media entre secuencias de ADN dentro de una misma especie (π) (a lo largo de la diagonal) y entre especies (D_{xy}) (debajo de la diagonal) y sus errores estándar para el gen NADH5 en varias especies de cetáceos. BP: rorcual común, BE: rorcual tropical, SF: delfín moteado, SC: delfín listado, DD: delfín común, TT: delfín mular, GM: calderón tropical, PM: cachalote. N: número de individuos secuenciados.

	BP (N = 2)	BE (N = 3)	SF (N = 1)	SC (N = 1)	DD (N = 2)	TT (N = 4)	GM(N=3)	PM (N = 4)
BP	0							
BE	7,98 ± 0,89	0,22 ± 0,12						
SF	17,80 ± 1,25	17,87 ± 1,21	-					
SC	16,36 ± 1,16	16,98 ± 1,12	14,07 ± 1,16	-				
DD	16,69 ± 1,05	16,91 ± 1,00	8,97 ± 0,64	9,05 ± 0,72	14,50 ± 1,10			
TT	15,31 ± 0,95	14,96 ± 0,90	9,41 ± 0,64	9,73 ± 0,72	9,65 ± 0,61	11,07 ± 0,75		
GM	15,49 ± 1,10	16,29 ± 1,03	12,50 ± 0,94	5,03 ± 0,59	8,27 ± 0,61	9,42 ± 0,65	4,89 ± 0,57	
PM	16,72 ± 1,17	16,61 ± 1,18	17,04 ± 1,11	18,10 ± 1,21	17,24 ± 0,98	16,87 ± 0,98	17,13 ± 1,13	0

Tabla 3.24. Número de mutaciones, mutaciones por posición en el codón, cambios sinónimos y aminoácidos informativos para el gen NADH5 en las diferentes especies de cetáceos secuenciadas, considerando aquellos haplotipos que no presentaron deleciones: BP: rorcual común, BE: rorcual tropical, SF: delfín moteado, SC: delfín listado, DD: delfín común, TT: delfín mular, PM: cachalote. Los guiones (-) indican que el valor no se pudo calcular por disponer de un único haplotipo.

	Mutaciones	Mutaciones 1 ^a pos.	Mutaciones 2 ^a pos.	Mutaciones 3 ^a pos.	Cambios sinónimos	Aminoácidos informativos
BP	0	0	0	0	0	0
BE	3	2	0	1	3	0
SF	-	-	-	-	-	-
SC	-	-	-	-	-	-
DD	-	-	-	-	-	-
TT	10	5	2	3	5	5
PM	0	0	0	0	0	0

En la tabla 3.26. se indican la diversidad media de la secuencia de aminoácidos, dentro y entre especies, teniendo en cuenta sólo los haplotipos que no presentaron deleciones.

La diversidad haplotípica para el conjunto de muestras secuenciadas para el gen NADH5 fue $0,958 \pm 0,033$ y la diversidad nucleotídica $0,133 \pm 0,006$. Al igual que en el gen COI, la representación de la diversidad nucleotídica en intervalos de 30 pb (Figura 3.10.) muestra que ésta se encuentra repartida de forma homogénea a lo largo de toda la secuencia y que no hay regiones conservadas entre las distintas especies.

El árbol filogenético de la figura 3.11. se ha construido a partir de distancias calculadas por el algoritmo de Jukes-Cantor y utilizando el método *Neighbor Joining*. Como grupo externo se han utilizado las secuencias del COI del dugón (*Dugong dugong*) y la foca gris (*Halichoerus grypus*), extraídas de la base de datos Genbank (números de acceso: AJ421723 y X72004) (Árnason *et al.*, 1993b; Árnason *et al.*, 2002).

Tabla 3.25. Aminoácidos variables en la cadena peptídica que resulta de la traducción de las secuencias de NADH5 del ADNmt de los haplotipos que no presentaron deleciones. Los números indican la posición que el aa ocupa en la cadena peptídica. Ver detalles de los haplotipos en la tabla 3.21. y la secuencia de aa completa en el anexo I.

Haplotipos de ADN	1111111223	6677777888	2266678911	2233344455	6677778888	99900
	6123479029	4704569026	0656881737	1423634528	1245890358	56839
BP-CAN-1	MPLNFMLVAA	VYMKLIVTCI	IYLFAILPLI	LVFAGSTTLK	LVSIMTTMMH	AMTIL
BE-CAN-1TT	.*.S.V....	..V.....TM...	.I..T.....	V....
BE-CAN-2TT	.*.S.V....	..V.....TM...	.I..T.....	V....
BE-CAN-3TT	.*.S.V....	..V.....TM...	.I..T.....	V....
SF-CAN-1	T.PIL.IT..	I.T.F.MMSL	LH.YI.FL..	.I.TEFMNM.	.I.M.NI..Y	MV.LT
DD-CAN-2	T.PIL.IT..	I.T.F.MMSL	LH.YI..L..	MI.TKLMNM.	.I.M.NI..Y	MVILN
TT-CAN-1	..PILVIT..	I.T.F.TMSL	LH.YI.FL..	MI.TELMNM.	.I.M.NI..Y	MVILT
TT-CAN-4	..PIL.IT..	I.T.F.TMSL	LH.YI.FLS.	.I.TEFMNM.	.I.M.NI..Y	MV.LT
PM-CAN-1	ATP.L..M..	IH...ATASL	V....T...T	..YTNHI.SM	MLN....TIY	T....

Tabla 3.26. Porcentaje de divergencia media entre secuencias de aa dentro de una misma especie (a lo largo de la diagonal) y entre especies (debajo de la diagonal) y sus errores estándar para el gen NADH5 en varias especies de cetáceos. BP: rorcual común, BE: rorcual tropical, SF: delfín moteado, DD: delfín común, TT: delfín mular, PM: cachalote. N: número de individuos incluidos en los cálculos.

	BP (N = 2)	BE (N = 3)	SF (N = 1)	DD (N = 1)	TT (N = 2)	PM (N = 4)
BP	0					
BE	3,25 ± 0,98	0				
SF	11,40 ± 1,69	13,03 ± 1,86	-			
DD	11,73 ± 1,73	13,36 ± 1,89	1,95 ± 0,70	-		
TT	11,73 ± 1,69	13,36 ± 1,85	1,47 ± 0,57	2,44 ± 0,74	1,63 ± 0,70	
PM	9,12 ± 1,52	10,42 ± 1,65	12,38 ± 1,67	12,70 ± 1,72	12,70 ± 1,69	0

En el árbol se aprecia una clara separación entre las tres familias de cetáceos muestreadas. Dentro de la familia Balaenopteridae existe además una división confirmada por un valor *bootstrap* del 100% entre las dos especies de rorcuales, el común y el tropical. En cambio, en la familia Delphinidae, no se aprecia una estructura clara por especies, apareciendo incluso en un mismo grupo, animales de géneros distintos. De los dos grupos que forman la familia de los delfines, uno de ellos está compuesto por aquellos individuos que mostraban la delección de 9 pb entre las posiciones 536 y 544 y en la posición 780, aunque éstas no parecen ser las condicionantes de la topología, puesto que la eliminación de las mismas produce un resultado equivalente. También es de resaltar la importancia de la variabilidad intraespecífica en la reconstrucción de las relaciones genéticas, ya que la máxima diferencia encontrada entre el rorcual común y un delfín común no queda reflejada en el dendrograma debido a la inclusión de otros individuos de la especie.

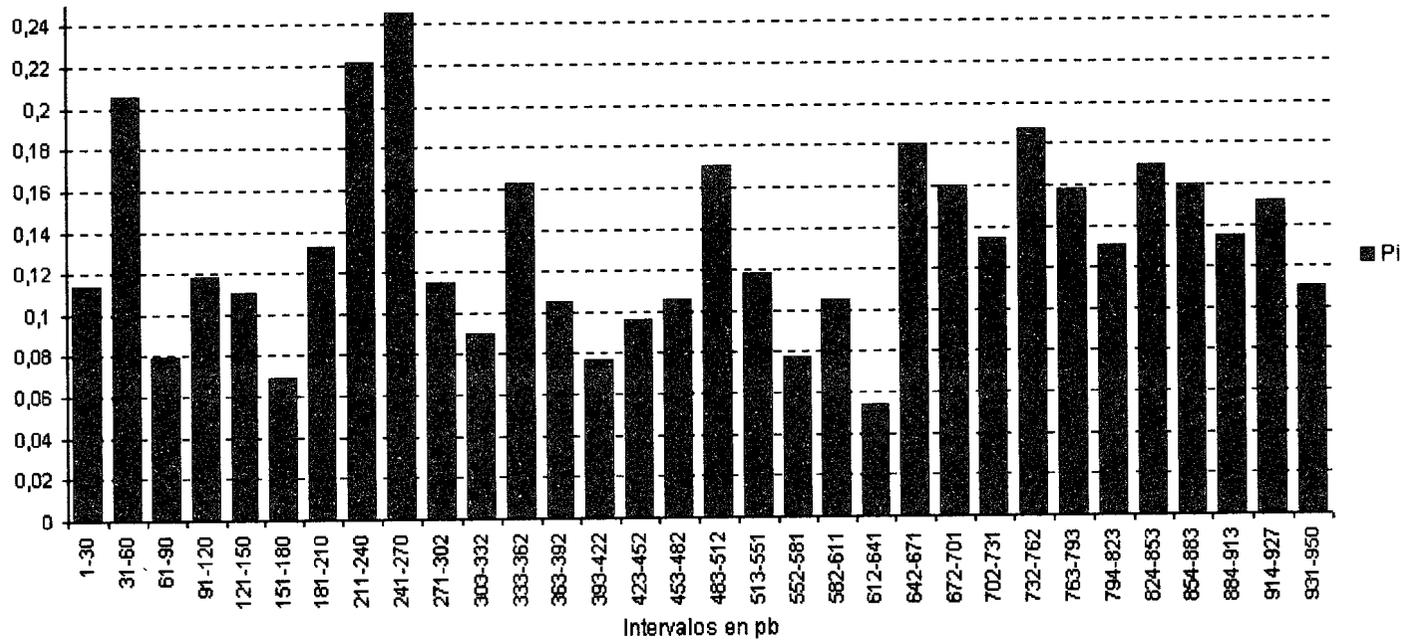


Figura 3.10. Diversidad nucleotídica π (Pi) del gen NADH5, en intervalos de 30 bases, considerando las 8 especies de cetáceos.

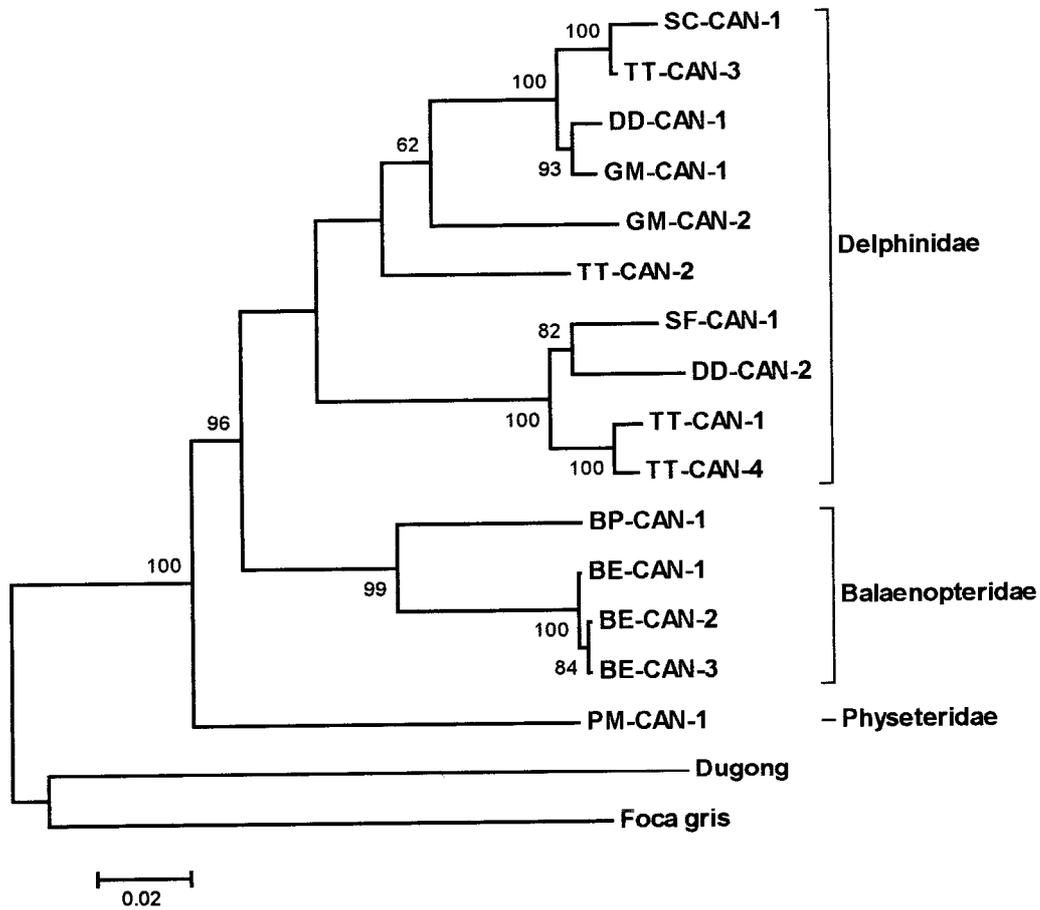
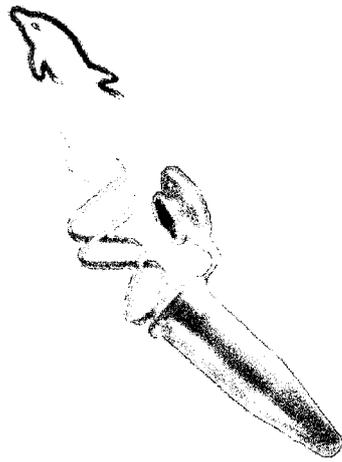


Figura 3.11. Árbol filogenético construido por el método *Neighbor Joining* a partir de distancias genéticas en el gen NADH5, calculadas por el algoritmo de Jukes-Cantor para diversas especies de cetáceos. BP: rorcual común, BE: rorcual tropical, SF: delfín moteado, SC: delfín listado, DD: delfín común, TT: delfín mular, GM: calderón tropical, PM: cachalote. Como grupos externos se han utilizado el dugón (*Dugong dugong*) y la foca gris (*Halichoerus grypus*).



4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1. El delfín mular

Para conocer la relación genética de la población de delfín mular del Archipiélago Canario con otras poblaciones de esta especie, descritas en otros lugares del mundo, se compararon estas muestras con las tomadas en las siguientes áreas: Atlántico noroeste (n=11) (Siemann, 1994), nordeste de las Bahamas (n=6) (Parsons *et al.*, 1999; Parsons, 2001) y China (n= 33) (Wang *et al.*, 1999, Ji *et al.*, 2001). Todas las secuencias de D-loop utilizadas para hacer las comparaciones se obtuvieron de la base de datos de secuencias del National Center for Biotechnology Information (NCBI), GenBank (Benson *et al.*, 1993).

Con el fragmento de la secuencia de D-loop común a todas las muestras (388 pb), se ha calculado la matriz de distancias entre ellas mediante el método de diferencias para a par y se ha hecho una prueba de análisis de la varianza a las secuencias separadas por áreas geográficas. En el caso de las muestras de Canarias, éstas se han subdividido en los dos grupos definidos anteriormente, Canarias Tt-1 y Canarias Tt-2. Los resultados han mostrado que la diversidad genética debida a diferencias entre áreas es de un 42,73% con una $\phi_{ST}=0,427$ ($P<0,0001$). Comparando las poblaciones dos a dos, el índice de fijación (ϕ_{ST}) ha variado entre 0,1146 y 0,7505, siendo mínimo entre la población Canarias Tt-2 y China y máximo entre la población Canarias Tt-2 y Bahamas (Tabla 4.1.).

Al representar los 66 haplotipos, en los que se pueden clasificar todas las muestras citadas anteriormente en un árbol filogenético (Figura 4.1.), se puede apreciar mejor la estructura genética de las poblaciones de delfín mular. En el árbol se han incluido

también dos haplotipos de animales muestreados en Mauritania y Brasil (Wang *et al.*, 1999) y uno del nordeste Atlántico (Parsons *et al.*, 2000) que no se han tenido en cuenta en el análisis de la varianza por tener un tamaño muestral muy pequeño ($n=1$, $n=2$ y $n=1$, respectivamente). Como grupo externo se han utilizado 23 haplotipos de otro morfotipo de delfín mular, el *Tursiops aduncus*, de dos lugares geográficos distintos: China (Wang *et al.*, 1999, Ji *et al.*, 2001) y Australia (Möller & Beheregaray, 2001). Ambos morfotipos se distinguen tanto por rasgos morfológicos, osteológicos, perfiles de hemoglobina, parasitología, dieta y distribución, así como genéticamente (Wang *et al.*, 1999), sugiriendo que podrían tratarse de especies distintas aunque pueden vivir en simpatria, como sucede en aguas chinas.

Tabla 4.1. Índice de fijación (ϕ_{ST}) entre poblaciones de delfín mular de distintas áreas geográficas y su significación estadística (P).

Poblaciones	ϕ_{ST}	P
Canarias Tt-2 - China	0,107	<0,0001 ***
Canarias Tt-1 - Atlántico NO	0,164	<0,0001 ***
China - Atlántico NO	0,243	<0,0001 ***
Canarias Tt-2 - Atlántico NO	0,275	<0,0001 ***
Canarias Tt-1 - China	0,453	<0,0001 ***
Canarias Tt -1 - Canarias Tt-2	0,495	<0,0001 ***
Atlántico NO - Bahamas	0,521	<0,0001 ***
China - Bahamas	0,633	<0,0001 ***
Canarias Tt-1 - Bahamas	0,665	<0,0001 ***
Canarias Tt-2 - Bahamas	0,751	<0,0001 ***

***Significativo estadísticamente al nivel 0,001

En el árbol, el morfotipo *aduncus* queda totalmente aislado del morfotipo *truncatus* (valor *bootstrap* = 98), por lo que ha sido excluido de la representación gráfica. Respecto al morfotipo *truncatus*, éste forma un grupo en el cual no se aprecia una correlación clara entre las relaciones genéticas de las muestras y el origen geográfico de las mismas, a pesar de que la diversidad genética debida a diferencias entre poblaciones (42,73%) es

altamente significativa. Hay un subgrupo compuesto mayoritariamente por los haplotipos hallados en las islas Bahamas, que queda separado del resto aunque relacionados con algunos ejemplares chinos, estos últimos en un pequeño grupo con un valor *bootstrap* de 94.

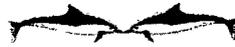
La inclusión de todos los haplotipos descritos hasta el momento, no modifica la estructura de la población Canaria (Figura 3.2.) en los grupos Canarias Tt-1 y Canarias Tt-2. La topología pone de relieve que, mientras todos los haplotipos que constituyen Canarias Tt-2 están genéticamente más relacionadas con los ejemplares chinos y del Atlántico noroeste, todos los ejemplares que forman Canarias Tt-1 lo están sólo con especímenes del Atlántico (Costa este de Estados Unidos, Brasil y Mauritania). Así pues, los ejemplares oceánicos de la población atlántica analizados (Siemann, 1994; Parsons *et al.*, 2000), al igual que los de Canarias, están distribuidos en ambas ramas, lo que podría indicar una característica de las poblaciones atlánticas en las que confluyen haplotipos de distintas influencias. Por otro lado, a pesar de la menor distancia geográfica, el haplotipo de Mauritania está más estrechamente relacionado con el Atlántico nordeste y Brasil que con Canarias. Todas estas relaciones cladísticas están en concordancia con los valores de ϕ_{ST} de la tabla 4.1.

Wang *et al.* (1999) propusieron que los morfotipos *aduncus* y *truncatus* que se hallan en aguas chinas son en realidad especies distintas que cohabitan en simpatría, atendiendo a los niveles de diferenciación entre ambos que hallaron (4,4%). Según los resultados que se muestran en el presente trabajo, la distancia genética entre *T. aduncus* de China y *T. truncatus* de Canarias es incluso algo menor que la citada anteriormente (3,25%), a pesar de que se trata de poblaciones en alopatría, lo que apoya la hipótesis de Wang *et al.* (1999).

La diversidad nucleotídica encontrada para la totalidad de la población canaria fue de un 1,17% \pm 0,11%, siendo la de Canarias Tt-1 de un 1,22% \pm 0,14% y la de

Canarias Tt-2 de un $1,03\% \pm 0,16\%$. Ambos valores son muy similares a los que muestran los especímenes atlánticos analizados por Siemann (1994) ($1,25\%$) y los especímenes chinos analizados por Wang et al. (1999) ($1,9\%$). El valor global de la especie, teniendo en cuenta todos los haplotipos descritos hasta el momento, es de un $2,55\% \pm 0,11\%$

Los resultados presentados en este estudio denotan grandes interrelaciones de los especímenes que habitan en el Archipiélago Canario con poblaciones de otras áreas y océanos, por lo que Canarias constituye un enclave geográfico importante a la hora de explicar la estructura genética de la especie dentro de su rango de distribución. En este sentido, Canarias es un hábitat digno de ser preservado.



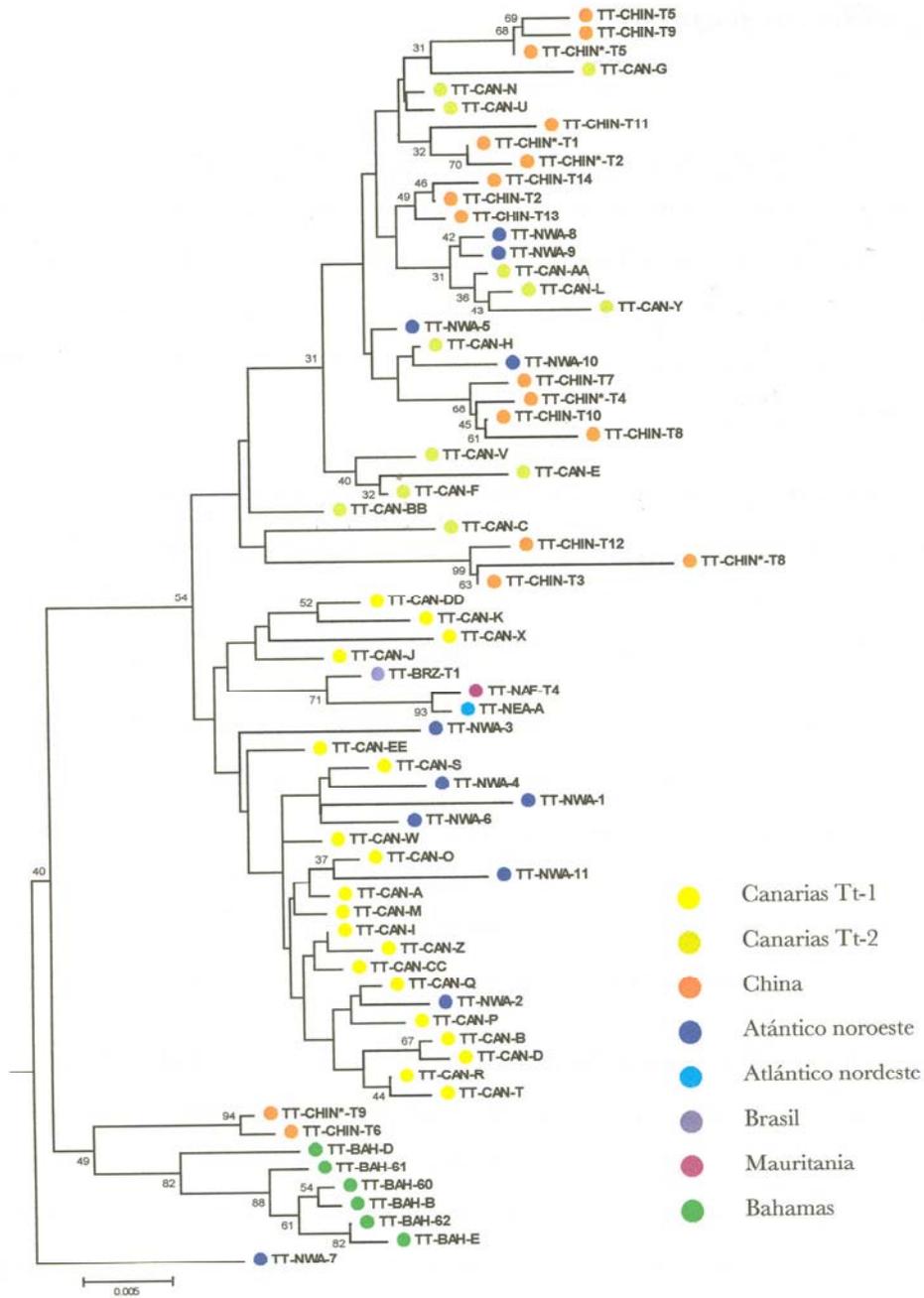


Figura 4.1. Árbol filogenético construido por el método de Mínima Evolución a partir de distancias par a par, para las poblaciones mundiales de *Tursiops truncatus*. Se ha utilizado *Tursiops aduncus* como grupo externo. En las ramas se indican los valores *bootstrap* mayores al 30%.

4.2. El calderón tropical

Siemann (1994) incluyó en su tesis sobre el estudio del ADNmt del calderón común (*Globicephala melas*), 13 muestras de calderón tropical, 11 procedentes del Océano Atlántico, frente a la costa este de Estados Unidos y 2 del Océano Pacífico. Encontró que los 11 animales procedentes del Atlántico tenían secuencias idénticas y que las dos del Pacífico diferían entre ellas en una sola base y en una y dos bases respectivamente de la secuencia atlántica.

Al comparar estos tres haplotipos con los encontrados en las Islas Canarias para el calderón tropical, se observó que el haplotipo más abundante en las islas, el haplotipo GM-CAN-A, era idéntico al encontrado por Siemann (1994) en una de las muestras tomadas en el Océano Pacífico, en concreto al sur de California.

En la figura 4.2. se muestra el árbol filogenético construido con los haplotipos atlántico, pacífico y canarios. Como grupo externo para la estima del árbol se utilizaron 31 haplotipos de delfín mular, que no se han incluido en la figura. Los límites de confianza del test *bootstrap* (BCL), que se muestran encima de las ramas, representan las frecuencias con la que los nodos del árbol *Neighbor Joining* original aparecen en los réplicas *bootstrap*. Sólo se han representado los valores superiores al 30%.

La inclusión de los nuevos haplotipos en el árbol filogenético de los haplotipos canarios no modificó sustancialmente la estructura del mismo (Figura 3.5.). Como se puede apreciar, se sigue manteniendo la división entre los grupos Canarias Gm-1 y Canarias Gm-2. Los haplotipos del Atlántico y del Pacífico tropical este, descritos por Siemann (1994), quedan más cercanos a la rama del grupo Canarias Gm-1 formado por los haplotipos GM-CAN-A y GM-CAN-C.

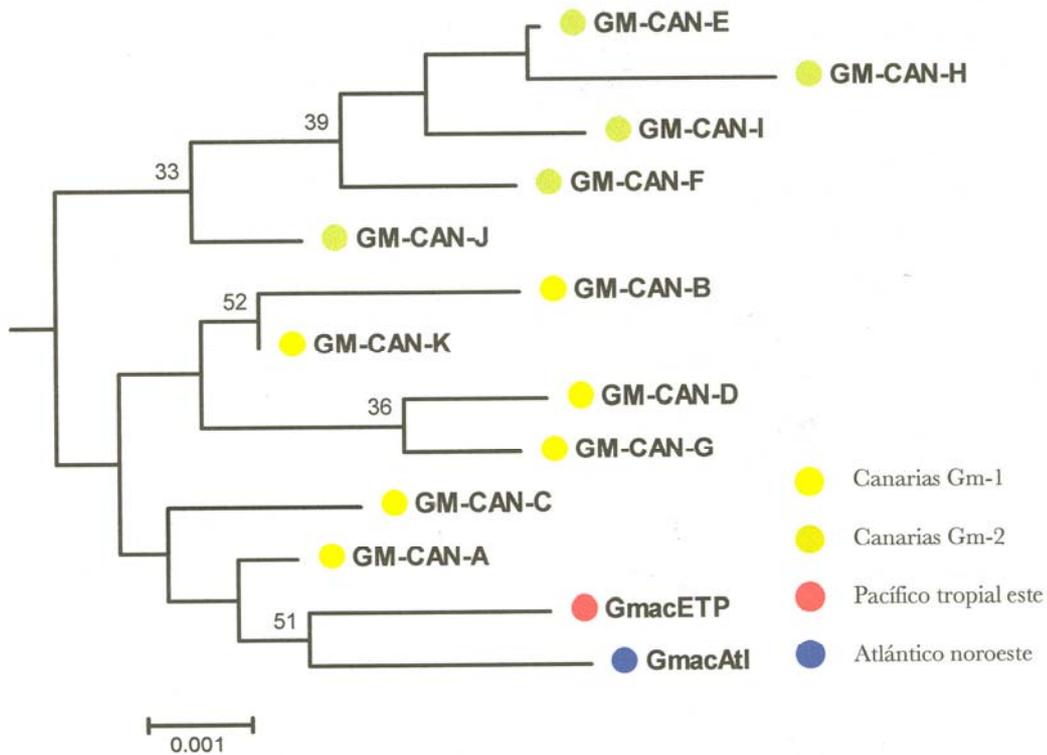


Figura 4.2. Árbol filogenético construido por el método *Neighbor Joining* a partir de distancias par a par, para las poblaciones mundiales de *Globicephala macrohynchus*. Se ha utilizado *Tursiops truncatus* como grupo externo. En las ramas se indican los valores *bootstrap* mayores al 30%.

Es de destacar la baja variabilidad ($\pi = 0,05\%$) que Sieman (1994) encontró en las muestras pacíficas y atlánticas, a pesar de que el muestreo se realizó durante un espacio de tiempo largo (desde 1978 hasta 1992) y en un área extensa (océanos Pacífico y Atlántico). En el presente estudio, en cambio, los valores de variabilidad son mucho más elevados ya que para un número de muestras 2,5 veces mayor, la variabilidad es 8 veces superior ($0,4\% \pm 0,05\%$) a la descrita hasta el momento para el calderón tropical, teniendo en cuenta además que el área de muestreo es mucho más reducida. Considerando los grupos Canarias Gm-1 y Gm-2 por separado, la diversidad nucleotídica aún es unas 4 veces superior a la hallada por Sieman (1994) puesto que los valores de diversidad para estos dos grupos son $0,21\% \pm 0,05\%$ y $0,19 \pm 0,06\%$, respectivamente.

En referencia a la estructuración geográfica de los haplotipos por área de muestreo, que se desprende del análisis molecular de la varianza (Tabla 3.9.), ésta puede ser debida a efectos del muestreo y seguramente sería más correcto decir que en Canarias existen como mínimo dos grupos matrilineales distribuidos en ambas islas, como indica el análisis AMOVA de la tabla 3.10.

La baja correlación entre la estructura genética y la distribución geográfica del calderón tropical del Archipiélago Canario, está en concordancia con los resultados obtenidos por Servidio (2001), mediante técnicas de fotoidentificación, quien avistó en Gran Canaria entre los años 1999 y 2000 dos individuos que diez años antes habían sido identificados en Tenerife (Heimlich-Boran, 1993). Esto indicaría que no existe una fidelidad estricta hacia un área geográfica concreta sino que los animales viajan entre islas y existe también un flujo genético entre ellas.

El calderón tropical es una especie con población residente en el Archipiélago Canario (Heimlich-Boran, 1993). Sólo con los datos del análisis genético que se presenta en este estudio, es difícil discernir quiénes de los especímenes estudiados constituyen las poblaciones residente y no residente. Ello, quizás requiriese un análisis conjunto de variables genéticas y de fotoidentificación tanto en el espacio como en el tiempo. En este sentido, Servidio (2001) recapturó por técnicas de fotoidentificación el 49,5% de los animales pertenecientes a los grupos en los que viajaban los individuos cuyos haplotipos se consideran del grupo Canarias Gm-2. Sin embargo, el reavistamiento de animales de los grupos en los que viajan los individuos que se han clasificado como del grupo Canarias Gm-1, ha sido bastante menor (21,43%). Por lo tanto, aunque se requiere de trabajos más dirigidos, quizás el grupo de Canarias Gm-2 representen mejor a la población residente que el grupo Canarias Gm-1.

La gran diversidad encontrada en el calderón tropical del Archipiélago Canario, puede tener implicaciones importantes dentro de los procesos de evolución de la especie,

puesto que las Islas Canarias parecen gozar de la mayor variabilidad genética descrita hasta el momento en dicha especie, si bien es cierto que los estudios existentes son muy escasos.

El hecho de que exista similitud en el polimorfismo de poblaciones de islas geográficamente distantes, pero que este a su vez sea distinto al de poblaciones extra-insulares, constituyen un signo de primitivismo (Prevosti *et al.*, 1975). La notable variabilidad de la población Canaria frente a poblaciones extra-canarias podría ser, en parte, un signo de primitivismo, es decir, que Canarias es una huella viviente del grado de diversidad del que ha gozado la especie en tiempos pasados. Esta hipótesis no es nada extraña, si tenemos en cuenta que Canarias ya ha sido ilustrada como tal en organismos tan diversos como *Drosophila* (Afonso *et al.*, 1990) y dragos (Marrero y Francisco-Ortega, 2001). No obstante, corroborar todo esto requiere de un mayor número de estudios tanto en el espacio como en el tiempo, como por ejemplo analizar poblaciones oceánicas frente a insulares de Canarias, Madeira, Azores y Cabo Verde, en diferentes estaciones del año. En cualquier caso, y a tenor de los resultados que se presentan en este estudio, lo que si parece claro es que Canarias representa un hábitat natural cuya población de calderón tropical disfruta de un grado de diversidad genética inédito hasta el momento y que requiere protección, ya que quizás constituya un reservorio genético y lo que ello implica dentro de los procesos de radiación de la especie.

4.3. El delfín común

Existe tan sólo un trabajo publicado en el que se hace un estudio del ADNmt del delfín común de varias poblaciones mundiales. Rosel *et al.* (1994) analizaron la región D-loop de dos poblaciones de delfín común de distinto morfotipo, hocico largo y hocico corto, que viven en simpatria frente a las costas de California y las compararon entre ellas y con poblaciones procedentes de Pacífico tropical este y del Mar Negro. Encontraron que si bien había una diferencia genética entre las poblaciones de delfín común de hocico largo y hocico corto de California, no se podía establecer una relación clara entre las características genéticas y el lugar de procedencia de las muestras de delfín común de hocico corto de California, el Pacífico y el Mar Negro. Ambos morfotipos son considerados como especies distintas por sus diferencias morfológicas (Heyning & Perrin, 1994) y genéticas (Rosel *et al.*, 1994), manteniéndose el nombre de *Delphinus delphis* para el morfotipo de hocico corto y *Delphinus capensis* para el de hocico largo.

Se ha realizado la representación de un árbol filogenético que incluye los haplotipos analizados por Rosel *et al.* (1994), un haplotipo descrito por Cañadas *et al.* (1999) para el Mar Mediterráneo y los 21 haplotipos descritos en este trabajo para el Archipiélago Canario. El árbol se construyó utilizando el método del *Neighbor Joining* a partir de distancias entre haplotipos calculadas par a par y se sometió a un test *bootstrap* con 1000 réplicas. En las ramas se indican sólo los valores *bootstrap* mayores al 30%. Como grupo externo se utilizaron 31 haplotipos de delfín mular (*Tursiops truncatus*) que no se han representado (Figura 4.3.).

El árbol confirma, en parte, la falta de estructuración de las muestras respecto a su lugar de procedencia ya que no se observa que los haplotipos muestreados en una misma área geográfica formen grupos separados de los presentes en otras áreas. Además los valores de *bootstrap*, que se indican en las ramas, son en general bajos, lo que indica

que debido a la elevada heterogeneidad del taxón, el algoritmo no es capaz de resolver satisfactoriamente la topología del árbol.

La heterogeneidad de las muestras queda también reflejada en el hecho que excepto uno (el haplotipo más abundante en la población canaria, DD-CAN-C, que es también el más abundante en las muestras del Mar Negro y que en el árbol se ha denominado DD-CAN-C + DD-BS1), no se comparten haplotipos entre las distintas áreas geográficas. Aún así, se puede observar como, efectivamente, las muestras de delfín común de hocico largo forman un grupo aislado de las de hocico corto como ya habían descrito Rosel *et al.* (1994).

Dentro del grupo de los delfines comunes de hocico corto se aprecia de nuevo la separación entre los grupos Canarias Dd-1 y Canarias Dd-2, descrita en la figura 3.6, quedando el primero más cercano a los animales del Mar Negro y el Mediterráneo y el segundo a los animales procedentes de California y el Pacífico tropical este, si bien esto no implica necesariamente que los especímenes presentes en nuestro archipiélago procedan de dichas áreas. Sería necesario hacer un análisis más exhaustivo de las poblaciones atlánticas geográficamente más cercanas a fin de definir mejor las relaciones poblacionales.

Estos resultados dan una mayor solidez a la subdivisión de las muestras del Archipiélago Canario en Canarias Dd-1 y Canarias Dd-2, teniendo en cuenta que la fiabilidad de las topologías aumenta con la inclusión de un mayor número de especímenes.

Esta diferenciación no parece ser debida a efectos del muestreo, ya que al repetir el análisis para el año 1998 (el que tiene el mayor tamaño muestral de todos los analizados) se vuelve a reproducir el patrón de agrupamiento de los haplotipos en los mismos grupos Canarias Dd-1 y Canarias Dd-2.

A efectos de corroborar matemáticamente la subdivisión intrainsular a nivel intraespecífico, se aplicó un análisis a la varianza de una población de delfín común de hocico corto compuesta por los 46 animales procedentes de las distintas áreas geográficas (California: n=8; Pacífico tropical este: n=6; Mar Negro: n=4 y Canarias: n=28 (divididos en las subpoblaciones Canarias Dd-1 (n=22) y Canarias Dd-2 (n=6)). No se ha incluido el área del Mediterráneo por su pequeño tamaño muestral (n=1).

Los resultados indicaron una división geográfica de la población y que una cantidad significativa de la varianza total, el 23,52%, puede ser atribuida a una diversidad regional ($\phi_{ST}=0,235$, $P<0,0001$). Al analizar los componentes de la varianza comparando las poblaciones dos a dos, los valores de ϕ_{ST} variaron de 0,003 a 0,440 (Tabla 4.2.). Los dos valores más bajos, $\phi_{ST}=0,003$ y $\phi_{ST}=0,115$, que correspondieron a las comparaciones entre las poblaciones de California - Pacífico tropical este y Canarias Dd-1 - Mar Negro, no fueron estadísticamente significativos, lo que indica que no existen diferencias genéticas entre estas poblaciones.

Tabla 4.2. Índice de fijación (ϕ_{ST}) entre poblaciones de delfín común de distintas áreas geográficas y su significación estadística (P).

Poblaciones	ϕ_{ST}	P
California - Pacífico tropical este	0,003	0,378
Canarias Dd-1 - Mar Negro	0,115	0,054
Pacífico tropical este - Mar Negro	0,128	0,045*
California - Mar Negro	0,146	<0,0001***
Canarias Dd-1 - California	0,167	<0,0001***
Canarias Dd-2 -Pacífico tropical este	0,213	<0,0001***
Canarias Dd-1 - Pacífico tropical este	0,225	<0,0001***
Canarias Dd-2 - California	0,291	<0,0001***
Canarias Dd-2 - Mar Negro	0,393	<0,0001***
Canarias Dd-1 - Canarias Dd-2	0,440	<0,0001***

*Significativo estadísticamente al nivel $\alpha=0,05$

***Significativo estadísticamente al nivel $\alpha=0,001$

La mayor diferencia entre poblaciones se dio entre los dos grupos de Canarias. Es más, esta diferencia fue del mismo orden que la existente entre los morfotipos de hocico largo y hocico corto de California ($\phi_{ST} = 0,44$; $P < 0,0001$) y que son considerados incluso especies distintas, *D. capensis* y *D. delphis* respectivamente, por Rosel *et al.* (1994).

Estos autores usaron como argumento para aseverar esta diferenciación a nivel de especie, que la diversidad nucleotídica neta entre ambos morfotipos (1,09%) era unas 50 veces superior a la hallada entre poblaciones del morfotipo de hocico corto geográficamente distantes (0,02%, para las poblaciones de California, Pacífico tropical este y Mar Negro). Sin embargo, a tenor de los resultados que se muestran en este trabajo, ello no constituye un argumento ya que el grado de divergencia entre Canarias Dd-1 y Canarias Dd-2, ambas de hocico corto, es del mismo orden de magnitud (0,93%).

Además, la baja diversidad que Rosel *et al.* (1994) encontraron entre las poblaciones pacíficas y del Mar Negro estuvo condicionada por el pequeño número de muestras de áreas fuera del Océano Pacífico. Por otro lado, comparando la topología obtenida para el delfín común con la del delfín mular (Figuras 4.1. y 4.3.) se observa que en este último caso ambos morfotipos quedan totalmente separados (valor *bootstrap* = 94), mientras que en el delfín común dicha separación no existe. Así, Wang *et al.* (1999) encontraron cuatro veces más diversidad entre los morfotipos de delfín mular (*aduncus* y *truncatus*) que la encontrada por Rosel *et al.* (1994) entre los morfotipos de delfín común (*delphis* y *capensis*).

Estos últimos autores, postulan también un origen monofilético para los ejemplares muestreados de ambos morfotipos (*D. delphis* y *D. capensis*). Sin embargo, considerando un tamaño muestral mayor al incluir los individuos del presente estudio, dicha hipótesis no se sostiene pues los ejemplares de ambos morfotipos no son recíprocamente monofiléticos, lo cual está en concordancia con los resultados de LeDuc *et al.* (1999), usando la secuencia completa del citocromo *b*.

Todo lo anteriormente expuesto pondría en aparente antagonismo la diferenciación entre los dos morfotipos de delfín común a nivel de especie y la diferenciación entre poblaciones del morfotipo de hocico corto. No obstante, habría que considerar que en ambos estudios se ha utilizado un marcador molecular mitocondrial, cuando la diferenciación morfológica debería estar más correlacionada con la determinación genética de la esqueletogénesis (Cardew & Goode (eds.), 2001). En cualquier caso, se podría estar asistiendo a un proceso de especiación del delfín común, lo que hace muy interesante la ampliación de sus estudios genéticos en el espacio y en el tiempo.

El valor de la diversidad nucleotídica hallada para la población Canaria fue de $\pi=0,01520 \pm 0,00148$. Este valor está en concordancia con los valores descritos tanto para otras poblaciones (Mar Negro: $\pi=0,01005 \pm 0,00403$; California: $\pi=0,01588 \pm 0,00172$; Pacífico Tropical Este: $\pi=0,02412 \pm 0,00298$) (Rosel *et al.*, 1994), siendo para la especie en general de $\pi=0,01942 \pm 0,00106$. Respecto a la distribución nucleotídica a lo largo del fragmento de la región D-loop analizado, el pico de mayor diversidad que aparece entre las bases 271 y 300 parece ser una característica común de la región D-loop para esta especie ya que se encuentra en la misma zona y con el mismo orden de magnitud, en las muestras de California, Pacífico tropical este y Mar Negro analizadas por Rosel *et al.* (1994).

Tanto los niveles de diversidad genética como la topología que se muestra en el presente estudio (Figura 4.3.) ponen de manifiesto que el Archipiélago Canario constituye una región de tránsito, dentro del rango de distribución del delfín común, y privilegiada para establecer las relaciones genéticas entre distintas poblaciones.

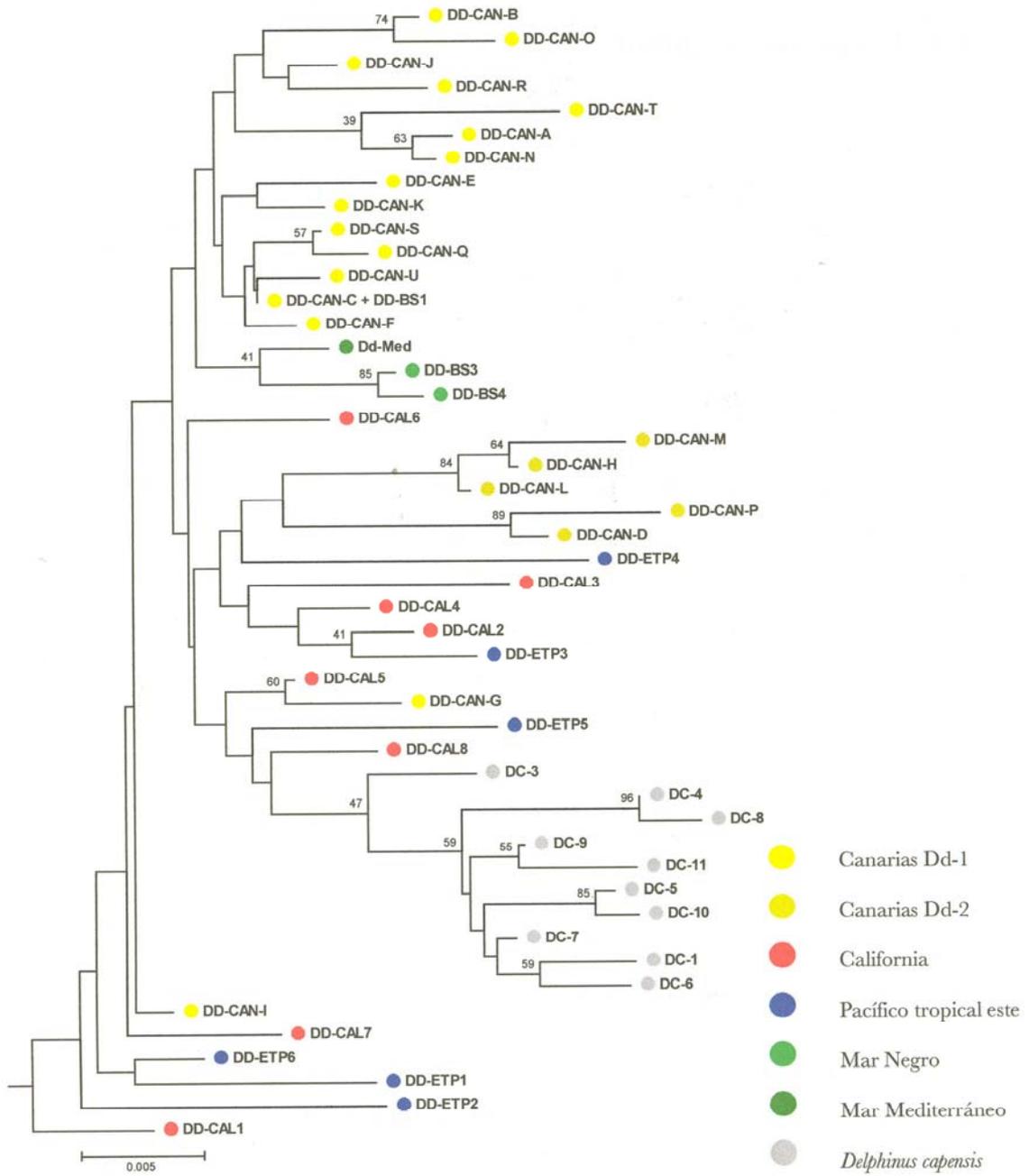


Figura 4.3. Árbol filogenético construido por el método del *Neighbor-Joining* a partir de distancias par a par, para las poblaciones mundiales de delfín común. Se ha utilizado *Tursiops truncatus* como grupo externo. En las ramas se indican los valores *bootstrap* mayores al 30%.

4.4. *El rorcual tropical*

Las muestras de rorcual tropical analizadas en el presente trabajo constituyen la primera cita de caracterización genética, mediante secuenciación de la región D-loop, de esta especie en el Océano Atlántico. Todos los especímenes presentaron el mismo haplotipo, el cual es idéntico al haplotipo 11 descrito por Yoshida & Kato (1999) para el Océano Índico, donde apareció en sólo una muestra de las cuatro analizadas para esta zona.

La falta de heterogeneidad de la población del Archipiélago Canario contrasta con la mayoría de las poblaciones descritas hasta la actualidad por Yoshida & Kato (1999). Estos autores encuentran heterogeneidad entre y dentro de las poblaciones de Japón (Mar del este de China y aguas costeras de Kochi), del oeste del Pacífico Norte y del este del Océano Índico, que a su vez no comparten haplotipos. Una excepción, al igual que la población de las Islas Canarias, la constituye la población de las Islas Solomon, donde los cinco especímenes presentaron el mismo haplotipo. Además, los mismos autores infirieron las relaciones genéticas entre las poblaciones mencionadas, incluyendo un espécimen de Sudáfrica (Árnason *et al.*, 1993c), que se correspondieron perfectamente con su origen geográfico (Figura 4.4.). La inclusión del haplotipo del Archipiélago Canario, refleja cierta contradicción en este sentido, aunque quizás el haplotipo 11 del Índico sea en realidad un ejemplar más afín al Atlántico si se considera que los patrones de frecuencias en ambos océanos son antagónicos.

A nivel poblacional, las distancias netas más bajas están entre el Pacífico, el Índico, Canarias y África ($0,01687 \pm 0,005381$). La población de Japón presenta una distancia neta intermedia con estas poblaciones de $0,07612 \pm 0,002415$, mientras que las mayores distancias están entre las Islas Solomon con las restantes poblaciones ($0,141874 \pm 0,002211$).

Los bajos niveles de variación genética detectados para el rorcual tropical en la población de Canarias no implica su inexistencia, puesto que en el rorcual común, una especie con una biología similar a la del rorcual tropical, se han descrito diferencias entre las poblaciones atlánticas muestreadas (Atlántico Oriental, Atlántico Occidental y Mediterráneo) (Bérubé *et al.*, 1998). Todo ello, pone de relieve la importancia de profundizar en el análisis genético de esta especie a nivel mundial, y en concreto en el Atlántico, debido a la falta de estudios, a efectos de determinar el origen genético de los animales que pasan por Canarias.



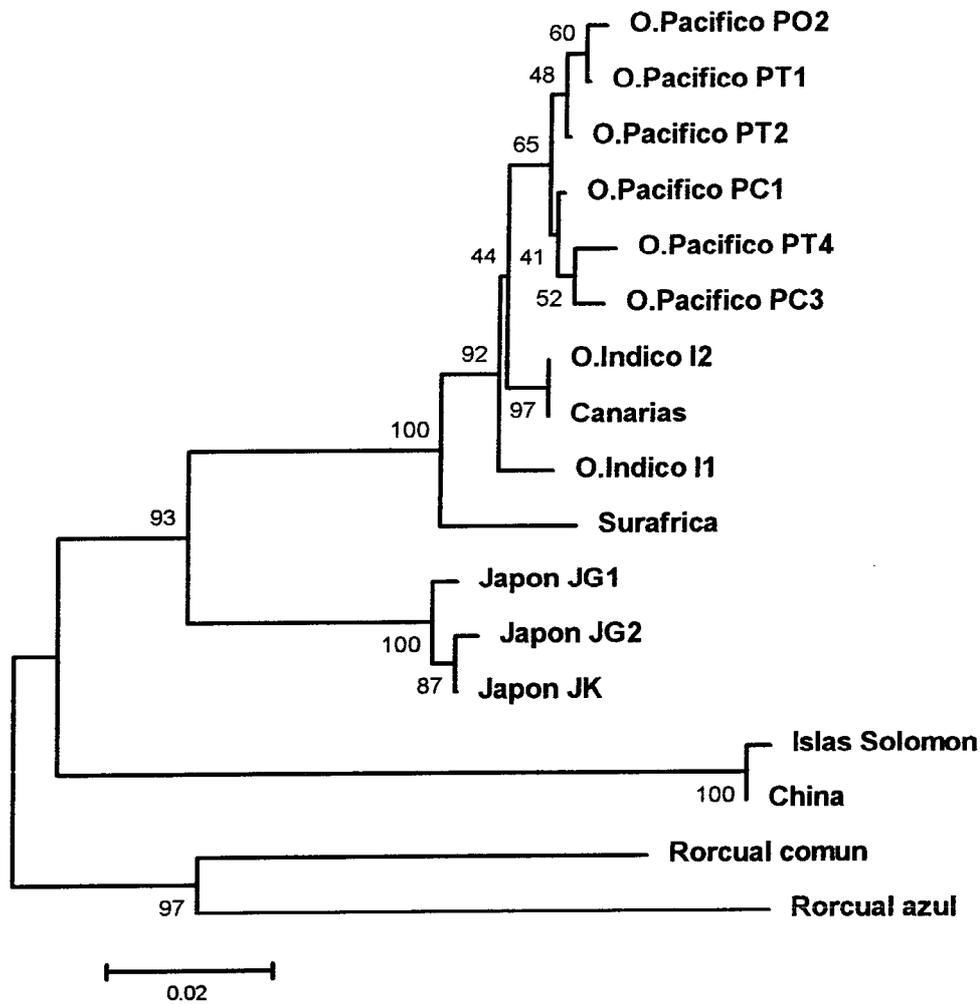


Figura 4.4. Árbol filogenético del rorcual tropical, construido por el método *Neighbor-Joining* a partir de distancias par a par y utilizando las secuencias del rorcual común y del rorcual azul como grupo externo

4.5. La región control

Un análisis conjunto de las especies de cetáceos que presentaron variabilidad en la región control pone de manifiesto que la misma no está distribuida al azar. En el caso de las poblaciones canarias del delfín mular y el delfín común la mayor parte de la diversidad nucleotídica se encuentra entre las bases 241 y 360 (Figuras 3.1. y 3.5.). Para la población canaria de calderón tropical, la distribución es bimodal y concentra los mayores niveles de variación entre las bases 1 a 60 y las bases 301 y 360 (Figura 3.3.). Estas mismas distribuciones se hallan en otras poblaciones de las mismas especies (Rosel *et al.*, 1994; Siemann, 1994; Cañadas *et al.*, 1999; Parsons *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Parsons *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 2001; Parsons, 2001).

Esta información podría utilizarse con el fin de optimizar el análisis de las muestras, puesto que secuenciado únicamente dichas regiones hipervariables se abaratan los costes sin mermar la precisión que se requiere a la hora de definir las relaciones evolutivas entre las poblaciones. En el caso del calderón tropical, esta simplificación no sería recomendable por la bimodalidad de la distribución.

Concerniente a las relaciones halladas en el presente trabajo entre las poblaciones de cetáceos canarias y las de otras regiones geográficas, descritas con anterioridad, es necesario mencionar que éstas vienen condicionadas por la poca cantidad de análisis disponibles para realizar las comparaciones. Sin duda, un análisis más exhaustivo de otras poblaciones atlánticas de las especies estudiadas en este trabajo, permitiría establecer unas relaciones genéticas más estrechas entre las poblaciones canarias y otras de su entorno más próximo frente a las descritas actualmente.

Los resultados presentados en este trabajo para el delfín mular, calderón tropical y delfín común del Archipiélago Canario, corroboran la clasificación en la que han sido

encuadradas cada una de las especies en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (BOC 2001/097). Ninguna de las tres especies está en peligro desde el punto de vista genético, aunque sí son merecedoras de una protección especial puesto que sus poblaciones poseen valores de variabilidad elevados y además existe un intercambio genético con otras poblaciones. El delfín mular y el calderón tropical quizás merezcan una mayor atención, teniendo en cuenta que ambas especies poseen poblaciones residentes en Canarias.



4.6. Los genes COI y NADH5

La mayor discrepancia de la controversia filogenética del orden Cetacea radica en establecer la relación correcta de la familia Physeteridae frente al resto de odontocetos o misticetos. Atendiendo a los estudios morfológicos de las especies, los odontocetos y los misticetos son subórdenes monofiléticos. En cambio, según los resultados de Milinkovitch *et al.* (1993), basados en el análisis parcial de los genes ribosómicos mitocondriales 12S y 16S, los cachalotes muestran una relación más estrecha con las ballenas que con otras especies de odontocetos. No obstante, para Árnason & Gullberg (1994), que analizaron el citocromo b completo, los cachalotes están más alejados de las ballenas que de los delfinidos, pero tampoco forman un grupo monofilético con los delfines.

La discrepancia entre estas tres hipótesis está aún vigente, a pesar de que se han realizado algunos estudios adicionales que consideran el análisis conjunto de varios genes, el aumento de la longitud de las secuencias analizadas y la inclusión de otros genes o marcadores morfológicos (Milinkovitch *et al.*, 1994 y 1995; Árnason & Gullberg, 1996; Adachi & Hasegawa, 1995; Smith *et al.*, 1996; Messenger & McGuire, 1998; Gatesy *et al.*, 1999; Árnason *et al.*, 2000).

Al efecto de aportar información adicional a las relaciones filogenéticas de odontocetos y misticetos, teniendo en cuenta la variabilidad intraespecífica de las especies más determinantes (cachalotes, ballenas y delfines), en el presente trabajo se han utilizado dos secuencias hasta ahora no analizadas, COI y NADH5, con unas longitudes medias mayores a las utilizadas hasta el momento (950 y 927 pares de bases respectivamente).

Utilizando exclusivamente la información del COI, las cuatro familias (Physeteridae, Ziphiidae, Balaenopteridae y Delphinidae) son monofiléticas (Figura 3.9.), lo cual concuerda con los datos de Milinkovitch *et al.* (1993) y Árnason & Gullberg (1994),

si bien los cachalotes distan más de los delfines que éstos de las ballenas. En este sentido, los resultados que muestra el análisis del COI estarían en mayor concordancia con la hipótesis de Árnason que con la de Milinkovitch. En cambio, la hipótesis Tradicional no se sostiene puesto que además los zifios quedan excluidos del grupo de odontocetos formado por los delfinidos.

Cuando sólo se usa la información del NADH5, nuevamente se comprueba la ausencia de una relación hermana entre las familias Physeteridae y Balaenopteridae, siendo más estrecha la relación entre ésta última y la familia Delphinidae que de los odontocetos entre sí. Esta topología está más en concordancia con la hipótesis de Árnason que con la de Milinkovitch.

Comparando las topologías obtenidas para cada uno de los genes, el COI parece ser un gen más adecuado que el NADH5 para la reconstrucción de relaciones interespecíficas dentro del orden Cetacea ya que, mientras ambos reflejan relaciones semejantes entre Physeteridae y Balaenopteridae, sólo el COI es capaz de resolver simultáneamente y de forma satisfactoria las relaciones inter e intraespecíficas de la familia Delphinidae. Esto puede ser debido a que el NADH5 presenta un mayor grado de saturación que el COI, lo que queda reflejado en su mayor diversidad nucleotídica. De hecho, para el complejo NADH reductasa se han descrito los mayores niveles de diversidad del genoma mitocondrial en vertebrados (Ferris *et al.*, 1983; López *et al.*, 1997) e invertebrados (Salignac *et al.*, 1986).

En el gen NADH5, todas las delcaciones detectadas condicionan la traducción de la secuencia de ADN a los aminoácidos de la proteína. En principio esto generaría una alteración en el funcionamiento normal de la proteína y por tanto del ciclo de la respiración mitocondrial. No obstante, es importante tener en cuenta que el tejido, a partir del cual se ha hecho el análisis de ADN, era piel, donde una posible disfunción de este tipo es irrelevante para la supervivencia del individuo, aunque sí podría tener

influencia en estudios de genética evolutiva. Es probable que los animales que presentaron alguna de las deleciones mencionadas sean heteroplásmicos y que al analizar el ADNmt de otro tipo de tejido no se encuentre la mutación.

En otros mamíferos, como el ser humano, se han estudiado en mayor profundidad las heteroplasmas del ADNmt. Se conoce que existe una relación entre el tipo de tejido y la incidencia de mutaciones. Así, Bendall *et al.* (1997) encuentran diferentes grados de heteroplasma según el tipo de tejido analizado, siendo mucho mayor en la raíz de pelo que en la sangre o en células bucales. La frecuencia varía incluso entre pelos de diferentes partes del cuerpo (desde un 9,1% hasta un 99%). Por otro lado, Wei (1992), a través de una revisión, pone de relieve la vulnerabilidad del ADNmt del ser humano a incrementar sus tasas de mutación, concretamente deleciones que abarcan al gen NADH5, con la edad de los individuos. Además, existe una asociación de ciertos tipos de deleciones a tejidos concretos como por ejemplo una deleción de 3610 pb al músculo esquelético y una de 7436 pb al músculo cardíaco.

Todo esto podría explicar las deleciones en el gen NADH5, compartidas por varias especies y halladas en el presente trabajo, puesto que parecen estar más asociadas al tipo de tejido analizado que a la especie. Es importante considerar esto en la definición de las estructuras genéticas en cetáceos ya que podría afectar a las inferencias de las relaciones entre poblaciones o especies. Por lo tanto, para futuros estudios, sería interesante validar la idoneidad de los distintos tejidos en los análisis de genética evolutiva.



5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- 1- La inclusión en el análisis genético intraespecífico de las muestras de delfín mular del Archipiélago Canario, las cuales muestran unos niveles de variación similares a los del resto de poblaciones, da soporte a la hipótesis de elevar al nivel de especie los morfotipos *Tursiops truncatus* y *Tursiops aduncus*.
- 2- El calderón tropical presenta en Canarias unos niveles de diversidad genética ocho veces superior al descrito en otras poblaciones, lo que podría representar la variabilidad ancestral de la especie y dar mayor importancia a su conservación.
- 3- El grado de diferenciación existente entre los grupos de delfín común descritos en el Archipiélago Canario, no apoya la teoría de que los morfotipos *Delphinus delphis* y *Delphinus capensis* deban ser definidos como especies.
- 4- Los rorcuales tropicales muestreados en la Islas Canarias no presentan diversidad genética, estando su haplotipo presente también en poblaciones del Océano Índico, lo que denota un flujo genético entre las poblaciones atlánticas e índicas.
- 5- Las poblaciones de delfín mular, de delfín común y de calderón tropical del Archipiélago Canario, atendiendo a los niveles de diversidad, gozan de una “buena salud” desde el punto vista genético, que garantiza su capacidad adaptativa.

- 6- Las Islas Canarias constituyen un hábitat natural donde confluyen linajes maternos de delfín mular, calderón tropical y delfín común, de distintos orígenes, por lo que la importancia de su preservación se justifica, no sólo por el número de especies presentes, sino también por el acervo genético que definen y que excede los límites de la insularidad.
- 7- Las poblaciones del Archipiélago Canario de delfín mular, de calderón tropical y de delfín común, se caracterizan por la presencia mayoritaria de haplotipos exclusivos frente al resto de las poblaciones.
- 8- Los polimorfismos intraespecíficos de la región control del delfín mular, del calderón tropical y del delfín, han puesto de relieve que estas especies no están subestructuradas a nivel insular, por lo que para su preservación, las áreas abarcadas por los actuales Lugares de Importancia Comunitaria (LIC) son claramente insuficientes.
- 9- La secuenciación de fragmentos del ADN mitocondrial (D-loop) es una herramienta útil en el diagnóstico de especímenes de difícil clasificación morfológicas, como ha sucedido en el presente estudio con el zifio de Gervais.
- 10- Las relaciones filogenéticas entre las familias de Physeteridae, Ziphiidae, Balaenopteridae y Delphinidae definidas mediante la secuenciación de los genes mitocondriales COI y NADH5, están en concordancia con la hipótesis de Arnason.
- 11- Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto el importante papel que juega el Archipiélago Canario en la definición de las relaciones entre las poblaciones de cetáceos, lo que lo hace digno de ser preservado.



6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, J. & Hasegawa, M., 1995. Phylogeny of whales: Dependence of the inference on species sampling. *Molecular Biology and Evolution* **12(1)**: 177-179.
- Afonso, J.M.; Volz, A.; Hernández, M.; Ruttkay, H.; González, M.; Larruga, J.M.; Cabrera, V.M. & Sperlich, D., 1990. Mitochondrial DNA variation and genetic structure in old-world populations of *Drosophila subobscura*. *Molecular Biology and Evolution* **7(2)**: 123-142.
- Aguilar, A. y Nadal, J., 1984. Obtención de biopsias hipodérmicas de cetáceos en libertad. *Investigación Pesquera* **48(1)**: 23-29.
- Amos, W. & Hoelzel, A.R., 1990. DNA fingerprinting cetacean biopsy samples for individual identification. In: Individual Recognition of Cetaceans: Use of Photo-Identification and other techniques to estimate population parameters. Hammond, P.S.; Mizroch, S.A. & Donovan G.P. (eds.). *Report of the International Whaling Commission, Special Issue 12*: 79-85.
- Amos, W. & Hoelzel, A.R., 1991. Long-term preservation of whale skin for DNA analysis. In: Genetic ecology of whales and dolphins. Hoelzel, A.R. (ed.). *Report of the International Whaling Commission, Special Issue 13*: 99-103.
- Amos, W.; H. Whitehead; M.J. Ferrari; D.A. Glockner-Ferrari; R. Payne and J. Gordon, 1992. Restrictable DNA from sloughed cetacean skin: its potential use in population analysis. *Marine Mammal Science* **8**: 275-283.

- André, M., 1997. Distribución y conservación del cachalote (*Physeter macrocephalus*) en las Islas Canarias. Tesis Doctoral. Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Aquadro, C.F. & Greenberg, B.D., 1982. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* **103**: 287-312.
- Árnason, Ú. & Gullberg, A., 1993. Comparison between the complete mtDNA sequences of the blue and the fin whale, two species that can hybridize in nature. *Journal of Molecular Evolution* **37**: 312-322.
- Árnason, Ú. & Gullberg, A., 1994. Relationship of baleen whales established by cytochrome b gene sequence comparison. *Nature* **367**: 726-728.
- Árnason, Ú. & Gullberg, A., 1996. Cytochrome b nucleotide sequences and the identification of five primary lineages of extant cetaceans. *Molecular Biology and Evolution* **13**(2): 407-417.
- Árnason, Ú.; Gullberg, A. & Widegren, B., 1991a. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the fin whale, *Balaenoptera physalus*. *J. Mol. Evol.* **33** (6): 556-568.
- Árnason, Ú. Spilliaert, R.; Pálsdóttir, A & Árnason, A., 1991b. Molecular identification of hybrids between the two largest whales species, the blue whale (*Balaenoptera musculus*) and the fin whale (*B. physalus*). *Hereditas* **115**: 183-189.
- Árnason, Ú.; Grétarsdóttir, S. & Gullberg, A., 1993a. Comparisons between the 12S rRNA, 16S rRNA, NADH1 and COI genes of sperm and fin whale mitochondrial DNA. *Biochemical Systematics And Ecology* **21**(1): 115-122.

- Árnason, Ú.; Gullberg, A.; Johnsson, E. & Ledje, C.; 1993b. The nucleotide sequence of the mitochondrial DNA molecule of the grey seal, *Halichoerus grypus*, and a comparison with mitochondrial sequences of other true seals. *Journal of Molecular Evolution* 37(4):323-330.
- Árnason, Ú.; Gullberg, A. & Widegren, B., 1993c. Cetacean mitochondrial DNA control region: sequences of all extant baleen whales and two Sperm whale species. *Molecular Biology and Evolution* (10)5: 960-970.
- Árnason, Ú.; Gullberg, A.; Grétarsdóttir, S.; Ursing, B. & Janke, A., 2000. The mitochondrial genome of the sperm whale and a new molecular reference for estimating eutherian divergence dates. *Journal of Molecular Evolution* 50: 569-578.
- Árnason, Ú.; Adegoke, J.A.; Bodin, K.; Born, E.W.; Esa, Y.B.; Gullberg, A.; Nilsson, M.; Short, R.V.; Xu, X. & Janke, A., 2002. Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99(12): 8151-8156.
- Baker, C.S. & Palumbi, S.R., 1994. Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science* 265: 1538-1539.
- Baker, C.S.; Perry, A.; Bannister, J.L.; Weinrich, M.T.; Abernethy, R.B.; Calambokidis, J.C.; Lien, J.; Lambertsen, R.H.; Urbán Ramírez, J.; Vásquez, O.; Clapham, P.J.; Alling, A.; O'Brien, S.J. & Palumbi, S.R., 1993. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 8239-8243.
- Baker, C.S.; Cipriano, F. & Palumbi, S.R., 1996. Molecular genetic identification of whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan. *Molecular Ecology* 5: 671-685.

- Bakke, I.; Johansen, S. Bakke, O. & El-Gewely, M.R., 1996. Lack of population subdivision among the minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) from Icelandic and Norwegian waters based on mitochondrial DNA sequences. *Marine Biology* **125**: 1-9.
- Barnes, L.G.; Domning, D.P. & Ray C.E., 1985. Status of studies on fossil marine mammals. *Marine Mammal Science* **1(1)**: 15-53.
- Barrett-Lennard, L.G.; Smith, T.G. & Ellis, G.M., 1996. A cetacean biopsy system using lightweight pneumatic darts, and its effect on the behavior of killer whales. *Marine Mammal Science* **12 (1)**: 14-27.
- Bearzi, G., 2000. First report of a common dolphin (*Delphinus delphis*) death following penetration of a biopsy dart. *Journal of Cetacean Research and Management* **2(3)**: 217-221.
- Bendall, K.E.; Macaulay, V.A. & Sykes, B.C., 1997. Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots. *Am. J. Hum. Genet.* **61**: 1303-1308.
- Benson, D.; Lipman, D.J. & Ostell, J., 1993. GenBank. *Nucleic Acids Research* **21(13)**: 2963-2965.
- Bérubé, M.; Aguilar, A.; Dendanto, D.; Larsen, F.; Di-Sciara, G.N.; Sears, R.; Sigurjonsson, J.; Urban-R., J. & Palsboll, P.J.. 1998. Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortes fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758): analysis of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Ecology* **7**: 585-599.
- Brown, W.M.; George, M. & Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Sci. USA* **76**: 1967-1971.

- Brown, M.W.; Kraus, S.D. & Gaskin, D.E., 1991. Reaction of North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) to skin biopsy sampling for genetic and pollutant analysis. In: Genetic ecology of whales and dolphins. Hoelzel, A.R. (ed.). *Report of the International Whaling Commission, Special Issue 13*: 81-89.
- Brown, M.R.; Corkeron, P.J.; Hale, P.T.; Schultz, K.W. & Bryden, M.M., 1994. Behavioral responses of East Australian humpback whales *Megaptera novaeangliae* to biopsy sampling. *Marine Mammal Science* **10** (4): 391-400.
- Cann, R.L.; Brown, W.M. & Wilson, A.C., 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* **106**: 479-499.
- Cañadas, A.; Fernández, E.; Sagarminaga, R.; Fernández-Casado, M.; Mons, J.L.; Vaquero, M.C.; Fernández, P.; Herranz, M.; Fernández, M. & Fernández-Piqueras, J. 1999. Preliminary results of genetic analysis of Mediterranean common dolphins (*Delphinus delphis*). In: European Research on Cetaceans - 13. Evans, P.G.H.; Cruz, J. & Raga, J.A. (eds.). *Proceedings of the Thirteenth Annual Conference of the European Cetacean Society, Valencia, Spain, 5-8 April 1999*: 359-361.
- Cardew, G. & Goode, J.A. (eds.), 2001. The molecular basis of skeletogenesis. John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, England.
- Carrillo, M. & Martín, V., 1999. First sighting of Gervais beaked whale (*Mesoplodon europaeus* Gervais, 1855) (Cetacea: Ziphiidae) from the north oriental Atlantic coast. 13th Annual Conference. European Cetacean Society, Valencia, Spain. 5-8 April, 1999.

- Cipriano, F. & Palumbi, S., 1999a. Genetic identification of species origin and coincident pollutant analysis reveal high pollutant loads in cetacean products sold for human consumption in 1999. 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Wailea, Hawaii, November 28 - December 3, 1999.
- Cipriano, F. & Palumbi, S., 1999b. Genetic tracking of a protected whale. *Nature* **397**: 307-308.
- Clapham, P.J. & Mattila, D.K., 1993. Reactions of humpback whales to skin biopsy sampling on a West Indies breeding ground. *Marine Mammal Science* **9(4)**: 382-391.
- Clapham, P.J.; P.J. Palsbøll & D.K. Mattila, 1993. High-energy behaviors in humpback whales as a source of sloughed skin for molecular analysis. *Marine Mammal Science* **9(2)**: 213-220.
- Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente, 2001. Decreto 151/2001, de 23 de julio, por el que se crea el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias. *Boletín Oficial de Canarias*, **2001/097**.
- Curry, B.E., 1997. Phylogenetic relationships among bottlenose dolphins (Genus *Tursiops*) in a worldwide context. PhD Thesis. Texas A&M University.
- Curry, B.E.; Garrison, L.; Jefferson, T.A.; Brownell, R.L. & Dizon, A.E., 1999. Population subdivision in finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides*, from Southeast Asia based on mtDNA sequencing: variation within the genus. 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Wailea, Hawaii, November 28 - December 3, 1999.
- Dalebout, M.L.; Van Helden, A.; Van Waerebeek, K. & Baker, C.S., 1998. Molecular genetic identification of southern hemisphere beaked whales (Cetacea: Ziphiidae). *Molecular Ecology* **7(6)**: 687-694.

- Dalebout, M.L.; Mead, J.G.; Dizon, A.; Van Waerebeek, K.; Reyes, J.C. & Baker, C.S., 1999. Genetic discovery of a new species of beaked whale (Cetacea: Ziphiidae). 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Wailea, Hawaii, November 28 - December 3, 1999.
- Dalebout, M.L.; Hooker, S.K. & Christensen, I., 2001. Genetic diversity and population structure among northern bottlenose whales, *Hyperoodon ampullatus*, in the western North Atlantic Ocean. *Canadian Journal of Zoology* **79**: 478-484.
- Dillon, M., 1997. Genetic structure of sperm whale populations assessed by mitochondrial DNA sequence variation. PhD. Thesis. Dalhousie University, Canada.
- Dillon, M.C. & Wright, J.M., 1993. Nucleotide sequence of the D-loop region of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) mitochondrial genome. *Molecular Biology and Evolution* **10(2)**: 296-305.
- Dizon, A.E.; LeDuc, C.A. & LeDuc, R.G., 1994. Intraspecific structure of the northern right whale dolphin (*Lissodelphis borealis*): The power of an analysis of molecular variation for differentiating genetic stocks. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Report* **35**: 61-67.
- Dizon, A; Baker, C.S.; Cipriano, F.; Lento, G.; Palsbøll, P. & Reeves, R. (eds.), 2000. Molecular genetic identification of whales, dolphins and porpoises: Proceedings of a Workshop on the Forensic Use of Molecular Techniques to Identify Wildlife Products in the Marketplace. La Jolla, CA, USA, 14-16 June 1999. U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum, NOAA-TM-NMFS-SWFSC-286. 52pp. + xi.

- Engel, M.H.; Rosenbaum, H.C.; Freitas, A.; Pomillas, C. & Morete, M.E., 1999. Genetic variation and population characteristics based on mtDNA and molecular sexing of humpback whales from Abrolhos Bank, Brazil. 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Wailea, Hawaii, November 28 - December 3, 1999.
- Escorza, S.; Heimlich-Boran, S.L. & Heimlich-Boran, J., 1992. Bottleneck dolphins off the Canary Islands. *European Research on Cetaceans* **6**: 117-120.
- Excoffier, L., 2001. Analysis of population subdivision. In: Handbook of statistical genetics. Balding, D.J., Bishop, M. Y Cannings. C. (eds.). John Wiley & Sons, Ltd.
- Excoffier, L.; Smouse, P. & Quattro, J., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Ferris, S.D.; Sage, R.D.; Prager, E.M.; Ritte, U. & Wilson, A.C., 1983. Mitochondrial DNA evolution in mice. *Genetics* **105**: 681-721.
- Gales, N.J.; Dalebout, M.L. & Bannister, J.L., 2002. Genetic identification and biological observation of two free-swimming beaked whales: Hector's beaked whale (*Mesoplodon hectori*, Gray, 1871), and Gray's beaked whale (*Mesoplodon grayi*, von Haast, 1876). *Marine Mammal Science* **18**(2): 544-551.
- García-Martínez, J.; E. Barrio; J.A. Raga & A. Latorre, 1995. Mitochondrial DNA variability of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) in the Spanish Mediterranean waters. *Marine Mammal Science* **11**(2): 183-199.

- Garrison, L.M.; Perrin, W.G.; Vitulli, C. & Dizon, A.E., 1999. 3 Types of genetic markers used to compare worldwide genetic variation with morphology and ecology in spinner dolphins. 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Wailea, Hawaii, November 28 - December 3, 1999.
- Gatesy, J.; Milinkovitch, M.; Waddell, V. & Stanhope, M., 1999. Stability of cladistic relationships between Cetacea and higher-level artiodactyl taxa. *Systematic Biology* **48(1)** : 6-20.
- Gauthier, J. & Sears, R., 1999. Behavioral response of four species of Balaenopterid whales to biopsy sampling. *Marine Mammal Science* **15(1)**: 85-101.
- GelWorks 1D. Ultra-Violet Products, Ltd. Cambridge, England
- Gendrom, D. & Mesnick, S., 1999. The use of sloughed skin for investigating patterns of habitat segregation by gender in the blue whales of Baja California. 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Wailea, Hawaii, November 28 - December 3, 1999.
- Gene Runner ver. 3.00, 1994. Hastings Software, Inc.
- Giles, R.E.; Blanc, H.; Cann, H.M. & Wallace, D.C., 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **77**: 6715-6719.
- Harlin, A.D.; Würsig, B.; Baker, C.S. & Markowitz, T.M., 1999. Skin swabbing for genetic analysis: Application on dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Marine Mammal Science* **15 (2)**: 409-425.
- Harrison, R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* **4(1)**: 6-11.

- Heimlich-Boran, J.R.; 1993. Social organization fo the short-finned pilot whale, *Globicephala macrorhynchus*, with special reference to the comparative social ecology of delphinids. PhD Thesis. Dept. of Zoology. Universtity of Cambridge.
- Henshaw, M.D., LeDuc, R.G.; Chivers, S.J. & Dizon, A.E., 1997. Identifying beaked whales (Family Ziphiidae) using mtDNA sequences. *Marine Mammal Science* **13(3)**: 487-495.
- Heyning, J.E. & Perrin, W.F.; 1994. Evidence for two species of common dolphins (genus *Delphinus*) from the eastern North Pacific; evidence for two species. *Contributions in Science*. Natrual History Museum of Los Angeles County **442**: 1-35.
- Hoelzel, A.R. (ed.), 1991. Genetic ecology of whales and dolphins. ISBN: 0 906975 25 5. International Whaling Commission, Cambridge. 311 pp.
- Hoelzel, A.R.; Hancock, J.M. & Dover, G.A., 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Mol. Biol. Evol.* **8(3)**: 475-493.
- Hoelzel, A.R.; Dahlheim, M. & Stern, S.J., 1998. Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the eastern North Pacific and genetic differentiation between foraging specialists. *Journal of Heredity* **89(2)**: 121-128.
- Hooker, S.K.; Baird, R.W.; Al-Omari, S.; Gowans, S. & Whitehead, H., 2001. Behavioral reactions of northern bottlenose whales (*Hyperoodon ampullatus*) to biopsy darting and tag attachment procedures. *Fishery Bulletin* **99**:303-308
- Hutchinson, C.A. III; Newbold, J.E.; Potter, S.S. & Edgell, M.M., 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* **251**: 536-538.
- Imagestore 5000 v.7.01. Ultra-Violet Products, Ltd. Cambridge, England.

- IWC, 1991. Report of the *Ad-hoc* Working Group on the effect of biopsy sampling on individual cetaceans. *Report of the International Whaling Commission, Special Issue 13*: 23-27.
- Jefferson, T.A.; Leatherwood, S. & Webber, M.A., 1993. Marine mammals of the world. FAO Species Identification Guide. United Nations Environment Programme. Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN: 92-5-103292-0. Rome.
- Ji, G.Q.; Yang, G.; Liu, S. & Zhou, K.Y., 2001. A study on the variability of the mitochondrial DNA control region of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. No publicado.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R., 1969. Evolution in protein molecules. In: H.N. Munro, ed., *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132. Academic Press, New York.
- Kasamatsu, F.; Iwata, S. & Nishiwaki, S., 1991. Development of biopsy skin sampling system for fast swimming whales in pelagic waters. *Report of the International Whaling Commission 41*: 555-557.
- Kruetzen, M.; Barre, L.M. & Sherwin, W.B., 1999. A minimum impact biopsy system for small cetaceans. 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Wailea, Hawaii, November 28 - December 3, 1999.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B. and Nei, N., 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Lambertsen, R.H., 1987. A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. *Journal of Mammalogy 68 (2)*: 443-445.

- LeDuc, R.G.; Perrin, W.F. & Dizon, A.E., 1999. Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. *Marine Mammal Science* **15(3)**: 619-648.
- López, J.V.; Culver, M.; Stephens, J.C.; Johnson, W.E. & O'Brien, S.J., 1997. Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Mol. Biol. Evol.* **14(3)**: 277-286.
- Lyrholm, T.; Leimar, O. & Gyllensten, U., 1996. Low diversity and biased substitution patterns in the mitochondrial DNA control region of sperm whale: implications for estimates of time since common ancestry. *Molecular Biology and Evolution* **13(10)**: 1318-1326.
- Malik, S.; Brown, M.W.; Kraus, S.D. & White, B.N., 2000. Analysis of mitochondrial DNA diversity within and between North and South Atlantic right whales. *Marine Mammal Science* **16(3)**: 545-558.
- Marrero, A. y Francisco-Ortega, J., 2001. Evolución en islas. La forma en el tiempo. En: En: J.M. Fernández Palacios y J.L. Martín-Esquivel, eds., *Naturaleza de las Islas Canarias*. Ed. Turquesa, Santa Cruz de Tenerife: 474 pp. ISBN: 84-95412-18-7.
- Martin, A.R. (ed.), 1990. Whales and dolphins. Salamander Books, London – New York. 192 pp.
- Martín, V., 1998. Contribución al conocimiento de los pequeños cetáceos en el Archipiélago Canario. *Fundación César Manrique*: 249 pp.
- Martín, V. & Santiago, J.A., 1996. Acoustic behavior of the short-finned pilot whale (*Globicephala macrorhynchus*) of the SW coast of Tenerife, Canary Islands. *II Symposium Flora & Fauna of the Atlantic Islands*. Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

- Martín, V. y Urquiola, E., 2001. La observación de cetáceos. En: J.M. Fernández Palacios y J.L. Martín-Esquivel, eds., *Naturaleza de las Islas Canarias*. Ed. Turquesa, Santa Cruz de Tenerife: 474 pp. ISBN: 84-95412-18-7.
- Martín, V.; Montero, R.; Heimlich-Boran, J. & Heimlich-Boran, S., 1992. Preliminary observations of the cetological fauna from the Canary Islands. *6th Annual Conference of the European Cetacean Society, San Remo, Italy*.
- Martín, V.; Iani, V. & Schweikert, F., 1998. Cetaceans sighted in the Canary Islands during the Caremex expedition (January-April, 1997). *12th Annual Conference of the European Cetacean Society, Monaco*.
- Mathews, E.A.; Keller, S. & Weiner, D.B., 1988. A method to collect and process skin biopsies for cell culture from free-ranging gray whales (*Eschrichtius robustus*). *Marine Mammal Science* **4(1)**: 1-12.
- Medrano-González, L.; Aguayo-Lobo, A.; Urbán-Ramírez, J. & Baker, C.S., 1995. Diversity and distribution of mitochondrial DNA lineages among humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, in the Mexican Pacific Ocean. *Canadian Journal of Zoology*, **73(9)**: 1735-1743.
- Mesnick, S.L.; Nachenberg, R.L.; Rosenberg, A. & Dizon, A.E., 1998. Genetic structure of sperm whales, *Physeter macrocephalus*, in the Gulf of California, Mexico. The World Marine Mammal Science Conference, Monaco, 20-24 January 1998.
- Mesnick, S.L.; Clapham, P. & Dizon, A.E., 1999. A note on the collection of associated behavioural data with biopsy samples during cetacean assessment cruises. *Journal of Cetacean Research and Management* **1(2)**: 205-211.
- Messenger, S.L. & McGuire, J.A., 1998. Morphology, molecules, and the phylogenetics of cetaceans. *Systematic Biology* **47(2)**: 90-104

- Milinkovitch, M.C.; G. Ortí & A. Meyer, 1993. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature* **361**: 346-348.
- Milinkovitch, M.C.; Meyer, A. & Powell, J.R., 1994. Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes. *Molecular Biology and Evolution* **11(6)**: 939-948.
- Milinkovitch, M.C.; Ortí, G. & Meyer, A., 1995. Novel phylogeny of whales revisited but not revised. *Molecular Biology and Evolution* **12(3)**: 518-520.
- Möller, L.M. & Beheregaray, L.B., 2001. Coastal bottlenose dolphins from southeastern Australia are *Tursiops aduncus* according to sequences of the mitochondrial DNA control region. *Marine Mammal Science* **17 (2)**: 249-263.
- Moritz, C.; Dowling, T.E. & Brown, W.M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 269-292.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**: 335-350.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York.
- Nei, M. & Kumar, S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press. New York. 333 pp.
- Palsbøll, P.J.; Larsen F. & Hansen, E.S., 1991. Sampling of skin biopsies from free-ranging large cetaceans in West Greenland: Development of new biopsy tips and bolt designs. *Report of the International Whaling Commission, Special Issue 13*: 71-79.

- Palsbøll, P.J.; Vader, A.; Bakke, I. & Raafat El-Gewely, M., 1992. Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction. *Can. J. Zool.*, **70**: 2166-2170.
- Palsbøll, P.J.; Clapham, P.J.; Mattila, D.K.; Larsen, F.; Sears, R.; Siegismund, H.R.; Sigurjonsson, J.; Vásquez, O. & Arctander, P., 1995. Distribution of mtDNA haplotypes in North Atlantic humpback whales: the influence of behaviour on population structure. *Marine Ecology Progress Series* **116**: 1-10.
- Palumbi, S.R. & C.S. Baker, 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*. **11(3)**: 426-435.
- Parsons, K.M., 2001. Molecular ecology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). PhD Thesis. Zoology Department. University of Aberdeen.
- Parsons, K.M.; Dallas, J.F.; Claridge, D.E.; Durban, J.W.; Balcom, K.C.III; Thompson, P.M. & Noble, L.R., 1999. Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. *Molecular Ecology*, **8(10)**: 1766-1768.
- Parsons, K.M.; Noble, L.R. & Thompson, P.M., 2000. Population genetic structure of NE Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) inferred from mtDNA sequence data. No publicado.
- Patenaude, N.J. & White, B.N., 1995. Skin biopsy sampling of beluga whale carcasses: assessment of biopsy darting factors for minimal wounding and effective sample retrieval. *Marine Mammal Science* **11(2)**: 163-171.
- Pichler, F.B. & Baker, C.S., 2000. Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **267(1438)**: 97-102.

- Pichler, F.B.; Dawson, S.M.; Slooten, E. & Baker, C.S., 1998. Geographic isolation of Hector's dolphin populations described by mitochondrial DNA sequences. *Conservation Biology* **12(3)**: 676-682.
- Politi, E.; Notarbartolo di Sciara, G. & Mazzanti, C., 1996. Cetaceans found in the waters surrounding Lanzarote, Canary Islands. *10th Annual Conference of the European Cetacean Society, Lisboa, Portugal*.
- Prevosti, A.; Ocaña, J. & Alonso, G., 1975. Distances between populations of *Drosophila subobscura*, based on chromosome arrangement frequencies. *Theoret. Appl. Genetics* **45**: 231-241.
- Primer Premier v 4.04, 1996 Primer Biosoft International. Palo Alto, California.
- Raymond, M. & Rousset, F., 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**: 1280-1283.
- Richard, K.R.; McCarrey, S.W. & Wright, J.M., 1994. DNA sequence from the SRY gene of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) for use in molecular sexing. *Can. J. Zool.* **72**: 873-877.
- Richard, K.R.; Dillon, M.C.; Whitehead, H. & Wright, J.M., 1996. Patterns of kinship in groups of free-living sperm whales (*Physeter macrocephalus*) revealed by multiple molecular genetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 8792-8795.
- Ritter, F., 1996. Abundance, distribution and behaviour of cetaceans off La Gomera (Canary Islands) and their interaction with whale watching-boats and swimmers. Diploma Thesis. Faculty of Biology. University of Bremen.

- Rosel, P.E. & Rojas-Bracho, L., 1999. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus* Norris and MacFarland, 1958. *Marine Mammal Science* **15**(4): 990-1003.
- Rosel, P.E.; Dizon, A.E. & Heyning, J.E., 1994. Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (genus *Delphinus*). *Marine Biology* **119**: 159-167.
- Rosel, P.E.; Dizon, A.E. & Haygood, M.G., 1995a. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, on interoceanic and regional scales. *Can. J. Fish. Aquat. Sci. / J. Can. Sci. Halieut. Aquat.* **52** (6): 1210-1219.
- Rosel, P.E.; Haygood, M.G. & Perrin, W.F., 1995b. Phylogenetic relationships among the true porpoises (Cetacea: Phocoenidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **4**(4): 463-474.
- Rosel, P.E.; France, S.C; Wang, J.Y. & Kocher, T.D., 1999. Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology* **8**: S41-S54.
- Rosenbaum, H.C.; Brownell, Jr., R.L.; Brown, M.W.; Schaeff, C.; Portway, V.; White, B.N.; Malik, S.; Pastene, L.A.; Patenaude, N.J.; Baker, C.S.; Goto, M.; Best, P.; Clapham, P.J.; Hamilton, P.; Moore, M.; Payne, R.; Rowntree, V.; Tynan, C.T.; Bannister, J.L. & DeSalle, R., 2000a. World-wide genetic differentiation of *Eubalaena*: questioning the number of right whale species. *Molecular Ecology* **9**: 1793-1802.

- Rosenbaum, H.C.; Egan, M.G.; Clapham, P.J.; Brownell Jr., R.L.; Malik, S.; Brown, M.W.; White, B.N.; Walsh P. & Desalle, R., 2000b. Utility of North Atlantic right whale museum specimens for assessing changes in genetic diversity. *Conservation Biology* **14(6)**: 1837.
- Rozas, J. and Rozas, R., 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* **15**: 174-175.
- Rychlik, W. & Rychlik, P., 1994. Oligo 5.0. National Biosciences, Inc. Plymouth, MN, U.S.A.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.R.; Mullis, K.B. & Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saitou, N. & Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**: 1205-1210.
- Schneider, S.; Roessli, D. & Excofier, L., 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Servidio, A., 2001. Distribuzione e fotoidentificazione del globicefalo di Gray (*Globicephala macrorhynchus*) nell'isola di Gran Canaria. Tesi di Laurea. Università degli Studi di Bologna.

- Siemann, L.A., 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in North Atlantic long-finned pilot whales (*Globicephala melas*). PhD Thesis. Massachusetts Institute of Technology.
- Smith, M.R.; Shivji, M.S.; Waddell, V.G. & Stanhope, M.J., 1996. Phylogenetic evidence from the IRBP gene for the paraphyly of toothed whales, with mixed support for Cetacea as a suborder of Artiodactyla. *Molecular Biology and Evolution* **13(7)**: 918-922.
- Solignac, M.; Monnerot, M. & Mounolou, J.C., 1986. Mitochondrial DNA evolution in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution* **23**: 31-40.
- Southern, Š.O.; Southern, P.J. & Dizon, A.E., 1988. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution* **28**: 32-42.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. & Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680.
- Tolley, K.A.; Sundt, R.C.; Rosel, P.E.; Bjørge, A. & Øien, N., 1999. Population genetic structure of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the North Sea and Barents Sea. Proceedings of the Thirteenth Annual Conference of the European Cetacean Society. Valencia, Spain. 5-8 April 1999. Evans, P.G.H.; Cruz, J & Raga, J.A. (eds.): 370.
- Urquiola, E. & Sevilla, J.A., 1998. Observación de cetáceos en Canarias. Situación actual (I). *Medio Ambiente Canarias. Revista de la Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente. Gobierno de Canarias*. **10**.

- Valsecchi, E.; Glockner-Ferrari, D.; Ferrari, M. & Amos, W., 1998. Molecular analysis of the efficiency of sloughed skin sampling in whale population genetics. *Molecular Ecology* **7**: 1419-1422.
- Wang, J.Y.; Chou, L.S. & White, B.N., 1999. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Molecular Ecology* **8** (10): 1603-1612.
- Wei, Y.H., 1992. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutation Research*, **275**: 145-155.
- Weinrich, M.T.; Lambertsen, R.H.; Baker, C.S.; Schilling, M.R. & Belt, C.R. 1991. Behavioural responses of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the southern Gulf of Maine to biopsy sampling. *Report of the International Whaling Commission, Special Issue 13*: 91-97.
- Weinrich, M.T.; Lambertsen, R.H.; Belt, C.R.; Schilling, M.R.; Iken, H.J. & Syrjala, S.E., 1992. Behavioral reactions of humpback whales *Megaptera novaeangliae* to biopsy procedures. *Fishery Bulletin* **90** (3): 588-598.
- Whitehead, H.; Gordon, J.C.D.; Mathews, E.A. & Richard, K., 1990. Obtaining skin samples from living sperm whales. *Marine Mammal Science* **6**(4): 316-326.
- Willis, P., 1999. Hybridization between dall's porpoise (*Phocoenoides dalli*) and harbour porpoise (*Phocoena phocoena*): the role of mate choice. 13th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Wailea, Hawaii, November 28 - December 3, 1999.
- Winn, H.E.; Bischoff, W.L. & Taruski, A.G., 1973. Cytological sexing of cetacea. *Marine Biology* **23**: 343-346.

- Yang, G.; Ren, W.; Zhou, K.; Liu, S.; Ji, G.; Yan J. & Wang, L., 2002a. Population genetic structure of finless porpoises, *Neophocaena phocaenoides*, in Chinese waters, inferred from mitochondrial control region sequences. *Marine Mammal Science* **18(2)**: 336-347.
- Yang, G.; Zhou, K.; Ren, W.; Ji, G.; Liu, S.; Bastida, R. & Rivero, L., 2002b. Molecular systematics of river dolphins inferred from complete mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Marine Mammal Science* **18(1)**: 20-29.
- Yoshida, H. & Kato, H., 1999. Phylogenetic relationships of bryde's whales in the western North Pacific and adjacent waters inferred from mitochondrial DNA sequences. *Marine Mammal Science* **15(4)**: 1269-1286.





ANEXOS

ANEXO I: SECUENCIAS

*1. Secuencias de la región D-loop de los haplotipos de delfín mular (*Tursiops truncatus*) del Archipiélago Canario*

TT-CAN-A	AAAAAGCTTA	TTGTACAGTT	ACCACAACAT	CACAGTACTA	CGTCAGTATT	50
TT-CAN-B	
TT-CAN-C	
TT-CAN-D	
TT-CAN-EC	
TT-CAN-FC	
TT-CAN-GGTC	
TT-CAN-HC	
TT-CAN-I	
TT-CAN-J	
TT-CAN-K	
TT-CAN-LC	
TT-CAN-M	
TT-CAN-NC	
TT-CAN-O	
TT-CAN-P	
TT-CAN-Q	
TT-CAN-R	
TT-CAN-S	
TT-CAN-T	
TT-CAN-UC	
TT-CAN-VC	
TT-CAN-W	
TT-CAN-XT	
TT-CAN-YC	
TT-CAN-Z	
TT-CAN-AAC	
TT-CAN-BB	
TT-CAN-CC	
TT-CAN-DD	
TT-CAN-EE	

TT-CAN-A	AAAAGTAATT	TGTTTTAAAA	ACATTTTACT	GTACACATTA	CATATACATA	100
TT-CAN-B	
TT-CAN-C	
TT-CAN-D	
TT-CAN-E	
TT-CAN-F	
TT-CAN-G	
TT-CAN-H	
TT-CAN-I	
TT-CAN-J	
TT-CAN-K	
TT-CAN-L	
TT-CAN-M	
TT-CAN-N	
TT-CAN-O	
TT-CAN-P	
TT-CAN-Q	
TT-CAN-R	
TT-CAN-S	
TT-CAN-T	
TT-CAN-U	
TT-CAN-V	
TT-CAN-W	
TT-CAN-XA.....	
TT-CAN-Y	
TT-CAN-Z	
TT-CAN-AA	
TT-CAN-BB	
TT-CAN-CC	
TT-CAN-DD	
TT-CAN-EE	

TT-CAN-A	CACATGTGCA	TGCTAATATT	TAGTCTCTCC	TTGTAAATAT	TCATACATAC	150
TT-CAN-B	
TT-CAN-CT.....	
TT-CAN-D	
TT-CAN-EC.....T.....	
TT-CAN-FT.....	
TT-CAN-GC.....T.....	
TT-CAN-HC.....T.....	
TT-CAN-I	
TT-CAN-J	
TT-CAN-K	
TT-CAN-LC.....T.....	
TT-CAN-M	
TT-CAN-NC.....T.....	
TT-CAN-O	.G.....	
TT-CAN-P	
TT-CAN-Q	
TT-CAN-R	
TT-CAN-S	
TT-CAN-T	
TT-CAN-UC.....T.....	
TT-CAN-VC.....T.....	
TT-CAN-W	
TT-CAN-X	
TT-CAN-YC.....T.....	
TT-CAN-Z	
TT-CAN-AAC.....T.....	
TT-CAN-BB	
TT-CAN-CC	
TT-CAN-DD	
TT-CAN-EE	

TT-CAN-A	ATGCTATGTA	TTATTGTGCA	TTCATTTATT	TTCCATACGA	TAAGTTAAAG	200
TT-CAN-B	
TT-CAN-C	
TT-CAN-D	
TT-CAN-ET.....	
TT-CAN-F	
TT-CAN-G	
TT-CAN-H	
TT-CAN-I	
TT-CAN-J	
TT-CAN-K	
TT-CAN-L	
TT-CAN-M	
TT-CAN-N	
TT-CAN-O	
TT-CAN-P	
TT-CAN-Q	
TT-CAN-R	
TT-CAN-SC.....	
TT-CAN-T	
TT-CAN-U	
TT-CAN-V	
TT-CAN-W	
TT-CAN-XC.....	
TT-CAN-Y	
TT-CAN-Z	
TT-CAN-AA	
TT-CAN-BB	
TT-CAN-CC	
TT-CAN-DD	
TT-CAN-EE	

TT-CAN-A	CCCGTATTAA	TTATCATTAA	TTTACATAT	TACATAATAT	GCATGCTCTT	250
TT-CAN-BT.....	
TT-CAN-C	.T.....T.....	
TT-CAN-DT.....	
TT-CAN-ET.....	
TT-CAN-FT.....	
TT-CAN-GT.....	
TT-CAN-HT.....	
TT-CAN-IT.....	
TT-CAN-JT.....	
TT-CAN-K	.T.....T.....	
TT-CAN-L	.T.....T.....	
TT-CAN-MT.....	
TT-CAN-NT.....	
TT-CAN-OT.....	
TT-CAN-P	T.....T.....	
TT-CAN-QT.....	
TT-CAN-RT.....	
TT-CAN-ST.....	
TT-CAN-TT.....	
TT-CAN-UT.....	
TT-CAN-VT.....	
TT-CAN-WT.....	
TT-CAN-X	.T.....T.....	
TT-CAN-Y	.T.....	.T.....T...T...	
TT-CAN-ZT.....	
TT-CAN-AA	.T.....T.....	
TT-CAN-BBT.....	
TT-CAN-CCT.....	
TT-CAN-DD	.T.....T.....	
TT-CAN-EET.....	

TT-CAN-A	ACATATTATA	TATCCCCTAT	CAATCTTACC	TCCATTATAT	CCTATGGTCG	300
TT-CAN-BT.	T.....	
TT-CAN-C	CC...A....C..TA	
TT-CAN-DT.	T.....	
TT-CAN-ET...A...C...A	
TT-CAN-FT.....C...A	
TT-CAN-GT.....C...A	
TT-CAN-HC.....C...A	
TT-CAN-I	-...C...	
TT-CAN-JC..T.A	
TT-CAN-KC..TT.....A	
TT-CAN-LC...T...C..T.A	
TT-CAN-M	-.....	
TT-CAN-NC...A	
TT-CAN-O	-.....	
TT-CAN-P	T.....	
TT-CAN-Q	T.....	
TT-CAN-R	T.....	
TT-CAN-S	
TT-CAN-T	T.....	
TT-CAN-UT.....C...A	
TT-CAN-VT.....CC..A	
TT-CAN-W	-...T.	
TT-CAN-XC...A	
TT-CAN-YC...T...C..T.A	
TT-CAN-ZC...	T.....	
TT-CAN-AAC...T...C...A	
TT-CAN-BBT.....C...A	
TT-CAN-CC	-...C...	
TT-CAN-DD	T...C...TA	
TT-CAN-EET.....A	

TT-CAN-A	CTCCATTAGA	TCACGAGCTT	AATCACCATG	CCGCGTGAAA	CCAGCAACCC	350
TT-CAN-BT.....	
TT-CAN-C	
TT-CAN-DT.....	
TT-CAN-E	
TT-CAN-F	
TT-CAN-G	G.....	
TT-CAN-H	
TT-CAN-I	
TT-CAN-J	
TT-CAN-K	
TT-CAN-L	
TT-CAN-M	
TT-CAN-N	
TT-CAN-O	
TT-CAN-P	
TT-CAN-Q	
TT-CAN-R	
TT-CAN-S	
TT-CAN-TT.....	
TT-CAN-U	
TT-CAN-V	
TT-CAN-W	
TT-CAN-X	
TT-CAN-Y	
TT-CAN-Z	
TT-CAN-AA	
TT-CAN-BB	
TT-CAN-CC	
TT-CAN-DD	
TT-CAN-EE	

TT-CAN-A	GCTTGGCAGG	GATCCCTCTT	CTCGCACCGG	GCCCATACCT	CGTGGGGGT	399
TT-CAN-B	...C.....	
TT-CAN-C	...C.....	
TT-CAN-D	...C.....T..	
TT-CAN-ET..	
TT-CAN-FT..	
TT-CAN-G	...C.....T..	
TT-CAN-H	...C.....T..	
TT-CAN-IT..	
TT-CAN-JT..	
TT-CAN-KT..	
TT-CAN-L	...C.....T..	
TT-CAN-M	
TT-CAN-N	...C.....T..	
TT-CAN-O	
TT-CAN-P	
TT-CAN-Q	
TT-CAN-RT..	
TT-CAN-S	
TT-CAN-TT..	
TT-CAN-U	...C.....T..	
TT-CAN-V	
TT-CAN-W	
TT-CAN-X	...C.....T..	
TT-CAN-Y	...C.....T..	
TT-CAN-Z	
TT-CAN-AA	...C.....T..	
TT-CAN-BB	...C.....	
TT-CAN-CCT..	
TT-CAN-DD	
TT-CAN-EE	

2. Secuencias de la región D-loop de los haplotipos de calderón tropical (*Globicephala macrorhynchus*) del Archipiélago Canario

GM-CAN-A	AAAAAGCTTA	TTGTATAATT	ACCACAACAT	TACAGTACTA	TGTCAGTATT	50
GM-CAN-B	
GM-CAN-CC..	
GM-CAN-D	
GM-CAN-EC	A.....	
GM-CAN-FC	A.....	
GM-CAN-G	
GM-CAN-HC	A.....	
GM-CAN-IC	A.....	
GM-CAN-J	A.....	
GM-CAN-K	

GM-CAN-A	AAAAGTAATT	TATTTTAAAA	ACATTTTACT	GTACACATCA	CATATATATA	100
GM-CAN-B	
GM-CAN-C	
GM-CAN-D	
GM-CAN-E	
GM-CAN-F	
GM-CAN-G	
GM-CAN-H	
GM-CAN-I	
GM-CAN-J	
GM-CAN-K	

GM-CAN-A	TATACGTACA	CATACCAATA	TCTAGTCTTT	CCTTATAAAT	ATCTATATAT	150
GM-CAN-B	
GM-CAN-C	..--.....	
GM-CAN-D	
GM-CAN-E	
GM-CAN-F	
GM-CAN-G	
GM-CAN-H	
GM-CAN-I	
GM-CAN-J	
GM-CAN-K	

GM-CAN-A	ACATGCTATG	TATTACTGTG	CATTCATTTA	TTTTCCATAC	GGTAAGTTAA	200
GM-CAN-B	
GM-CAN-C	
GM-CAN-D	
GM-CAN-E	
GM-CAN-F	
GM-CAN-G	
GM-CAN-H	
GM-CAN-I	
GM-CAN-J	
GM-CAN-K	

GM-CAN-A	AGCCCGTATT	AATTATCATT	AATTTTACAT	ATTACATAAT	ATGTATGCTC	250
GM-CAN-B	
GM-CAN-C	
GM-CAN-D	
GM-CAN-E	
GM-CAN-F	
GM-CAN-G	
GM-CAN-H	
GM-CAN-I	
GM-CAN-J	
GM-CAN-K	

GM-CAN-A	TTACATATTA	TATATCCTCT	AACAATTTTA	CCTCCATTAT	ATCCTATGGT	300
GM-CAN-B	
GM-CAN-C	
GM-CAN-D	
GM-CAN-E	
GM-CAN-F	
GM-CAN-G	
GM-CAN-H	
GM-CAN-I	
GM-CAN-J	
GM-CAN-K	

GM-CAN-A	CGCTTATATT	AGACCACGAG	CTTTATCACC	ATGCCGCGTG	AAACCAGCAA	350
GM-CAN-BC.....	
GM-CAN-C	
GM-CAN-DA.....	
GM-CAN-E	
GM-CAN-F	
GM-CAN-GA.....	
GM-CAN-HA.....	
GM-CAN-I	
GM-CAN-J	
GM-CAN-K	

Anexo I : Secuencias

GM-CAN-A	CCCGCTCGGC	AGGGATCCCT	CTTCTCGCAC	CGGGCCCATA	CACCGTGGGG	400
GM-CAN-BT...	
GM-CAN-C	
GM-CAN-D	
GM-CAN-E	
GM-CAN-FT...	
GM-CAN-GT...	
GM-CAN-H	
GM-CAN-I	T.....	
GM-CAN-J	
GM-CAN-KT...	

GM-CAN-A	GT	402
GM-CAN-B	..	
GM-CAN-C	..	
GM-CAN-D	..	
GM-CAN-E	..	
GM-CAN-F	..	
GM-CAN-G	..	
GM-CAN-H	..	
GM-CAN-I	..	
GM-CAN-J	..	
GM-CAN-K	..	

3. Secuencias de la región D-loop de los haplotipos de delfín común (*Delphinus delphis*) del Archipiélago Canario

DD-CAN-A	AAAAAGCTTA	TTGTACAATT	ACCACAACAT	CACAGTACTA	CGTCAGTATT	50
DD-CAN-B	
DD-CAN-C	
DD-CAN-D	
DD-CAN-E	
DD-CAN-F	
DD-CAN-G	
DD-CAN-HA.....	
DD-CAN-I	
DD-CAN-J	
DD-CAN-K	
DD-CAN-L	
DD-CAN-MA.....	
DD-CAN-N	
DD-CAN-OA.....	
DD-CAN-PA.....	
DD-CAN-QA.....	
DD-CAN-R	
DD-CAN-SA.....	
DD-CAN-TA.....	
DD-CAN-U	

DD-CAN-A	AAAAGTAATT	TGTTTTAAAA	ACATTTTACT	GTACACATTA	CATACACATA	100
DD-CAN-B	
DD-CAN-C	
DD-CAN-D	
DD-CAN-E	
DD-CAN-F	
DD-CAN-G	
DD-CAN-H	
DD-CAN-I	
DD-CAN-J	
DD-CAN-K	
DD-CAN-L	
DD-CAN-M	
DD-CAN-N	
DD-CAN-O	
DD-CAN-PT.....	
DD-CAN-Q	
DD-CAN-R	
DD-CAN-S	
DD-CAN-T	
DD-CAN-U	

DD-CAN-A	CACACGTACA	TGCTAATATT	TAGTCTCTCC	TTGTAAATAT	TCATATATTC	150
DD-CAN-B	...GT.....	
DD-CAN-C	...T.....	
DD-CAN-D	...T.....A.	
DD-CAN-E	...T.....	
DD-CAN-F	...T.....	
DD-CAN-G	...T.....	...C.....	
DD-CAN-H	...T.....G..	
DD-CAN-I	...T.....	
DD-CAN-J	...T.....	
DD-CAN-K	...T.....	
DD-CAN-L	...T.....G..	
DD-CAN-MGA..	
DD-CAN-N	
DD-CAN-O	...GT.....	
DD-CAN-P	...T.....A.	
DD-CAN-Q	...T.....	
DD-CAN-R	...T.....	
DD-CAN-S	...T.....	
DD-CAN-TG.....	
DD-CAN-U	...T.....	

DD-CAN-A	ATGCTATGTA	TTATTGTGCA	TTCATTTATT	TTCCATACGA	TAAGTTAAAG	200
DD-CAN-B	
DD-CAN-C	
DD-CAN-D	
DD-CAN-E	
DD-CAN-F	
DD-CAN-G	
DD-CAN-H	
DD-CAN-I	
DD-CAN-J	
DD-CAN-K	
DD-CAN-L	
DD-CAN-M	
DD-CAN-N	
DD-CAN-O	
DD-CAN-P	
DD-CAN-Q	
DD-CAN-R	
DD-CAN-S	
DD-CAN-T	
DD-CAN-U	

DD-CAN-A	CTCGTATTAA	TTATCATTAA	TTTTACATAT	TACATAAATAT	GCATACTCTT	250
DD-CAN-BG.....	
DD-CAN-CC.....	
DD-CAN-DG.....	
DD-CAN-EC.....	
DD-CAN-FC.....	
DD-CAN-GT.G.....	
DD-CAN-H	.C.....G.....	
DD-CAN-IC.....	
DD-CAN-JG.....	
DD-CAN-KC.....	
DD-CAN-L	.C.....G.....	
DD-CAN-M	.C.....G.....	
DD-CAN-NG.....	
DD-CAN-OG.....	
DD-CAN-PG.....	
DD-CAN-Q	.C.....C.....	
DD-CAN-RG.....	
DD-CAN-SC.....	
DD-CAN-TG.....	
DD-CAN-UC.....	
DD-CAN-A	ACATATTATA	TATCCCCTTC	AATTCATTC	CCATTATATT	CTATGGTCGC	300
DD-CAN-BCC.C.	
DD-CAN-CC.CC	
DD-CAN-DC.....C.T.	
DD-CAN-ET.C.C	
DD-CAN-FCC	
DD-CAN-GC.CC	
DD-CAN-HTCC	
DD-CAN-ICTCC	
DD-CAN-JC.CC	
DD-CAN-KCC.C	
DD-CAN-LTCC	
DD-CAN-MTCC	
DD-CAN-N	
DD-CAN-OCCTC.	
DD-CAN-PC.....T.	
DD-CAN-QC.CC	
DD-CAN-RCC.CCA.	
DD-CAN-SC.CC	
DD-CAN-TCA.	
DD-CAN-UC.CC	T.....	

DD-CAN-A	TCCATTAGAT	CACGAGCTTA	ATCACCATGC	CGCGTGAAAC	CAGCAACCCG	350
DD-CAN-B	
DD-CAN-C	
DD-CAN-DG	
DD-CAN-E	
DD-CAN-F	
DD-CAN-G	
DD-CAN-HG	
DD-CAN-I	
DD-CAN-JC	
DD-CAN-K	
DD-CAN-LG	
DD-CAN-MG	
DD-CAN-N	
DD-CAN-O	
DD-CAN-PG	
DD-CAN-Q	
DD-CAN-RG	
DD-CAN-S	
DD-CAN-T	
DD-CAN-U	

DD-CAN-A	CTTGCCAGGG	ATCCCTCTTC	TCGCACCGGG	CCCATACCTC	GTGGGGGT	398
DD-CAN-B	
DD-CAN-C	
DD-CAN-DT	
DD-CAN-ET	
DD-CAN-F	
DD-CAN-GCT	
DD-CAN-HT	
DD-CAN-IT	
DD-CAN-J	
DD-CAN-K	
DD-CAN-LT	
DD-CAN-MT	
DD-CAN-N	
DD-CAN-O	
DD-CAN-PT	
DD-CAN-Q	
DD-CAN-R	
DD-CAN-S	
DD-CAN-T	
DD-CAN-U	

4. Secuencia de la región D-loop del haplotipo de rorcual tropical (*Balaenopetera edeni*) del Archipiélago Canario

BE-CAN-A	AAAAGTATAT	TGTATAATAA	CCACAAGGCT	ACAGTGTAT	GTCCGTATCG	50
BE-CAN-A	AAAAAAAAAC	TTGTCTTGTC	ACATATTACT	ATGTGATTG	TACATGTATA	100
BE-CAN-A	TACCTTCCCA	TAACCTAATT	AATAGTCTTC	TCTTATGGGG	ATGTATATAT	150
BE-CAN-A	ATACATGCTA	TGTATAACTG	TGCATTCAAT	TATTTTCACT	ACGAGCAGTT	200
BE-CAN-A	AAAGCTCGTA	TTAAATTTTA	TTAATTTTAC	ATATTACATA	ATATTTATTA	250
BE-CAN-A	ATAGTACAAT	AGCGCATGTC	ATTATGCATC	CTCTGGTCAA	TTACATTCAA	300
BE-CAN-A	ATGATTCTTA	TGGCCGCTCC	ATTAGATCAC	GAGCTTAATC	ACCATGCCGC	350
BE-CAN-A	GTGAAACCAG	CAACCCGCTC	GGCAGGGATC	CCTCTTCTCG	CACCGGGCCC	400
BE-CAN-A	ATCAGTCGTG	GGGGT	415			

5. Secuencia de la región D-loop del haplotipo de un zifio de Gervais (*Mesoplodon europaeus*) del Archipiélago Canario

ME-CAN-A	AAAACCTTT	ATTATAGAAT	CACCACAACC	CTACAGTACT	ACGTCAGTAT	50
ME-CAN-A	TGAAAAAAAA	TATCCCACAG	TACATTTACT	GTATTAATCA	CACAAACACC	100
ME-CAN-A	CCCCACCCAC	CATCAATATA	TGCGTCTCTC	CAGAACTGTA	TGTATATATA	150
ME-CAN-A	TACTATGTAT	AACTGTGCAT	TCATTTATTT	TCACTACGGA	GAGTTAAAGC	200
ME-CAN-A	TCGTAATTAA	TTTTTTTTTAT	TTTACATAAG	TACATAATTT	GCATTAATCG	250
ME-CAN-A	TACATGTGCC	CGTTCCATTA	GATCACGAGC	TTAATCACCA	TGCCGCGTGA	300
ME-CAN-A	AACCAGCAAC	CCGCTCGGCA	GGGATCCCTC	TTCTCGCACC	GGGCCCATCA	350
ME-CAN-A	ATCGTGGGGG	T	360			

6. Secuencias del gen COI de los haplotipos de varias especies de cetáceos del Archipiélago Canario

	Y	P	P	L	A	G	N	L	A	H	A	G	A	S	
BP-CAN-I	TAT	CCC	CCC	TTA	GCC	GGA	AAT	TTA	GCA	CAT	GCA	GGA	GCC	TCA	42
BE-CAN-IT	C..	
SF-CAN-I	..C	..T	..T	C..	C.G	
SF-CAN-II	..C	..T	..T	C..	C.G	
SF-CAN-III	..C	..T	..T	C.G	C.G	
SF-CAN-IV	..C	..T	..T	C..	C.G	
SC-CAN-I	..C	..T	..T	C..	C..	
SC-CAN-II	..C	..T	..T	C..	C.G	
SC-CAN-III	..C	..T	..T	C..	C..	
DD-CAN-I	..C	..T	..T	C..	C.G	
DD-CAN-II	..C	..T	..T	C..	C..	
DD-CAN-III	..C	..T	..T	C..	C..	
TT-CAN-I	..CT	C..	..G	C..	
TT-CAN-II	..CT	C..	..G	C..	
TT-CAN-III	..CT	C..	..G	C..	
TT-CAN-IV	..CT	C..	..G	C..	
GM-CAN-I	..CT	C..	..G	C..	
GM-CAN-II	..CT	C..	..G	C..	
ME-CAN-IT	...	C..	..TC	C..CT	
PM-CAN-I	..CT	C..A	..C	

	V	D	L	T	I	F	S	L	H	L	A	G	V	S	
BP-CAN-I	GTT	GAC	CTT	ACC	ATC	TTC	TCC	CTA	CAC	TTA	GCC	GGC	GTA	TCC	84
BE-CAN-I	..CT	C..T	
SF-CAN-I	..AT	..TTTTT	
SF-CAN-II	..AT	..TTTTT	
SF-CAN-III	..AT	..TTTTT	
SF-CAN-IV	..AT	..TTTTT	
SC-CAN-I	..AT	..TTTTT	
SC-CAN-II	..AT	..TTTT	..G	..T	
SC-CAN-III	..AT	..TTTTT	
DD-CAN-I	..AT	..TTTTT	
DD-CAN-II	..AT	..TTTTT	
DD-CAN-III	..AT	..TTTTT	
TT-CAN-I	..ATTT	C..	
TT-CAN-II	..ATTT	C..	
TT-CAN-III	..ATTT	C..	
TT-CAN-IV	..ATTT	C..	
GM-CAN-I	..ATTT	C..	..TA	
GM-CAN-II	..ATTT	C..	..TAC	
ME-CAN-IT	..A	..T	..T	..TA	..T	..C	
PM-CAN-I	..AT	C..	..T	..T	..C	

	S	I	L	G	A	I	N	F	I	T	T	I	I	N	
BP-CAN-I	TCA	ATC	CTC	GGA	GCC	ATC	AAC	TTT	ATC	ACA	ACC	ATT	ATC	AAC	126
BE-CAN-ITT	..C	..TTT	..T	
SF-CAN-ITT	..TCT	..C	..T	..T	
SF-CAN-IITT	..TCT	..C	..T	..T	
SF-CAN-IIITT	..TCT	..C	..T	..T	
SF-CAN-IVTT	..TCT	..C	..T	..T	
SC-CAN-ITT	..TC	..TT	..C	..T	..T	
SC-CAN-IIT	..G	..T	..TCT	..C	..T	..T	
SC-CAN-IIITT	..TCT	..C	..T	..T	
DD-CAN-ITT	..TCT	..C	..T	..T	
DD-CAN-IITT	..TCT	..C	..T	..T	
DD-CAN-IIITT	..TCT	..C	..T	..T	
TT-CAN-ITT	..C	..TT	..T	
TT-CAN-IITT	..C	..TT	..T	
TT-CAN-IIITT	..C	..TT	..T	
TT-CAN-IVTT	..C	..TT	..T	
GM-CAN-ITT	..C	..T	..GT	..T	
GM-CAN-IITT	..C	..T	..GT	..T	
ME-CAN-IATTT	...	
PM-CAN-ITT	

	M	K	P	P	A	M	T	Q	Y	Q	T	P	L	F	
BP-CAN-I	ATA	AAA	CCA	CCC	GCC	ATA	ACC	CAG	TAT	CAA	ACT	CCC	CTT	TTC	168
BE-CAN-ITGAGC	...	
SF-CAN-ITT	..A	..CAC	...	
SF-CAN-IITT	..A	..CAC	...	
SF-CAN-IIITT	..A	..CAC	...	
SF-CAN-IVTT	..A	..CAC	...	
SC-CAN-ITT	..A	..CAC	...	
SC-CAN-IITT	..A	..CAC	...	
SC-CAN-IIITT	..A	..CAC	...	
DD-CAN-ITT	..A	..CAC	...	
DD-CAN-IITT	..A	..CAC	...	
DD-CAN-IIITT	..A	..CAC	...	
TT-CAN-ITCAC	
TT-CAN-IITCAC	
TT-CAN-IIITCAC	
TT-CAN-IVTCAC	
GM-CAN-I	A.TA	..CAC	...	
GM-CAN-II	A.TA	..CAC	...	
ME-CAN-IC	..T	..T	..G	..T	..A	..CA	..T	T.A	...	
PM-CAN-IC	..AT	..A	..CA	..T	..C	...	

Anexo I : Secuencias

	V	W	S	V	L	V	T	A	V	L	L	L	L	S	
BP-CAN-I	GTA	TGA	TCA	GTC	CTA	GTC	ACA	GCA	GTA	CTA	CTC	CTA	TTA	TCA	210
BE-CAN-ICTGG	
SF-CAN-I	..CC	T..	..T	T..	
SF-CAN-II	..CC	T..	..T	T..	C..	...	
SF-CAN-III	..CC	T..	..T	T..	C..	...	
SF-CAN-IV	..CC	T..	..T	T..	C..	...	
SC-CAN-I	..C	T..C	T..	..T	T..	C..	...	
SC-CAN-II	..C	T..C	T..	..T	T..	C.G	...	
SC-CAN-III	..C	T..C	T..	..T	T..	C..	...	
DD-CAN-I	..C	T..C	T..	..T	T..	C..	...	
DD-CAN-II	..C	T..C	T..	..T	T..	C..	...	
DD-CAN-III	..C	T..C	T..	..T	T..	C..	...	
TT-CAN-ITT	...	T..	...	T..	C..	...	
TT-CAN-IITT	...	T..	...	T..	C..	...	
TT-CAN-IIITT	...	T..	...	T..	C..	...	
TT-CAN-IVTT	...	T..	...	T..	C..	...	
GM-CAN-ITT	T.C	C..	...	
GM-CAN-IITT	T.C	C..	...	
ME-CAN-IT	C..	...
PM-CAN-IT	A..T	T..G	..T	...	T.GC	C..	..C	

	L	P	V	L	A	A	G	I	T	M	L	L	T	D	
BP-CAN-I	CTA	CCT	GTT	TTA	GCA	GCC	GGA	ATT	ACA	ATG	CTA	CTT	ACT	GAC	252
BE-CAN-I	T..CC	..C	
SF-CAN-I	T..	C..T	..AA	..C	..T	
SF-CAN-II	T..	C..T	..AA	..C	..T	
SF-CAN-III	T..	C..T	..AA	..C	..T	
SF-CAN-IV	T..	C..T	..AA	..C	..T	
SC-CAN-I	T..	C..TA	..C	..T	
SC-CAN-II	T..	C..TA	..C	..T	
SC-CAN-III	T..	C..TA	..C	..T	
DD-CAN-I	T..	C..T	..A	...	T.A	..C	..T	
DD-CAN-II	T..	C..T	..A	...	T.A	..C	..T	
DD-CAN-III	T..	C..T	..A	...	T.A	..C	..T	
TT-CAN-IC	..C	C..GC	..A	..G	T.G	G..	...	
TT-CAN-IIC	..C	C..GC	..A	..G	T.G	G..	...	
TT-CAN-IIIC	..C	C..GC	..A	..G	T.G	G..	...	
TT-CAN-IVC	..C	C..GC	..A	..G	T.G	G..	...	
GM-CAN-IC	..C	C..C	..A	...	T.G	
GM-CAN-IIC	..C	C..C	..A	...	T.G	
ME-CAN-I	C..TT	..A	T..	T.A	..A	...	
PM-CAN-IA	..CTC	..C	..A	..G	T.A	..C	...	

	R	N	L	N	T	T	F	F	D	P	A	G	G	G	
BP-CAN-I	CGA	AAC	CTA	AAT	ACA	ACT	TTC	TTC	GAC	CCT	GCA	GGT	GGA	GGA	294
BE-CAN-IC	
SF-CAN-ITCC	..TGAT	
SF-CAN-IITCC	..TGAT	
SF-CAN-IIITCC	..TAAT	
SF-CAN-IVTCC	..TGAT	
SC-CAN-ITCC	..TT	..GAT	
SC-CAN-IITCC	..TGAT	
SC-CAN-IIITCC	..TT	..GAT	
DD-CAN-ITCC	..TGAT	
DD-CAN-IITCC	..TGAT	
DD-CAN-IIIT	T..	..CC	..TGAT	
TT-CAN-ICCTA	
TT-CAN-IICCTA	
TT-CAN-IIICCTA	
TT-CAN-IVCCTA	
GM-CAN-ICC	..TT	..CAC	
GM-CAN-IICC	..TT	..CAC	
ME-CAN-ITCCTA	..G	...	
PM-CAN-ITGA	

	D	P	I	L	Y	Q	H	L	F	W	F	F	G	H	
BP-CAN-I	GAC	CCA	ATC	CTG	TAC	CAA	CAC	CTA	TTC	TGA	TTC	TTT	GGC	CAC	336
BE-CAN-IT	T..	
SF-CAN-I	T.A	T..TT	
SF-CAN-II	T.A	T..TT	
SF-CAN-III	T.A	T..TT	
SF-CAN-IV	T.A	T..TT	
SC-CAN-I	T.A	..T	T..TT	
SC-CAN-II	T.A	..T	T..TT	
SC-CAN-III	T.A	..T	T..TT	
DD-CAN-I	T.A	..T	T..TT	
DD-CAN-II	T.A	..T	T..TT	
DD-CAN-III	T.A	..TTT	
TT-CAN-IT	T..	..TC	...	
TT-CAN-IIT	T..	..TC	...	
TT-CAN-IIIT	T..	..TC	...	
TT-CAN-IVT	T..	..TC	...	
GM-CAN-I	T..	..T	
GM-CAN-II	T..	..T	
ME-CAN-IT	..A	..TT	..T	
PM-CAN-IT	G.T	T..	..T	T..C	..T	...	

Anexo I : Secuencias

	P	E	V	Y	I	L	I	L	P	G	F	G	M	I	
BP-CAN-I	CCT	GAG	GTA	TAT	ATC	CTA	ATT	CTT	CCT	GGG	TTC	GGA	ATA	ATT	378
BE-CAN-I	..C	..AT	
SF-CAN-IAT	T..A	..C	..C	..T	
SF-CAN-IIAT	T..A	..C	..C	..T	
SF-CAN-IIIAT	T..A	..C	..C	..T	
SF-CAN-IVAT	T..A	..C	..C	..T	
SC-CAN-IAT	T..A	..C	..C	..T	
SC-CAN-IIAT	T..A	..C	..C	..T	
SC-CAN-IIIAT	T..A	..C	..C	..T	
DD-CAN-IAT	T..A	..C	..C	..T	
DD-CAN-IIAT	T..A	..C	..C	..T	
DD-CAN-IIIT	T..A	..C	..C	..T	
TT-CAN-I	..C	..AGTC	T..AC	..T	
TT-CAN-II	..C	..AGTC	T..AC	
TT-CAN-III	..C	..AGTC	T..AC	
TT-CAN-IV	..C	..AGTC	T..AC	..T	
GM-CAN-I	..C	..AT	..G	..C	..AC	
GM-CAN-II	..C	..AT	..G	..C	..AC	
ME-CAN-I	..C	..AC	..TAAGC	
PM-CAN-ICTC	..ACC	

	S	H	I	V	T	Y	Y	S	G	K	K	E	P	F	
BP-CAN-I	TCA	CAC	ATT	GTG	ACT	TAT	TAC	TCA	GGA	AAA	AAA	GAA	CCC	TTT	420
BE-CAN-ICT	..C	
SF-CAN-IC	..TTGT	...	
SF-CAN-IIC	..TTGT	...	
SF-CAN-IIIC	..TTGT	...	
SF-CAN-IVC	..TTGT	...	
SC-CAN-IC	..TTGT	...	
SC-CAN-IIC	..TTGT	...	
SC-CAN-IIIC	..TTGT	...	
DD-CAN-IC	..TTGT	...	
DD-CAN-IIC	..TTGT	...	
DD-CAN-IIIC	..TTGT	...	
TT-CAN-IC	..ACGT	...	
TT-CAN-IIC	..ACGTT	..C	
TT-CAN-IIIC	..ACGTT	..C	
TT-CAN-IVC	..ACGT	...	
GM-CAN-ITA	..C	..CGT	...	
GM-CAN-IITA	..C	..CGT	...	
ME-CAN-IT	..C	..A	..CGT	..C	
PM-CAN-I	..CC	..AT	..C	..GG	

	G	Y	M	G	M	V	W	A	M	V	S	I	G	F	
BP-CAN-I	GGC	TAC	ATA	GGA	ATA	GTT	TGA	GCT	ATG	GTG	TCC	ATT	GGG	TTT	462
BE-CAN-IGCA	..T	..CC	
SF-CAN-I	..G	..T	..GAA	..T	..TT	..C	
SF-CAN-II	..G	..T	..GAA	..T	..TT	..C	
SF-CAN-III	..G	..T	..GAA	..T	..TT	..C	
SF-CAN-IV	..G	..T	..GAA	..T	..TT	..C	
SC-CAN-I	..G	..T	..GAA	..T	..TT	..C	
SC-CAN-II	..G	..T	..GAA	..T	..TT	..C	
SC-CAN-III	..G	..T	..GAA	..T	..TT	..C	
DD-CAN-I	..G	..T	..GAA	..T	..TT	..C	
DD-CAN-II	..G	..T	..GAA	..T	..TT	..C	
DD-CAN-III	..G	..T	..GAA	..T	..TT	..C	
TT-CAN-I	..G	..T	..GAC	..A	..T	..TC	..C	
TT-CAN-II	..G	..T	..GCC	..A	..T	..T	..CC	
TT-CAN-III	..G	..T	..GCC	..A	..T	..T	..CC	
TT-CAN-IV	..G	..T	..GAC	..A	..T	..TT	..C	
GM-CAN-I	..A	..TT	..TC	
GM-CAN-II	..G	..TT	..TC	
ME-CAN-I	..G	..T	..GCA	..TC	..A	..C	
PM-CAN-I	..A	..T	..GC	..GA	A.C	..TA	..C	

	L	G	F	I	V	W	A	H	H	M	F	T	V	G	
BP-CAN-I	TTA	GGC	TTT	ATC	GTA	TGA	GCC	CAT	CAT	ATG	TTT	ACA	GTA	GGT	504
BE-CAN-IAT	..CA	
SF-CAN-I	C..	..T	..C	..TTCT	..A	
SF-CAN-II	C..	..T	..C	..TTCT	..A	
SF-CAN-III	C..	..T	..C	..TTCT	..A	
SF-CAN-IV	C..	..T	..C	..TTCT	..A	
SC-CAN-I	C..	..T	..C	..TTA	..CT	..A	
SC-CAN-II	C..	..T	..C	..TTA	..CT	..A	
SC-CAN-III	C..	..T	..C	..TTA	..CT	..A	
DD-CAN-I	C..	..T	..C	..TTA	..CT	..A	
DD-CAN-II	C..	..T	..C	..TTA	..CT	..A	
DD-CAN-III	C..	..T	..C	..TTA	..CT	..A	
TT-CAN-I	C..TA	..CT	...	
TT-CAN-IITG	..TA	..C	..G	..T	...	
TT-CAN-IIITTA	..C	..G	..T	...	
TT-CAN-IVTTA	..CT	...	
GM-CAN-I	C..G	..TA	..CT	..A	
GM-CAN-II	C..G	..TA	..CT	..A	
ME-CAN-I	C..T	..CA	..CC	..A	
PM-CAN-IC	..C	..A	..C	..T	

	M	D	V	D	T	R	A	Y	F	T	S	A	T	M	
BP-CAN-I	ATA	GAC	GTT	GAT	ACA	CGA	GCA	TAC	TTC	ACA	TCC	GCC	ACT	ATA	546
BE-CAN-IGTA	
SF-CAN-IG	..CTA	..T	
SF-CAN-IIG	..CTA	..T	
SF-CAN-IIIG	..CT	..TA	..T	
SF-CAN-IVG	..CT	..TA	..T	
SC-CAN-IG	..CT	..TA	..T	
SC-CAN-IIG	..CT	..TA	..T	
SC-CAN-IIIG	..CT	..TA	..T	
DD-CAN-IA	..CT	..TA	..T	
DD-CAN-IIA	..CT	..TA	..T	
DD-CAN-IIIG	..CT	..TA	..T	
TT-CAN-IC	..C	..GT	..TA	
TT-CAN-IIC	..C	..GT	..TA	
TT-CAN-IIIC	..C	..GT	..TA	
TT-CAN-IVC	..CT	..TA	
GM-CAN-IAT	..TA	
GM-CAN-IIAT	..TA	
ME-CAN-ITAC	...	
PM-CAN-I	..G	..TCTA	

	I	I	A	I	P	T	G	V	K	V	F	S	W	L	
BP-CAN-I	ATT	ATC	GCT	ATT	CCC	ACA	GGA	GTA	AAA	GTA	TTC	AGT	TGA	TTA	588
BE-CAN-IT	..CC	
SF-CAN-IATTC	
SF-CAN-IIATTC	
SF-CAN-IIIATTC	
SF-CAN-IVATTC	
SC-CAN-IATTC	
SC-CAN-IIATTC	
SC-CAN-IIIATTC	
DD-CAN-IATTCC	
DD-CAN-IIATTC	
DD-CAN-IIIATTC	
TT-CAN-I	..C	..T	..A	..CC	
TT-CAN-II	..C	..TCC	..T	
TT-CAN-III	..C	..TCC	..T	
TT-CAN-IV	..C	..T	..A	..CC	
GM-CAN-ITCC	..T	
GM-CAN-IITCC	..T	
ME-CAN-ITCT	..T	..C	
PM-CAN-I	..C	..T	..C	..C	..T	A..CC	...	C..G	

	A	T	L	H	G	G	N	I	K	W	S	P	A	L	
BP-CAN-I	GCA	ACA	CTA	CAC	GGG	GGT	AAC	ATT	AAA	TGA	TCT	CCT	GCC	CTA	630
BE-CAN-IAT	
SF-CAN-ITA	..A	..T	
SF-CAN-IITA	..A	..T	
SF-CAN-IIITA	..A	..T	
SF-CAN-IVTA	..A	..T	
SC-CAN-ITA	..A	..T	
SC-CAN-IITA	..A	..T	
SC-CAN-IIITA	..A	..T	
DD-CAN-ITA	..A	..T	
DD-CAN-IITA	..A	..T	
DD-CAN-IIITA	..A	..T	
TT-CAN-ITA	..A	..TC	
TT-CAN-II	...	T..	..TA	..G	..TC	
TT-CAN-III	...	T..	..TA	..G	..TC	
TT-CAN-IVTA	..A	..TC	
GM-CAN-I	...	T..	..TA	..G	..TCAT	...	
GM-CAN-II	...	T..	..TA	..G	..TCAT	...	
ME-CAN-IG	..T	..T	..A	..AC	..C	..T	T..	
PM-CAN-IC	..C	..T	..A	..CC	

	M	W	A	L	G	F	I	F	L	F	T	V	G	G	
BP-CAN-I	ATA	TGA	GCT	CTA	GGA	TTC	ATC	TTC	CTT	TTC	ACA	GTA	GGC	GGT	672
BE-CAN-I	..GCT	
SF-CAN-IC	..T	T.AA	...	
SF-CAN-IIC	..T	T.AA	...	
SF-CAN-IIIC	..T	T.AA	...	
SF-CAN-IVC	..T	T.AA	...	
SC-CAN-IC	..T	T.AA	...	
SC-CAN-IIC	..T	T.AA	...	
SC-CAN-IIIC	..T	T.AA	...	
DD-CAN-IC	..T	T.AA	...	
DD-CAN-IIC	..T	T.AA	...	
DD-CAN-IIIC	..T	T.AG	...	
TT-CAN-I	C.CC	..T	..TGT	..C	
TT-CAN-II	C.CC	..T	..TCT	..C	
TT-CAN-III	C.CC	..T	..TCT	..C	
TT-CAN-IV	C.CC	..T	..TCT	..C	
GM-CAN-I	C.CC	..T	..TCT	..C	
GM-CAN-II	C.CC	..T	..TCT	..C	
ME-CAN-I	..GC	..T	..T	..T	..C	..T	..TT	...	
PM-CAN-IC	T..	..CT	..T	..C	..TT	..C	

Anexo I : Secuencias

	L	T	G	I	V	L	A	N	S	S	L	D	I	V	
BP-CAN-I	CTA	ACT	GGT	ATC	GTC	CTA	GCC	AAC	TCA	TCA	TTA	GAC	ATT	GTC	714
BE-CAN-ITTT	C..	..T	
SF-CAN-IC	A..TC	C..	..T	..C	A..	
SF-CAN-IIC	A..TC	C..	..T	..C	A..	
SF-CAN-IIIC	A..TC	C..	..T	..C	A..	
SF-CAN-IVC	A..TC	C..	..T	..C	A..	
SC-CAN-I	T..	..CT	A..TC	C..	..T	..C	A..	
SC-CAN-IIC	A..TG	..CT	..C	A..	
SC-CAN-IIIC	A..TCT	..C	A..	
DD-CAN-IC	A..TC	C..	..T	..C	A..	
DD-CAN-IIC	A..TC	C..	..T	..C	A..	
DD-CAN-IIIC	A..TC	C..	..T	..C	A..	
TT-CAN-I	A..T	..TC	C..	..T	...	A..	
TT-CAN-IICT	..T	C..	T..TT	
TT-CAN-IIICT	..T	C..	T..TT	
TT-CAN-IV	T..	..C	A..T	..TC	C..	..T	...	A..	
GM-CAN-IC	...	A..TT	..T	C..	T..T	
GM-CAN-IICTT	..T	C..	T..TT	
ME-CAN-ICT	..TCA	
PM-CAN-I	T.GTT	...	C..	..T	..C	...	

	L	H	D	T	Y	Y	V	V	A	H	F	H	Y	V	
BP-CAN-I	CTA	CAC	GAT	ACT	TAC	TAT	GTA	GTC	GCT	CAC	TTC	CAC	TAT	GTC	756
BE-CAN-ICT	..CTT	
SF-CAN-I	..T	..T	..C	..C	..TTT	..TC	..G	
SF-CAN-II	..T	..T	..C	..C	..TTT	..TC	..A	
SF-CAN-III	..T	..T	..C	..C	..TTT	..TC	..A	
SF-CAN-IV	..T	..T	..C	..C	..TTT	..TC	..A	
SC-CAN-I	..T	..T	..C	..C	..TTTG		
SC-CAN-II	..T	..T	..C	..C	..TTT	..TG		
SC-CAN-III	..T	..T	..C	..C	..TTT	..TG		
DD-CAN-I	..T	..T	..C	..C	..TTT	..TA		
DD-CAN-II	..T	..T	..C	..C	..TTT	..TA		
DD-CAN-III	..T	..T	..C	..C	..TTT	..TG		
TT-CAN-I	..C	..T	..C	..CT	..C	..A	..TA		
TT-CAN-II	..C	..TCCC	..A	..TA		
TT-CAN-III	..C	..TCCC	..A	..TA		
TT-CAN-IVT	..C	..CT	..C	..A	..TA		
GM-CAN-I	A.C	..TCCC	..A	..TA		
GM-CAN-II	..C	..TCCC	..A	..TA		
ME-CAN-I	..T	..TT	..CT	..CA		
PM-CAN-I	..TACC	..T	

	L	S	M	G	A	V	F	A	I	M	G	G	F	V	
BP-CAN-I	CTA	TCA	ATA	GGG	GCA	GTC	TTC	GCC	ATT	ATA	GGA	GGC	TTT	GTC	798
BE-CAN-I	T..AG	
SF-CAN-I	..TA	..TTCC	..T	
SF-CAN-II	..TA	..TTCC	..T	
SF-CAN-III	..TA	..TTCC	..T	
SF-CAN-IV	..TA	..TTCC	..T	
SC-CAN-I	..TA	..TTCC	..T	
SC-CAN-II	..TA	..TTCC	..T	
SC-CAN-III	..TA	..TTCT	..C	..T	
DD-CAN-I	..TA	..T	..A	..TCC	..T	
DD-CAN-II	..TA	..T	..A	..TCC	..T	
DD-CAN-III	..TA	..T	..A	..TCC	..T	
TT-CAN-I	..TT	..A	..TTCG	
TT-CAN-II	..TT	..A	..TCG	
TT-CAN-III	..TT	..A	..TCG	
TT-CAN-IV	..TT	..A	..TTCG	
GM-CAN-I	..TT	..A	..TCG	
GM-CAN-II	..TT	..A	..TCG	
ME-CAN-IA	..TTCG	..C	...	
PM-CAN-I	..TA	..T	..T	..TCT	..C	..T	

	H	W	F	P	L	F	S	G	Y	T	L	N	T	T	
BP-CAN-I	CAC	TGA	TTT	CCA	CTA	TTC	TCA	GGG	TAT	ACA	CTT	AAC	ACA	ACA	840
BE-CAN-I	
SF-CAN-ICTC	..T	C..	...	
SF-CAN-IICTC	..T	C..	...	
SF-CAN-IIICTC	..T	C..	...	
SF-CAN-IVCTC	..T	C..	...	
SC-CAN-ICTC	...	C..	...	
SC-CAN-IICTC	...	C..	...	
SC-CAN-IIICTAC	...	C..	...	
DD-CAN-ICTC	...	C..	...	
DD-CAN-IIC	..GTC	...	C..	...	
DD-CAN-IIICTC	...	C..	...	
TT-CAN-ICA	..C	C..	...	
TT-CAN-IICA	..C	T..	...	
TT-CAN-IIICA	..C	T..	...	
TT-CAN-IVCA	..C	C..	...	
GM-CAN-ICA	..C	T..	...	
GM-CAN-IICA	..C	T..	...	
ME-CAN-IC	..CA	T..	...	
PM-CAN-IC	...	T..A	G..	C..C	...	

	W	A	K	I	H	F	M	I	M	F	V	G	V	N	
BP-CAN-I	TGA	GCA	AAA	ATT	CAC	TTC	ATA	ATC	ATG	TTC	GTA	GGT	GTA	AAC	882
BE-CAN-I	...	A..TT	..AT	
SF-CAN-I	...	A..A	...	G..	..T	..AT	
SF-CAN-II	...	A..A	...	G..	..T	..AT	
SF-CAN-III	...	A..A	...	G..	..T	..AT	
SF-CAN-IV	...	A..A	...	G..	..T	..AT	
SC-CAN-I	...	A..A	...	G..G	..T	..AT	
SC-CAN-II	...	A..A	...	G..	..T	..AT	
SC-CAN-III	...	A..A	...	G..	..T	..AT	
DD-CAN-I	...	A..A	...	G..	..T	..AT	
DD-CAN-II	...	A..A	...	G..	..T	..AT	
DD-CAN-III	...	A..A	...	G..	..T	..AT	
TT-CAN-IC	G..	..T	..A	..A	T..	
TT-CAN-IIC	T..	..TT	..A	..A	T..	
TT-CAN-IIIC	T..	..TT	..A	..A	T..	
TT-CAN-IVCTT	..A	...	T..	
GM-CAN-IC	T..	..TT	..A	..A	T..	
GM-CAN-IIC	T..	..TT	..A	..A	T..	
ME-CAN-I	G..	..T	..A	..TC	
PM-CAN-IC	..T	...	C..CA	..TC	

	L	T	F	F	P	Q	H	F	L	G	L	S	G	M	
BP-CAN-I	CTA	ACA	TTC	TTT	CCA	CAA	CAC	TTC	TTA	GGC	CTA	TCC	GGC	ATG	924
BE-CAN-IT	..A	
SF-CAN-I	A..GC	C..T	..A	...	
SF-CAN-II	A..GC	C..T	..A	...	
SF-CAN-III	A..GC	C..T	..A	...	
SF-CAN-IV	A..GC	C..T	..A	...	
SC-CAN-I	A..C	C..T	..A	...	
SC-CAN-II	A..GC	C..T	..A	...	
SC-CAN-III	A..GC	C..T	..A	...	
DD-CAN-I	A..GC	C..T	..A	...	
DD-CAN-II	A..GC	C..T	..A	...	
DD-CAN-III	A..GC	C..T	..A	...	
TT-CAN-ICG	..T	T..	...	A..	..A	
TT-CAN-IICG	..T	T..	...	A..	..A	
TT-CAN-IIICG	..T	T..	...	A..	..A	
TT-CAN-IVCT	T..	...	A..	..A	
GM-CAN-ICG	..T	T..	...	A..	..A	
GM-CAN-IICG	..T	T..	...	A..	..A	
ME-CAN-I	T..C	..TT	C..T	..A	...	
PM-CAN-I	..GC	..TT	...	C..A	

	P	R	R	Y	S	D	Y	P		
BP-CAN-I	CCT	CGA	CGA	TAT	TCC	GAT	TAC	CCA	GA	950
BE-CAN-ICC	
SF-CAN-ICT	..C	..T	
SF-CAN-IICT	..C	..T	
SF-CAN-IIICT	..C	..T	
SF-CAN-IVCT	..C	..T	
SC-CAN-ICT	..C	..T	
SC-CAN-IICT	..C	..T	
SC-CAN-IIICT	..C	..T	
DD-CAN-ICT	..C	..T	
DD-CAN-IICT	..C	..T	
DD-CAN-IIICC	..TT	
TT-CAN-I	...	T..	T..C	
TT-CAN-II	...	T..	T..C	
TT-CAN-III	...	T..	T..C	
TT-CAN-IV	...	T..	T..C	
GM-CAN-I	..A	T..	T..C	
GM-CAN-II	...	T..	T..C	
ME-CAN-IC	..A	..C	
PM-CAN-IC	..G	..C	..T	

7. Secuencias del gen NADH5 de los haplotipos de varias especies de cetáceos del Archipiélago Canario

	L	Q	Q	I	F	M	L	N	Q	N	P	L	N	F	
BP-CAN-1	CTA	CAA	CAA	ATC	TTT	ATA	CTC	AAC	CAA	AAC	CCC	TTA	AAT	TTC	42
BE-CAN-1	C.GT	
BE-CAN-2	C.GT	
BE-CAN-3	C.GT	
SF-CAN-1C	..C	..TT	...	CC	..TC	C..	
SC-CAN-1	T..T	..C	T..	..C	...	C..T	
DD-CAN-1	T..T	..C	T..	..C	...	C..T	
DD-CAN-2C	..C	..TT	...	CC	..TC	C..	
TT-CAN-1CTT	...	CC	..TC	C..	
TT-CAN-2	C..T	
TT-CAN-3	T..T	..C	T..	..C	...	C..T	
TT-CAN-4CTT	...	CC	..TC	C..	
GM-CAN-1	T..T	..C	T..	..C	...	C..T	
GM-CAN-2C	..C	..T	CC	..TC	C..	
PM-CAN-1C	GCG	..TT	A..	CC	..C	C..T	

	P	L	M	G	L	V	L	A	A	A	G	K	S	A	
BP-CAN-1	CCC	CTC	ATA	GGA	CTC	GTA	CTA	GCC	GCA	GCA	GGA	AAA	TCG	GCT	84
BE-CAN-1	A..T	..GA	..C	
BE-CAN-2	A..T	..GA	..C	
BE-CAN-3	A..T	..GA	..C	
SF-CAN-1	..T	A..T	AC.	T..TA	..C	
SC-CAN-1TTA	..C	
DD-CAN-1TTA	..C	
DD-CAN-2	..T	..T	A..	AC.	T..TA	..C	
TT-CAN-1	..T	...	G..	...	A..T	AC.	T..TA	..C	
TT-CAN-2T	..GA	..C	
TT-CAN-3TTA	..C	
TT-CAN-4	..T	A..T	AC.	T..TA	..C	
GM-CAN-1TTA	..C	
GM-CAN-2	..T	AC.TA	..C	
PM-CAN-1A	A..	T..TA	...	

	Q	F	G	L	H	P	W	L	P	S	A	M	E	G	
BP-CAN-1	CAA	TTC	GGA	CTC	CAC	CCT	TGA	CTC	CCA	TCA	GCA	ATA	GAA	GGT	126
BE-CAN-1	A..	
BE-CAN-2	T.A	A..	
BE-CAN-3	T.A	A..	
SF-CAN-1T	..T	..ACA	..CC	
SC-CAN-1TACT	
DD-CAN-1TACT	
DD-CAN-2T	..T	..A	..T	..CA	..CC	
TT-CAN-1T	..T	..AA	..CC	
TT-CAN-2	
TT-CAN-3TACT	
TT-CAN-4T	..T	..AA	..CC	
GM-CAN-1TACT	
GM-CAN-2T	..T	..AAA	..C	
PM-CAN-1TACC	..TG	..C	

	P	T	P	V	S	A	L	L	H	S	S	T	M	V	
BP-CAN-1	CCT	ACC	CCA	GTC	TCA	GCC	CTA	CTC	CAC	TCA	AGC	ACA	ATA	GTT	168
BE-CAN-1	
BE-CAN-2	
BE-CAN-3	
SF-CAN-1	..C	..TC	
SC-CAN-1	..C	..TT	T..C	
DD-CAN-1	..C	T..C	
DD-CAN-2	..C	..TC	
TT-CAN-1	..C	..TC	
TT-CAN-2	
TT-CAN-3	..C	..TT	T..C	
TT-CAN-4	..C	..TC	
GM-CAN-1	..C	..T	T..C	
GM-CAN-2	..C	..T	T..	..TC	
PM-CAN-1	..C	..T	..TTG	

	V	A	G	I	F	L	L	V	R	F	Y	P	L	M	
BP-CAN-1	GTA	GCA	GGA	ATC	TTC	TTG	CTT	GTC	CGC	TTC	TAC	CCA	TTA	ATA	210
BE-CAN-1G	..C	
BE-CAN-2G	..C	
BE-CAN-3G	..C	
SF-CAN-1TA	...	A..T	C..	..C.	
SC-CAN-1G	..T	...	C.A	...	A..	..TT	
DD-CAN-1C	..G	..T	...	C.A	...	A..	..TT	
DD-CAN-2TA	...	A..C	C..	..C.	
TT-CAN-1TA	...	A..T	C..	..C.	
TT-CAN-2C	
TT-CAN-3G	..T	...	C.A	...	A..	..TT	
TT-CAN-4TA	...	A..T	C..	..C.	
GM-CAN-1	A..G	..T	...	C.A	...	A..	..TT	
GM-CAN-2T	...	C.A	...	A..	..T	..TC	
PM-CAN-1	C.A	...	A..	C..	..T	C..	...	

	E	N	N	K	L	I	Q	T	V	T	L	C	L	G	
BP-CAN-1	GAA	AAT	AAC	AAG	CTA	ATC	CAA	ACA	GTA	ACC	CTC	TGC	TTA	GGC	252
BE-CAN-1T	.GT	...	G..T	
BE-CAN-2T	.GT	...	G..T	
BE-CAN-3T	.GT	...	G..T	
SF-CAN-1T	..A	T.T	..T	A..	..TA	..T	.CT	C..	...	
SC-CAN-1G	..A	..C	..TT	.CT	C..	..T	
DD-CAN-1A	..C	..TT	.CT	C..	..T	
DD-CAN-2T	..A	T.T	A..	..TA	..T	.CT	C..	...	
TT-CAN-1A	T.T	AC.	..TA	..T	.CT	C..	...	
TT-CAN-2T	.GT	...	G..T	
TT-CAN-3G	..A	..C	..TT	.CT	C..	..T	
TT-CAN-4A	T.T	AC.	..TA	..T	.CT	C..	...	
GM-CAN-1A	..C	..TT	.CT	C..	..T	
GM-CAN-2T	..A	T.C	..T	AC.	..TA	..T	.CT	C..	..T	
PM-CAN-1CA	..C	GC.	AC.	G..	..A	.CT	C..	...	

	A	I	T	T	L	F	T	A	I	C	A	L	T	Q	
BP-CAN-1	GCT	ATC	ACA	ACT	CTA	TTT	ACA	GCC	ATC	TGT	GCC	CTC	ACC	CAA	294
BE-CAN-1AC	
BE-CAN-2AC	
BE-CAN-3AC	
SF-CAN-1	..C	C.T	..C	..CCT	T.A	
SC-CAN-1	A.C	C..	..TC	...	TCG	..CTT	
DD-CAN-1	..C	C..	GTC	...	T.G	..CT	..C	..T	
DD-CAN-2	..C	C.T	..C	..CCT	T.A	
TT-CAN-1	..C	C.T	..C	..CCTC	...	T.A	
TT-CAN-2AC	
TT-CAN-3	A.C	C..	GTC	...	TCG	..CTT	
TT-CAN-4	..C	C.T	..C	..CCTC	...	T.A	
GM-CAN-1	..C	C..	GTC	...	T.G	..CT	..C	..TA	
GM-CAN-2	..C	C.T	..C	..CCTA	
PM-CAN-1	...	C.T	..C	..CCG	

	N	D	I	K	K	I	I	A	F	S	T	S	S	Q	
BP-CAN-1	AAC	GAC	ATC	AAA	AAA	ATT	ATT	GCT	TTC	TCC	ACC	TCC	AGC	CAG	336
BE-CAN-1	..TT	..T	...	
BE-CAN-2	..TT	..T	...	
BE-CAN-3	..TT	..T	...	
SF-CAN-1	..T	..TCT	
SC-CAN-1	..T	..TC	...	C..TA	...	
DD-CAN-1	..T	..TCT	..A	...	
DD-CAN-2	..T	..TCT	..A	...	
TT-CAN-1	..T	..TCT	..A	...	
TT-CAN-2	..TCT	..T	...	
TT-CAN-3	..T	..TC	...	C..TA	...	
TT-CAN-4	..T	..TCT	..A	...	
GM-CAN-1	..T	..TCT	..A	...	
GM-CAN-2	..T	..TCTT	..A	...	
PM-CAN-1	..T	..T	..TC	..C	..CA	...	

	L	G	L	M	M	V	T	I	G	L	N	Q	P	Y	
BP-CAN-1	CTA	GGC	CTA	ATA	ATA	GTA	ACA	ATC	GGC	CTT	AAC	CAA	CCT	TAC	378
BE-CAN-1TT	
BE-CAN-2TT	
BE-CAN-3TT	
SF-CAN-1	..C	...	T..G	...	C.ACA	C..	
SC-CAN-1	..T	T..	..T	C..	
DD-CAN-1	..TT	C..	
DD-CAN-2	..CG	...	C.ACA	C..	
TT-CAN-1	..CG	...	C.AC	..TA	C..	
TT-CAN-2TT	
TT-CAN-3	..TT	C..	
TT-CAN-4	..CG	...	C.AC	..TA	C..	
GM-CAN-1	..TTG	C..	
GM-CAN-2	..T	C.ATA	...	C..	
PM-CAN-1A	T.G	..G	G..CT	

	L	A	F	L	H	I	C	T	H	A	F	F	K	A	
BP-CAN-1	CTA	GCA	TTC	CTA	CAC	ATT	TGC	ACA	CAC	GCC	TTC	TTT	AAA	GCT	420
BE-CAN-1TTC	
BE-CAN-2TTC	
BE-CAN-3TTC	
SF-CAN-1TTC	
SC-CAN-1CC	...	
DD-CAN-1CC	...	
DD-CAN-2T	..CTC	
TT-CAN-1TCC	...	
TT-CAN-2TTC	
TT-CAN-3CC	...	
TT-CAN-4TTCC	...	
GM-CAN-1CC	...	
GM-CAN-2	...	A..GTTC	
PM-CAN-1CC	

	M	L	F	L	C	S	G	S	I	I	H	N	L	N	
BP-CAN-1	ATA	CTA	TTC	CTA	TGT	TCT	GGC	TCC	ATC	ATC	CAT	AAC	CTA	AAC	462
BE-CAN-1	...	T..C	
BE-CAN-2	...	T..C	
BE-CAN-3	...	T..C	
SF-CAN-1	...	T.GCTCT	...	
SC-CAN-1	...	T..	...	T..	..CTG	
DD-CAN-1	...	T..	...	T..	..CT	
DD-CAN-2	...	T.G	T..	..T	...	
TT-CAN-1C	..CC	..T	T..	..T	...	
TT-CAN-2	...	T..C	
TT-CAN-3	...	T..	...	T..	..CTG	
TT-CAN-4C	..CC	..T	T..	..T	...	
GM-CAN-1	...	T..	...	T..	..CT	
GM-CAN-2GT	..TT	T..	
PM-CAN-1C	..CC	

	N	E	Q	D	I	R	K	M	G	G	L	F	K	A	
BP-CAN-1	AAC	GAA	CAA	GAT	ATC	CGA	AAA	ATA	GGA	GGG	CTA	TTT	AAG	GCC	504
BE-CAN-1CA	G..A	...	
BE-CAN-2CA	G..A	...	
BE-CAN-3CA	G..A	...	
SF-CAN-1	..TA	T.G	.AC	..A	AT.	
SC-CAN-1C	..TGA	..G	.AC	..A	A.T	
DD-CAN-1C	..TAAC	..A	A.T	
DD-CAN-2	..T	..GA	T.G	.AC	..A	AT.	
TT-CAN-1	..TA	T..	.AC	..A	AT.	
TT-CAN-2CAA	...	
TT-CAN-3C	..TAAC	..A	A.T	
TT-CAN-4	..TA	T..	.AC	..A	ATT	
GM-CAN-1C	..TAAC	..A	A.T	
GM-CAN-2C	..TAAC	..A	AT.	
PM-CAN-1	..TC	..TGAC	..A	...	

	L	P	F	T	T	T	A	L	I	I	G	C	L	A	
BP-CAN-1	CTC	CCA	TTC	ACC	ACA	ACC	GCC	CTT	ATC	ATC	GGA	TGT	CTT	GCA	546
BE-CAN-1TT	..TC	
BE-CAN-2TT	..TC	
BE-CAN-3TT	..TC	
SF-CAN-1CTA	..TC	...	T.C	...	
SC-CAN-1	..T	..C	---	---	---	..	
DD-CAN-1	..T	..C	---	---	---	..	
DD-CAN-2	..T	..CTAC	
TT-CAN-1CTAC	...	T.C	
TT-CAN-2	---	---	---	---	..	
TT-CAN-3	..T	..CC	...	---	---	..	
TT-CAN-4CTAC	...	T.C	
GM-CAN-1	..T	..C	---	---	---	---	..	
GM-CAN-2	..T	..C	---	---	---	---	..	
PM-CAN-1TC	..ACCT	..T	..C	..C	...	

	L	T	G	M	P	F	L	T	G	F	Y	S	K	D	
BP-CAN-1	CTA	ACA	GGA	ATG	CCA	TTC	CTC	ACC	GGA	TTC	TAC	TCC	AAA	GAT	588
BE-CAN-1ATC	
BE-CAN-2ATC	
BE-CAN-3ATC	
SF-CAN-1AAT	..TC	
SC-CAN-1	..TAATT	..G	..C	..C	
DD-CAN-1	..TAA	..G	..TT	..G	..C	..C	
DD-CAN-2AT	..T	..TC	..C	
TT-CAN-1AAT	..T	..TC	..C	
TT-CAN-2	..TAAT	..T	..G	..C	..C	
TT-CAN-3	..TAAT	..T	..G	..C	..C	
TT-CAN-4AAT	..T	..TC	..C	
GM-CAN-1	..TAA	..GT	..G	..C	..C	
GM-CAN-2	..TAA	..GT	..G	..C	..C	
PM-CAN-1	T..	..CATC	..C	

	P	I	I	E	A	A	T	S	S	Y	T	N	A	W	
BP-CAN-1	CCC	ATT	ATT	GAA	GCC	GCC	ACT	TCG	TCT	TAT	ACC	AAC	GCC	TGA	630
BE-CAN-1	..TT	
BE-CAN-2	..TT	
BE-CAN-3	..TT	
SF-CAN-1	..TT	..C	
SC-CAN-1	..T	..C	..CG	
DD-CAN-1	..T	..C	..CT	
DD-CAN-2	..TT	..C	
TT-CAN-1	..TT	..C	
TT-CAN-2	..T	..C	..CG	
TT-CAN-3	..T	..C	..CG	
TT-CAN-4	..TT	..C	
GM-CAN-1	..T	..C	..C	
GM-CAN-2	..T	..C	..C	
PM-CAN-1	..A	..CA	

	A	L	L	L	T	L	I	A	T	S	L	T	A	V	
BP-CAN-1	GCC	CTA	TTA	CTG	ACC	TTA	ATC	GCC	ACC	TCC	CTT	ACG	GCC	GTC	672
BE-CAN-1	T.ACTA	
BE-CAN-2	T.ACTA	
BE-CAN-3	T.ACTA	
SF-CAN-1A	...	C..	..TA	..A	..T	A..	
SC-CAN-1AC	..T	..TA	..A	..TT	A.T	
DD-CAN-1AC	..TC	..A	..TT	A.T	
DD-CAN-2A	..A	C..	..TT	A.A	..A	..A	..T	A..	
TT-CAN-1A	..A	C..	..T	A.A	..A	..A	..T	A.T	
TT-CAN-2AC	..TC	..A	..TT	A.T	
TT-CAN-3AC	..TC	..A	..TT	A.T	
TT-CAN-4C	..A	...	C..	..TA	..A	..T	..T	A.T	
GM-CAN-1AC	..TC	..A	..T	A.T	
GM-CAN-2A	..TC	..TC	..A	..T	A.T	
PM-CAN-1	C..	T.A	..A	C..	..CAC	..AT	

	Y	S	T	R	I	I	F	F	A	L	L	G	Q	P	
BP-CAN-1	TAT	AGC	ACC	CGC	ATC	ATT	TTC	TTT	GCA	CTA	CTA	GGA	CAA	CCC	714
BE-CAN-1TC	
BE-CAN-2TC	
BE-CAN-3TC	
SF-CAN-1	..CT	..TA	TA	
SC-CAN-1	..CTTA	TT	
DD-CAN-1	..CTT	G.CA	TT	
DD-CAN-2	..CT	..TA	TAA	
TT-CAN-1	..CT	..TA	TA	
TT-CAN-2	..CTTA	TT	
TT-CAN-3	..CTTA	TT	
TT-CAN-4	..CT	..TA	TA	
GM-CAN-1	..CTT	..CA	TT	
GM-CAN-2	..CTT	..CA	TT	
PM-CAN-1	..CCAC	A.GAAC	

	R	F	P	P	S	T	T	I	N	E	N	N	P	L	
BP-CAN-1	CGC	TTC	CCT	CCC	TCC	ACA	ACC	ATT	AAC	GAA	AAT	AAT	CCA	CTG	756
BE-CAN-1T.C	..TA	
BE-CAN-2T.C	..TA	
BE-CAN-3T.C	..TA	
SF-CAN-1	..GT	.T.	.T.	.ATC	..C	A.A	
SC-CAN-1	..GT	CT.	.T.	.A.TC	..T	A.A	
DD-CAN-1T	CT.	.T.	.A.TC	..T	A.A	
DD-CAN-2T	CT.	.T.	.ATTC	..C	A.A	
TT-CAN-1T	CT.	.T.	.A.TC	..C	A.A	
TT-CAN-2T	CT.	.T.	.A.TC	..T	A.A	
TT-CAN-3T	CT.	.T.	.A.TC	..T	A.A	
TT-CAN-4T	.T.	.T.	.A.TC	..C	A.A	
GM-CAN-1T	CT.	.T.	.A.TC	..T	A.A	
GM-CAN-2T	CT.	.T.	.A.TC	..T	A.A	
PM-CAN-1	..A	CA.	.TTCC	..C	TCA	

	L	I	N	P	I	K	R	L	L	V	G	S	I	F	
BP-CAN-1	TTA	ATC	AAC	CCT	ATC	AAA	CGA	CTA	CTC	GTC	GGA	AGT	ATC	TTC	798
BE-CAN-1T	T.	...	A.C	
BE-CAN-2T	T.	...	A.C	
BE-CAN-3T	T.	...	A.C	
SF-CAN-1	C..TTC	...	T.A	A.TT	
SC-CAN-1TAC	T.-	T.A	A.TT	
DD-CAN-1TC	T.-	T.A	A.T	
DD-CAN-2	C..TTC	...	T.A	A.CT	
TT-CAN-1	C..TC	T.-	T.A	A.CT	
TT-CAN-2TC	T.-	T.A	A.T	
TT-CAN-3TC	T.-	T.A	A.T	
TT-CAN-4	C..TC	...	T.A	A.CT	
GM-CAN-1TC	T.-	T.A	A.T	
GM-CAN-2TC	T.-	T.A	A.T	
PM-CAN-1	C..CT.	...	T.	A.A	C..C	

	A	G	F	I	L	S	N	S	I	P	P	M	T	T	
BP-CAN-1	GCT	GGC	TTC	ATC	CTA	TCC	AAC	AGT	ATT	CCC	CCA	ATA	ACT	ACA	840
BE-CAN-1T	...	T.C	..CC	..C	...	
BE-CAN-2T	...	T.C	..CC	..C	...	
BE-CAN-3T	...	T.C	..CC	..C	...	
SF-CAN-1	..C	..A	..TCC	..AAC	..TT	
SC-CAN-1	A.C	..A	..TCA	..C	..TC	..C	
DD-CAN-1	..C	..A	..TCA	..C	..TC	..C	
DD-CAN-2	..C	..A	..TCA	..C	..TAC	..TC	
TT-CAN-1	..C	..ACC	..AAC	..TT	
TT-CAN-2	A.C	..A	..TCA	..C	..TC	..C	
TT-CAN-3	A.C	..A	..TCA	..C	..TC	..C	
TT-CAN-4	..C	..ACC	..AAC	..TT	
GM-CAN-1	..C	..A	..TCA	..C	..TC	..C	
GM-CAN-2	..C	..A	..TCA	..C	..TC	..C	
PM-CAN-1	..CAC	..CCC	..C	

	P	L	M	T	M	P	L	H	L	K	L	T	A	L	
BP-CAN-1	CCT	TTA	ATA	ACC	ATA	CCC	CTG	CAC	TTA	AAA	TTA	ACC	GCC	CTT	882
BE-CAN-1	..C	C..G	...	T..	..T	C..	...	C..	
BE-CAN-2	..C	C..G	...	T..	..T	C..	...	C..	
BE-CAN-3	..C	C..GT	C..	...	C..	
SF-CAN-1	..CG	..T	..G	...	T.A	T..	C..	...	C..	..AC	
SC-CAN-1	..CT	T.A	...	C..	...	C..	..A	..T	..C	
DD-CAN-1	..CT	T.A	...	C..	...	C..	..A	..T	..C	
DD-CAN-2	...	C..	..G	..TA	T.T	C..	...	C..	..A	..T	..C	
TT-CAN-1	...	C..	..G	..TA	T..	C..	...	C..	..A	..T	..C	
TT-CAN-2	..CT	T.A	...	C..	...	C..	..A	..T	..C	
TT-CAN-3	..CT	T.A	...	C..	...	C..	..A	..T	..C	
TT-CAN-4	...	C..	..G	..TA	T..	C..	...	C..	..A	..T	..C	
GM-CAN-1	..CT	T.A	...	C..	...	C..	..A	..T	..C	
GM-CAN-2	..CT	T.A	...	C..	...	C..	..A	..T	..C	
PM-CAN-1	..C	C..	..CTA	T..	C..	...	C..	

	A	M	T	T	L	G	F	I	I	A	F	E	I	N	
BP-CAN-1	GCA	ATA	ACA	ACC	CTA	GGC	TTC	ATC	ATC	GCA	TTC	GAA	ATT	AAC	924
BE-CAN-1	..TGT	
BE-CAN-2	..TGT	
BE-CAN-3	..TGT	
SF-CAN-1	AT	G..T	T..T	..T	C..TT	
SC-CAN-1	G..	...	T..T	..T	C..	
DD-CAN-1	...	G..	T..T	..T	C..	
DD-CAN-2	AT	G..TT	T..T	..T	C..TT	
TT-CAN-1	ATG	G..TT	..T	C..T	
TT-CAN-2	G..	...	T..T	..T	C..	
TT-CAN-3	G..	...	T..T	..T	C..	
TT-CAN-4	ATG	G..	T..T	..T	C..T	
GM-CAN-1	T..T	..T	C..	
GM-CAN-2	T..T	..T	C..	
PM-CAN-1	A..TTT	

	L	
BP-CAN-1	CTT	927
BE-CAN-1	..C	
BE-CAN-2	..C	
BE-CAN-3	..C	
SF-CAN-1	ACC	
SC-CAN-1	ACC	
DD-CAN-1	ACC	
DD-CAN-2	AAC	
TT-CAN-1	ACC	
TT-CAN-2	ACC	
TT-CAN-3	ACC	
TT-CAN-4	ACC	
GM-CAN-1	ACC	
GM-CAN-2	ACC	
PM-CAN-1	..C	

ANEXO II: PROTOCOLOS

1. Extracción de ADN genómico

1. Introducir 50 - 100 mg de tejido en un tubo Eppendorf y tocar con unas tijeras.
2. Añadir 300 µl de tampón de lisis (50 mM Tris, pH=8, 100 mM EDTA, pH=8, 1% SDS, 20 µg/ml Rnasa., 100 µg/ml ProteinasaK)
3. Homogenizar el tejido y añadir otros 300 µl de tampón.
4. Incubar las muestras hasta el día siguiente en la estufa a 50 °C y con rotación.
5. Añadir un volumen de fenol equilibrado con 0,5 M de Tris.
6. Agitar suavemente durante unos 10 minutos hasta que las dos fases se hayan mezclado por completo.
7. Centrifugar 15 minutos a 5000xg a temperatura ambiente.
8. Recolectar la fase superior con una punta cortada y transferirla a un tubo limpio.
9. Añadir un volumen de fenol equilibrado con 0,5 M de Tris.
10. Agitar suavemente durante unos 10 minutos hasta que las dos fases se hayan mezclado por completo.
11. Centrifugar 15 minutos a 5000xg a temperatura ambiente.
12. Recolectar la fase superior con una punta cortada y transferirla a un tubo limpio.
13. Añadir un volumen de cloroformo/isoamílico (24:1).



14. Agitar suavemente durante unos 10 minutos hasta que las dos fases se hayan mezclado por completo.
15. Centrifugar 15 minutos a 5000xg a temperatura ambiente.
16. Recolectar la fase superior con una punta cortada y repartirla en partes iguales en dos tubos limpios.
17. Añadir, a cada tubo, 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol 100% y mezclar por rotación manual. En el mejor de los casos debería aparecer un ovillo de ADN.
18. Centrifugar 5 minutos a 5000xg a temperatura ambiente.
19. Retirar el sobrenadante.
20. Lavar el precipitado de ADN con 500 µl de etanol 70%.
21. Centrifugar 5 minutos a 5000xg a temperatura ambiente.
22. Retirar el etanol con una pipeta Pasteur estirada a la llama.
23. Dejar secar el precipitado de ADN.
24. Resuspender cada precipitado en 25-40 µl de TE 1X.
25. Una vez rehidratados, los precipitados de una misma muestra se pueden mezclar en un único tubo.
26. Guardar el ADN hidratado a 4 °C.

NOTA: Para aprovechar el ADN de menor peso molecular que no se precipita en el paso 18, el sobrenadante del paso 19 se puede recuperar en otro tubo y centrifugarlo 30 minutos a 12.000xg. Luego se continúa el protocolo desde el punto 20 y finalmente se resuspende el precipitado de ADN de bajo peso molecular en 10-20 µl de TE 1X.

2. Secuenciación por tinción de plata

A. Preparación de los cristales

A.1. Limpieza de los cristales

- a) Para retirar los restos de geles anteriores, raspar los cristales con una paleta de plástico y frotar con un estropajo que no raye, con agua y detergente Decon 90.
- b) Aclarar los cristales con agua ultrapura y etanol 70%..
- c) Dejar secar los cristales

A.2. Preparación del cristal corto

- a) Limpiar el cristal por ambas caras con un papel y agua ultrapura.
- b) Limpiar el cristal por ambas caras con un papel y etanol 70%.

A.3. Preparación del cristal largo

- a) Limpiar el cristal por ambas caras con un papel y agua ultrapura.
- b) Limpiar el cristal por ambas caras con un papel y etanol 70%.
- c) Impregnar la cara interna del cristal con un papel y 350 μ l de solución de silano (12,5 ml de etanol 70%, 50 μ l de ácido acético glacial, 5 μ l silano) y esperar 5 minutos hasta que se seque.
- d) Limpiar dos veces la cara impregnada con un papel y etanol 70%.

A.4. Colocación de los cristales

- a) Colocar en las aristas largas de la cara impregnada del cristal largo, los dos separadores teniendo cuidado de que coincidan exactamente con los bordes.
- b) Colocar el cristal corto sobre el largo teniendo cuidado de que coincida exactamente con los bordes.
- c) Mantener unidos ambos cristales con tres pinzas en cada arista larga.

B. Preparación del gel de acrilamida

Para la preparación de 40 ml de gel de acrilamida al 6% y 7M de urea:

- a) Disolver en un agitador magnético:
 - 16,82 g de urea
 - 6 ml de acrilamida 40%,
 - 8 ml de TBE5X
 - 10 ml de agua ultrapura
- b) Enrasar a 40 ml con agua ultrapura.
- c) Añadir 400 μ l de persulfato de amonio 10% y 32 μ l de Temed.
- d) Inyectar con una jeringuilla el gel entre los dos cristales procurando que no se formen burbujas.
- e) Colocar el peine con la arista lista en la parte superior del gel y presionarlo con tres pinzas.
- f) Sellar la parte inferior del gel con cinta adhesiva.
- g) Dejar polimerizar el gel durante una hora.

- h) Retirar el peine e insertarlo en el gel clavando los dientes en la arista superior, limpiándola previamente con agua para retirar los restos de urea y acrilamida.
- i) Retirar las pinzas y la cinta adhesiva
- j) Montar el gel en el sistema de electroforesis.

C. Tinción de plata y revelado del gel

- a) Dejar enfriar los cristales y separarlos con cuidado.
- b) Sumergir el cristal largo en 500 ml de **solución de fijado** fría (450 ml de agua ultrapura y 50 ml de ácido acético glacial) durante 30 minutos en agitación o en la nevera durante toda la noche.
- c) Guardar la solución de fijado en frío y lavar el gel 3 veces durante 2 minutos en 500 ml de agua ultrapura fría.
- d) -Sumergir el gel en 500 ml de **solución de tinción** a temperatura ambiente (500 ml de agua ultrapura, 0,75 g de nitrato de plata y 725 μ l de formaldehído) durante 30 minutos en agitación.
- e) Lavar el gel durante 5 seg en 1 l de agua ultrapura fría.
- f) Sumergir el gel en 500 ml de **solución de revelado** a 5 °C (500 ml de agua ultrapura, 15 g de carbonato de sodio, 725 μ l de formaldehído y 500 μ l de tiosulfato de sodio) y agitar hasta que aparezcan las bandas de ADN.
- g) Parar el proceso de revelado con la **solución de fijado** fría.
- h) Lavar el gel durante 5 minutos en 1 l de agua ultrapura fría y en agitación.
- i) Dejar secar el gel.

3. Purificación de los productos de la reacción de secuenciación con "ABI Prism® dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit"

- a) Mezclar en un tubo Eppendorf 50 μ l de etanol 95% y 2 μ l de acetato de sodio 3M (pH=5).
- b) Añadir los 5 μ l de la reacción de secuenciación y mezclar por vórtex.
- c) Enfriar durante 5 minutos en hielo o en el congelador.
- d) Centrifugar 30 minutos a 12.000xg.
- e) Retirar el sobrenadante y lavar el precipitado con 250 μ l de etanol 70%.
- f) Centrifugar 5 minutos a 12.000xg.
- g) Retirar el sobrenadante.
- h) Dejar secar el precipitado.
- i) Resuspender en 20 μ l de formamida antes de cargar las muestras en el secuenciador.

Tabla III.1. Continuación. Distancias par a par entre los haplotipos de la región control de delfín mular del Archipiélago Canario.

	TT-CAN-P	TT-CAN-Q	TT-CAN-R	TT-CAN-S	TT-CAN-T	TT-CAN-U	TT-CAN-V	TT-CAN-W	TT-CAN-X	TT-CAN-Y	TT-CAN-Z	TT-CAN-AA	TT-CAN-BB	TT-CAN-CC	TT-CAN-DD
TT-CAN-Q	0,0025 (0,0025)														
TT-CAN-R	0,0050 (0,0036)	0,0025 (0,0025)													
TT-CAN-S	0,0076 (0,0043)	0,0050 (0,0036)	0,0076 (0,0043)												
TT-CAN-T	0,0076 (0,0043)	0,0050 (0,0036)	0,0025 (0,0025)	0,0101 (0,0050)											
TT-CAN-U	0,0252 (0,0079)	0,0227 (0,0075)	0,0202 (0,0071)	0,0227 (0,0075)	0,0227 (0,0075)										
TT-CAN-V	0,0227 (0,0075)	0,0202 (0,0071)	0,0227 (0,0075)	0,0202 (0,0071)	0,0252 (0,0079)	0,0076 (0,0043)									
TT-CAN-W	0,0076 (0,0043)	0,0050 (0,0036)	0,0076 (0,0043)	0,0050 (0,0036)	0,0101 (0,0050)	0,0227 (0,0075)	0,0202 (0,0071)								
TT-CAN-X	0,0277 (0,0082)	0,0252 (0,0079)	0,0227 (0,0075)	0,0252 (0,0079)	0,0252 (0,0079)	0,0227 (0,0075)	0,0302 (0,0086)	0,0252 (0,0079)							
TT-CAN-Y	0,0378 (0,0096)	0,0353 (0,0093)	0,0327 (0,0089)	0,0353 (0,0093)	0,0353 (0,0093)	0,0151 (0,0061)	0,0227 (0,0075)	0,0353 (0,0093)	0,0302 (0,0086)						
TT-CAN-Z	0,0050 (0,0025)	0,0025 (0,0036)	0,0050 (0,0043)	0,0076 (0,0043)	0,0076 (0,0071)	0,0202 (0,0066)	0,0176 (0,0043)	0,0076 (0,0075)	0,0227 (0,0083)	0,0327					
TT-CAN-AA	0,0302 (0,0086)	0,0277 (0,0082)	0,0252 (0,0079)	0,0277 (0,0082)	0,0277 (0,0082)	0,0076 (0,0043)	0,0151 (0,0061)	0,0277 (0,0082)	0,0227 (0,0075)	0,0076 (0,0043)	0,0252 (0,0079)				
TT-CAN-BB	0,0151 (0,0061)	0,0126 (0,0056)	0,0151 (0,0061)	0,0126 (0,0056)	0,0176 (0,0066)	0,0101 (0,0050)	0,0126 (0,0056)	0,0126 (0,0056)	0,0176 (0,0066)	0,0252 (0,0079)	0,0101 (0,0050)	0,0176 (0,0066)			
TT-CAN-CC	0,0101 (0,0050)	0,0076 (0,0043)	0,0050 (0,0036)	0,0076 (0,0043)	0,0076 (0,0043)	0,0151 (0,0061)	0,0176 (0,0066)	0,0076 (0,0043)	0,0176 (0,0066)	0,0277 (0,0082)	0,0050 (0,0036)	0,0202 (0,0071)	0,0101 (0,0050)		
TT-CAN-DD	0,0176 (0,0066)	0,0151 (0,0061)	0,0176 (0,0066)	0,0151 (0,0061)	0,0202 (0,0071)	0,0227 (0,0075)	0,0202 (0,0071)	0,0151 (0,0061)	0,0151 (0,0061)	0,0302 (0,0086)	0,0126 (0,0056)	0,0227 (0,0075)	0,0126 (0,0056)	0,0126 (0,0056)	
TT-CAN-EE	0,0101 (0,0050)	0,0076 (0,0043)	0,0101 (0,0050)	0,0076 (0,0043)	0,0126 (0,0056)	0,0151 (0,0061)	0,0126 (0,0056)	0,0076 (0,0043)	0,0227 (0,0075)	0,0302 (0,0086)	0,0101 (0,0050)	0,0227 (0,0075)	0,0050 (0,0036)	0,0101 (0,0050)	0,0126 (0,0056)
TT-CAN-P															
TT-CAN-Q															
TT-CAN-R															
TT-CAN-S															
TT-CAN-T															
TT-CAN-U															
TT-CAN-V															
TT-CAN-W															
TT-CAN-X															
TT-CAN-Y															
TT-CAN-Z															
TT-CAN-AA															
TT-CAN-BB															
TT-CAN-CC															
TT-CAN-DD															

Tabla III.2. Distancias par a par entre los haplotipos de la región control de calderón tropical del Archipiélago Canario.

GM-CAN-A	GM-CAN-B	GM-CAN-C	GM-CAN-D	GM-CAN-E	GM-CAN-F	GM-CAN-G	GM-CAN-H	GM-CAN-I	GM-CAN-J	
	0,0050 (0,0035)									
	0,0025 (0,0025)	0,0075 (0,0043)								
	0,0025 (0,0025)	0,0075 (0,0043)	0,0050 (0,0035)							
	0,0050 (0,0035)	0,0100 (0,0050)	0,0075 (0,0043)	0,0075 (0,0043)						
	0,0075 (0,0043)	0,0075 (0,0043)	0,0100 (0,0050)	0,0100 (0,0050)	0,0025 (0,0025)					
	0,0050 (0,0035)	0,0050 (0,0035)	0,0075 (0,0043)	0,0025 (0,0025)	0,0100 (0,0050)	0,0075 (0,0043)				
	0,0075 (0,0043)	0,0125 (0,0056)	0,0100 (0,0050)	0,0050 (0,0035)	0,0025 (0,0025)	0,0050 (0,0035)	0,0075 (0,0043)			
	0,0075 (0,0043)	0,0125 (0,0056)	0,0100 (0,0050)	0,0100 (0,0050)	0,0025 (0,0025)	0,0050 (0,0035)	0,0125 (0,0056)	0,0050 (0,0035)		
	0,0025 (0,0025)	0,0075 (0,0043)	0,0050 (0,0035)	0,0050 (0,0035)	0,0025 (0,0025)	0,0050 (0,0035)	0,0075 (0,0035)	0,0050 (0,0035)	0,0050 (0,0035)	
	0,0025 (0,0025)	0,0025 (0,0025)	0,0050 (0,0035)	0,0050 (0,0035)	0,0075 (0,0043)	0,0050 (0,0035)	0,0025 (0,0025)	0,0100 (0,0050)	0,0100 (0,0050)	0,0050 (0,0035)
GM-CAN-A	GM-CAN-B	GM-CAN-C	GM-CAN-D	GM-CAN-E	GM-CAN-F	GM-CAN-G	GM-CAN-H	GM-CAN-I	GM-CAN-J	

Tabla III.3. Distancias par a par entre los haplotipos de la región control de delfín común del Archipiélago Canario.

	DD-CAN-A	DD-CAN-B	DD-CAN-C	DD-CAN-D	DD-CAN-E	DD-CAN-F	DD-CAN-G	DD-CAN-H	DD-CAN-I	DD-CAN-J
DD-CAN-B	0,0151 (0,0061)									
DD-CAN-C	0,0126 (0,0056)	0,0101 (0,0050)								
DD-CAN-D	0,0201 (0,0070)	0,0201 (0,0070)	0,0201 (0,0070)							
DD-CAN-E	0,0151 (0,0061)	0,0176 (0,0066)	0,0075 (0,0043)	0,0226 (0,0075)						
DD-CAN-F	0,0101 (0,0050)	0,0126 (0,0056)	0,0025 (0,0025)	0,0176 (0,0066)	0,0101 (0,0050)					
DD-CAN-G	0,0226 (0,0075)	0,0176 (0,0066)	0,0126 (0,0056)	0,0226 (0,0075)	0,0151 (0,0061)	0,0151 (0,0061)				
DD-CAN-H	0,0251 (0,0078)	0,0251 (0,0078)	0,0201 (0,0070)	0,0201 (0,0070)	0,0226 (0,0075)	0,0176 (0,0066)	0,0226 (0,0075)			
DD-CAN-I	0,0176 (0,0066)	0,0151 (0,0061)	0,0050 (0,0035)	0,0201 (0,0070)	0,0075 (0,0043)	0,0075 (0,0043)	0,0126 (0,0056)	0,0151 (0,0061)		
DD-CAN-J	0,0151 (0,0061)	0,0101 (0,0050)	0,0050 (0,0035)	0,0201 (0,0070)	0,0126 (0,0056)	0,0075 (0,0043)	0,0126 (0,0056)	0,0201 (0,0070)	0,0101 (0,0050)	
DD-CAN-K	0,0126 (0,0056)	0,0101 (0,0050)	0,0050 (0,0035)	0,0251 (0,0078)	0,0075 (0,0043)	0,0075 (0,0043)	0,0176 (0,0066)	0,0251 (0,0078)	0,0101 (0,0050)	0,0101 (0,0050)
DD-CAN-L	0,0226 (0,0075)	0,0226 (0,0075)	0,0176 (0,0066)	0,0176 (0,0066)	0,0201 (0,0070)	0,0151 (0,0061)	0,0201 (0,0070)	0,0025 (0,0025)	0,0126 (0,0056)	0,0176 (0,0066)
DD-CAN-M	0,0251 (0,0078)	0,0302 (0,0086)	0,0251 (0,0078)	0,0251 (0,0078)	0,0276 (0,0082)	0,0226 (0,0075)	0,0276 (0,0082)	0,0050 (0,0035)	0,0201 (0,0070)	0,0251 (0,0078)
DD-CAN-N	0,0025 (0,0025)	0,0126 (0,0056)	0,0126 (0,0056)	0,0176 (0,0066)	0,0151 (0,0061)	0,0101 (0,0050)	0,0201 (0,0070)	0,0226 (0,0075)	0,0176 (0,0066)	0,0126 (0,0056)
DD-CAN-O	0,0201 (0,0070)	0,0050 (0,0035)	0,0151 (0,0061)	0,0251 (0,0078)	0,0226 (0,0075)	0,0176 (0,0066)	0,0226 (0,0075)	0,0201 (0,0070)	0,0151 (0,0061)	0,0151 (0,0061)
DD-CAN-P	0,0226 (0,0075)	0,0276 (0,0082)	0,0276 (0,0082)	0,0075 (0,0043)	0,0251 (0,0078)	0,0251 (0,0078)	0,0302 (0,0086)	0,0226 (0,0075)	0,0276 (0,0082)	0,0276 (0,0082)
DD-CAN-Q	0,0176 (0,0066)	0,0151 (0,0061)	0,0050 (0,0035)	0,0251 (0,0078)	0,0126 (0,0056)	0,0075 (0,0043)	0,0176 (0,0066)	0,0151 (0,0061)	0,0101 (0,0050)	0,0101 (0,0050)
DD-CAN-R	0,0201 (0,0070)	0,0101 (0,0050)	0,0101 (0,0050)	0,0226 (0,0075)	0,0176 (0,0066)	0,0126 (0,0056)	0,0176 (0,0066)	0,0251 (0,0078)	0,0151 (0,0061)	0,0075 (0,0043)
DD-CAN-S	0,0151 (0,0061)	0,0126 (0,0056)	0,0025 (0,0025)	0,0226 (0,0075)	0,0101 (0,0050)	0,0050 (0,0035)	0,0151 (0,0061)	0,0176 (0,0066)	0,0075 (0,0043)	0,0075 (0,0043)
DD-CAN-T	0,0126 (0,0056)	0,0226 (0,0075)	0,0176 (0,0066)	0,0251 (0,0078)	0,0201 (0,0070)	0,0151 (0,0061)	0,0251 (0,0078)	0,0226 (0,0075)	0,0226 (0,0075)	0,0176 (0,0066)
DD-CAN-U	0,0151 (0,0061)	0,0126 (0,0056)	0,0025 (0,0025)	0,0226 (0,0075)	0,0101 (0,0050)	0,0050 (0,0035)	0,0151 (0,0061)	0,0226 (0,0075)	0,0075 (0,0043)	0,0075 (0,0043)
	DD-CAN-A	DD-CAN-B	DD-CAN-C	DD-CAN-D	DD-CAN-E	DD-CAN-F	DD-CAN-G	DD-CAN-H	DD-CAN-I	DD-CAN-J

Tabla III.3. Continuación. Distancias par a par entre los haplotipos de la región control de delfín común del Archipiélago Canario.

	DD-CAN-K	DD-CAN-L	DD-CAN-M	DD-CAN-N	DD-CAN-O	DD-CAN-P	DD-CAN-Q	DD-CAN-R	DD-CAN-S	DD-CAN-T
DD-CAN-L	0,0226 (0,0075)									
DD-CAN-M	0,0302 (0,0086)	0,0075 (0,0043)								
DD-CAN-N	0,0126 (0,0056)	0,0201 (0,0070)	0,0226 (0,0075)							
DD-CAN-O	0,0151 (0,0061)	0,0226 (0,0075)	0,0251 (0,0078)	0,0176 (0,0066)						
DD-CAN-P	0,0276 (0,0082)	0,0251 (0,0078)	0,0276 (0,0082)	0,0201 (0,0070)	0,0276 (0,0082)					
DD-CAN-Q	0,0101 (0,0050)	0,0176 (0,0066)	0,0201 (0,0070)	0,0176 (0,0066)	0,0151 (0,0061)	0,0276 (0,0082)				
DD-CAN-R	0,0101 (0,0050)	0,0226 (0,0075)	0,0302 (0,0086)	0,0176 (0,0066)	0,0151 (0,0061)	0,0302 (0,0086)	0,0151 (0,0061)			
DD-CAN-S	0,0075 (0,0043)	0,0201 (0,0070)	0,0226 (0,0075)	0,0151 (0,0061)	0,0126 (0,0056)	0,0251 (0,0078)	0,0025 (0,0025)	0,0126 (0,0056)		
DD-CAN-T	0,0176 (0,0066)	0,0251 (0,0078)	0,0226 (0,0075)	0,0101 (0,0050)	0,0226 (0,0075)	0,0226 (0,0075)	0,0176 (0,0066)	0,0176 (0,0066)	0,0151 (0,0061)	
DD-CAN-U	0,0075 (0,0043)	0,0201 (0,0070)	0,0276 (0,0082)	0,0151 (0,0061)	0,0176 (0,0066)	0,0302 (0,0086)	0,0075 (0,0043)	0,0126 (0,0056)	0,0050 (0,0035)	0,0201 (0,0070)
	DD-CAN-K	DD-CAN-L	DD-CAN-M	DD-CAN-N	DD-CAN-O	DD-CAN-P	DD-CAN-Q	DD-CAN-R	DD-CAN-S	DD-CAN-T

Tabla III.4. Distancias par a par entre los haplotipos del gen COI de diversas especies de cetáceos del Archipiélago Canario.

	BP-CAN-I	BE-CAN-I	SF-CAN-I	SF-CAN-II	SF-CAN-III	SF-CAN-VI	SC-CAN-I	SC-CAN-II	SC-CAN-III	DD-CAN-I
BE-CAN-I	0,0821 (0,0089)									
SF-CAN-I	0,1516 (0,0116)	0,1400 (0,0113)								
SF-CAN-II	0,1526 (0,0117)	0,1411 (0,0113)	0,0011 (0,0011)							
SF-CAN-III	0,1547 (0,0117)	0,1432 (0,0114)	0,0053 (0,0023)	0,0042 (0,0021)						
SF-CAN-VI	0,1537 (0,0117)	0,1421 (0,0113)	0,0032 (0,0018)	0,0021 (0,0015)	0,0021 (0,0015)					
SC-CAN-I	0,1537 (0,0117)	0,1421 (0,0113)	0,0189 (0,0044)	0,0179 (0,0043)	0,0200 (0,0045)	0,0179 (0,0043)				
SC-CAN-II	0,1547 (0,0117)	0,1453 (0,0114)	0,0137 (0,0038)	0,0126 (0,0036)	0,0147 (0,0039)	0,0126 (0,0036)	0,0158 (0,0040)			
SC-CAN-III	0,1537 (0,0117)	0,1442 (0,0114)	0,0147 (0,0039)	0,0137 (0,0038)	0,0158 (0,0040)	0,0137 (0,0038)	0,0084 (0,0030)	0,0116 (0,0035)		
DD-CAN-I	0,1568 (0,0118)	0,1453 (0,0114)	0,0116 (0,0035)	0,0105 (0,0033)	0,0105 (0,0033)	0,0084 (0,0030)	0,0179 (0,0043)	0,0126 (0,0036)	0,0137 (0,0038)	
DD-CAN-II	0,1558 (0,0118)	0,1442 (0,0114)	0,0126 (0,0036)	0,0116 (0,0035)	0,0116 (0,0035)	0,0095 (0,0031)	0,0168 (0,0042)	0,0137 (0,0038)	0,0126 (0,0036)	0,0032 (0,0018)
DD-CAN-III	0,1537 (0,0117)	0,1474 (0,0115)	0,0179 (0,0043)	0,0168 (0,0042)	0,0189 (0,0044)	0,0168 (0,0042)	0,0200 (0,0045)	0,0189 (0,0044)	0,0158 (0,0040)	0,0126 (0,0036)
TT-CAN-I	0,1442 (0,0114)	0,1326 (0,0110)	0,1253 (0,0107)	0,1242 (0,0107)	0,1232 (0,0107)	0,1221 (0,0106)	0,1232 (0,0107)	0,1284 (0,0109)	0,1221 (0,0106)	0,1211 (0,0106)
TT-CAN-II	0,1474 (0,0115)	0,1284 (0,0109)	0,1526 (0,0117)	0,1516 (0,0116)	0,1505 (0,0116)	0,1495 (0,0116)	0,1495 (0,0116)	0,1558 (0,0118)	0,1495 (0,0116)	0,1484 (0,0115)
TT-CAN-III	0,1463 (0,0115)	0,1274 (0,0108)	0,1516 (0,0116)	0,1505 (0,0116)	0,1495 (0,0116)	0,1484 (0,0115)	0,1495 (0,0116)	0,1547 (0,0117)	0,1484 (0,0115)	0,1474 (0,0115)
TT-CAN-VI	0,1432 (0,0114)	0,1295 (0,0109)	0,1232 (0,0107)	0,1221 (0,0106)	0,1211 (0,0106)	0,1200 (0,0105)	0,1189 (0,0105)	0,1263 (0,0108)	0,1200 (0,0105)	0,1189 (0,0105)
GM-CAN-I	0,1453 (0,0114)	0,1326 (0,0110)	0,1505 (0,0116)	0,1495 (0,0116)	0,1484 (0,0115)	0,1474 (0,0115)	0,1484 (0,0115)	0,1537 (0,0117)	0,1474 (0,0115)	0,1474 (0,0115)
GM-CAN-II	0,1432 (0,0114)	0,1284 (0,0109)	0,1474 (0,0115)	0,1463 (0,0115)	0,1453 (0,0114)	0,1442 (0,0114)	0,1453 (0,0114)	0,1505 (0,0116)	0,1442 (0,0114)	0,1442 (0,0114)
ME-CAN-I	0,1516 (0,0116)	0,1421 (0,0113)	0,1547 (0,0117)	0,1537 (0,0117)	0,1547 (0,0117)	0,1537 (0,0117)	0,1484 (0,0115)	0,1579 (0,0118)	0,1495 (0,0116)	0,1505 (0,0116)
PM-CAN-I	0,1642 (0,0120)	0,1737 (0,0123)	0,1779 (0,0124)	0,1768 (0,0124)	0,1779 (0,0124)	0,1758 (0,0123)	0,1726 (0,0123)	0,1789 (0,0124)	0,1716 (0,0122)	0,1716 (0,0122)
	BP-CAN-I	BE-CAN-I	SF-CAN-I	SF-CAN-II	SF-CAN-III	SF-CAN-VI	SC-CAN-I	SC-CAN-II	SC-CAN-III	DD-CAN-I

Tabla III.4. Continuación. Distancias par a par entre los haplotipos del gen COI de diversas especies de cetáceos del Archipiélago Canario.

	DD-CAN-II	DD-CAN-III	TT-CAN-I	TT-CAN-II	TT-CAN-III	TT-CAN-VI	GM-CAN-I	GM-CAN-II	ME-CAN-I
DD-CAN-III	0,0116 (0,0035)								
TT-CAN-I	0,1200 (0,0105)	0,1242 (0,0107)							
TT-CAN-II	0,1474 (0,0115)	0,1516 (0,0116)	0,0305 (0,0056)						
TT-CAN-III	0,1463 (0,0115)	0,1505 (0,0116)	0,0295 (0,0055)	0,0011 (0,0011)					
TT-CAN-VI	0,1179 (0,0105)	0,1221 (0,0106)	0,0126 (0,0036)	0,0326 (0,0058)	0,0316 (0,0057)				
GM-CAN-I	0,1463 (0,0115)	0,1516 (0,0116)	0,0653 (0,0080)	0,0505 (0,0071)	0,0516 (0,0072)	0,0674 (0,0081)			
GM-CAN-II	0,1432 (0,0114)	0,1484 (0,0115)	0,0621 (0,0078)	0,0453 (0,0067)	0,0463 (0,0068)	0,0642 (0,0080)	0,0053 (0,0023)		
ME-CAN-I	0,1505 (0,0116)	0,1526 (0,0117)	0,1516 (0,0116)	0,1516 (0,0116)	0,1505 (0,0116)	0,1505 (0,0116)	0,1505 (0,0116)	0,1474 (0,0115)	
EM-CAN-I	0,1726 (0,0123)	0,1716 (0,0122)	0,1621 (0,0120)	0,1695 (0,0122)	0,1684 (0,0121)	0,1600 (0,0119)	0,1789 (0,0124)	0,1758 (0,0123)	0,1653 (0,0121)
	DD-CAN-I	DD-CAN-II	DD-CAN-III	TT-CAN-I	TT-CAN-II	TT-CAN-III	GM-CAN-I	GM-CAN-II	ME-CAN-I

Tabla III.5. Distancias par a par entre los haplotipos del gen NADH5 de diversas especies de cetáceos del Archipiélago Canario.

	BE-CAN-1	BE-CAN-2	BE-CAN-3	SF-CAN-1	SC-CAN-1	DD-CAN-1	DD-CAN-2	TT-CAN-1	TT-CAN-2	TT-CAN-3	TT-CAN-4	GM-CAN-1	GM-CAN-2
BE-CAN-1	0,0789 (0,0089)												
BE-CAN-2	0,0811 (0,0090)	0,0022 (0,0015)											
BE-CAN-3	0,0800 (0,0090)	0,0033 (0,0019)	0,0011 (0,0011)										
SF-CAN-1	0,1774 (0,0126)	0,1752 (0,0126)	0,1774 (0,0126)	0,1785 (0,0127)									
SC-CAN-1	0,1643 (0,0123)	0,1687 (0,0124)	0,1709 (0,0125)	0,1720 (0,0125)	0,1413 (0,0115)								
DD-CAN-1	0,1522 (0,0119)	0,1566 (0,0120)	0,1588 (0,0121)	0,1599 (0,0121)	0,1380 (0,0114)	0,0307 (0,0057)							
DD-CAN-2	0,1840 (0,0128)	0,1807 (0,0127)	0,1818 (0,0128)	0,1807 (0,0127)	0,0405 (0,0065)	0,1512 (0,0119)	0,1457 (0,0117)						
TT-CAN-1	0,1763 (0,0126)	0,1742 (0,0126)	0,1763 (0,0126)	0,1752 (0,0126)	0,0471 (0,0070)	0,1446 (0,0116)	0,1347 (0,0113)	0,0438 (0,0068)					
TT-CAN-2	0,1051 (0,0102)	0,0789 (0,0089)	0,0811 (0,0090)	0,0821 (0,0091)	0,1490 (0,0118)	0,0931 (0,0096)	0,0865 (0,0093)	0,1544 (0,0120)	0,1457 (0,0117)				
TT-CAN-3	0,1566 (0,0120)	0,1632 (0,0122)	0,1654 (0,0123)	0,1665 (0,0123)	0,1424 (0,0116)	0,0110 (0,0034)	0,0219 (0,0048)	0,1522 (0,0119)	0,1413 (0,0115)	0,0843 (0,0092)			
TT-CAN-4	0,1742 (0,0126)	0,1742 (0,0126)	0,1763 (0,0126)	0,1752 (0,0126)	0,0405 (0,0065)	0,1424 (0,0116)	0,1325 (0,0112)	0,0460 (0,0069)	0,0110 (0,0034)	0,1457 (0,0117)	0,1391 (0,0115)		
GM-CAN-1	0,1490 (0,0118)	0,1555 (0,0120)	0,1577 (0,0121)	0,1588 (0,0121)	0,1369 (0,0114)	0,0307 (0,0057)	0,0110 (0,0034)	0,1479 (0,0117)	0,1347 (0,0113)	0,0854 (0,0093)	0,0197 (0,0046)	0,1325 (0,0112)	
GM-CAN-2	0,1676 (0,0124)	0,1731 (0,0125)	0,1752 (0,0126)	0,1763 (0,0126)	0,1019 (0,0100)	0,0898 (0,0095)	0,0756 (0,0087)	0,1041 (0,0101)	0,1008 (0,0100)	0,1051 (0,0102)	0,0821 (0,0091)	0,0997 (0,0099)	0,0734 (0,0086)
FM-CAN-1	0,1665 (0,0123)	0,1654 (0,0123)	0,1676 (0,0124)	0,1665 (0,0123)	0,1698 (0,0124)	0,1818 (0,0128)	0,1720 (0,0125)	0,1731 (0,0125)	0,1555 (0,0120)	0,1785 (0,0127)	0,1807 (0,0127)	0,1599 (0,0121)	0,1709 (0,0125)

BE-CAN-1 BE-CAN-1 BE-CAN-2 BE-CAN-3 SF-CAN-1 SC-CAN-1 DD-CAN-1 DD-CAN-2 TT-CAN-1 TT-CAN-2 TT-CAN-3 TT-CAN-4 GM-CAN-1 GM-CAN-2

GENETIC SAMPLING DATA FORM - MASTER SHEET
Important: use one form (or set of forms) for each group of a socialized whales

PAGE ____ OF ____

Institution _____ Chief Scientist _____ Vessel _____ Date (day, month, year) ____ / ____ / ____

Species _____ Group size: *best* _____ *high* _____ *low* _____ How many whales in the group were sampled? _____

Unique sighting or group identifier number: _____ Group behavior (circle): *travel* *feed* *rest* *mill* *courtship* *aggressive* *undetermined*

Location: *Latitude* _____

Other available data (check ✓ or include data form numbers if available)					
<i>Photos</i>	<i>Videos</i>	<i>Behavior</i>	<i>Effort/cessed track</i>	<i>Environmental</i>	<i>Other</i>

Longitude _____

SAMPLE NUMBER _____ WHALE NUMBER _____ Sample type (circle): *biopsy* *sloughed skin* *other*
 Class of this whale (circle): *mother* *calf* *adult* *immature* *unknown* Approx size (circle): *large* *midsize* *small* Sex: *female* *male* *unknown*
 If this whale was closely associated with another sampled animal from the group, which one(s) - give whale number(s): _____
 Association, behavioral photo or other notes for this whale: _____

 Did sampling effort disrupt whale's behaviour (circle): *Yes* *No* *Uncertain* If yes, elapsed time before animal resumes previous behaviour: _____

SAMPLE NUMBER _____ WHALE NUMBER _____ Sample type (circle): *biopsy* *sloughed skin* *other*
 Class of this whale (circle): *mother* *calf* *adult* *immature* *unknown* Approx size (circle): *large* *midsize* *small* Sex: *female* *male* *unknown*
 If this whale was closely associated with another sampled animal from the group, which one(s) - give whale number(s): _____
 Association, behavioral photo or other notes for this whale: _____

 Did sampling effort disrupt whale's behaviour (circle): *Yes* *No* *Uncertain* If yes, elapsed time before animal resumes previous behaviour: _____

Figura IV.1. Estadillos utilizados para registrar la información asociada a las muestras de biopsia obtenidas.

GENETIC SAMPLING DATA FORM - CONTINUATION SHEET (FOR SAME GROUP)		
Date (day, month, year) ___/___/___	Unique sighting or group identifier number: _____	PAGE ___ OF ___
<p>SAMPLE NUMBER _____ WHALE NUMBER _____ Sample type (circle): <i>biopsy</i> <i>sloughed skin</i> <i>other</i> Class of this whale (circle): <i>mother</i> <i>calf</i> <i>adult</i> <i>immature</i> <i>unknown</i> Approx size (circle): <i>large</i> <i>midsize</i> <i>small</i> Sex: <i>female</i> <i>male</i> <i>unknown</i> If this whale was closely associated with another sampled animal from the group, which one(s) - give whale number(s): _____ Association, behavioral, photo or other notes for this whale: _____</p>		
<p>Did sampling effort disrupt whale's behaviour (circle): <i>Yes</i> <i>No</i> <i>Uncertain</i> If yes, elapsed time before animal resumes previous behaviour: _____</p>		
<p>SAMPLE NUMBER _____ WHALE NUMBER _____ Sample type (circle): <i>biopsy</i> <i>sloughed skin</i> <i>other</i> Class of this whale (circle): <i>mother</i> <i>calf</i> <i>adult</i> <i>immature</i> <i>unknown</i> Approx size (circle): <i>large</i> <i>midsize</i> <i>small</i> Sex: <i>female</i> <i>male</i> <i>unknown</i> If this whale was closely associated with another sampled animal from the group, which one(s) - give whale number(s): _____ Association, behavioral, photo or other notes for this whale: _____</p>		
<p>Did sampling effort disrupt whale's behaviour (circle): <i>Yes</i> <i>No</i> <i>Uncertain</i> If yes, elapsed time before animal resumes previous behaviour: _____</p>		
<p>SAMPLE NUMBER _____ WHALE NUMBER _____ Sample type (circle): <i>biopsy</i> <i>sloughed skin</i> <i>other</i> Class of this whale (circle): <i>mother</i> <i>calf</i> <i>adult</i> <i>immature</i> <i>unknown</i> Approx size (circle): <i>large</i> <i>midsize</i> <i>small</i> Sex: <i>female</i> <i>male</i> <i>unknown</i> If this whale was closely associated with another sampled animal from the group, which one(s) - give whale number(s): _____ Association, behavioral, photo or other notes for this whale: _____</p>		
<p>Did sampling effort disrupt whale's behaviour (circle): <i>Yes</i> <i>No</i> <i>Uncertain</i> If yes, elapsed time before animal resumes previous behaviour: _____</p>		

Figura IV.1. Continuación. Estadillos utilizados para registrar la información asociada a las muestras de biopsia obtenidas.

GENETIC SAMPLING DATA FORM - CONTINUATION SHEET (FOR SAME GROUP)		
Date (day, month, year) ____/____/____	Unique sighting or group identifier number: _____	PAGE ____ OF ____
<i>(Use this space for additional notes on the groups)</i>		

Figura IV.1. Continuación. Estadillos utilizados para registrar la información asociada a las muestras de biopsia obtenidas.

