

Informe final* del Proyecto B122
Salud genética de una especie endémica altamente amenazada: la vaquita (*Phocoena sinus*)
(Cetacea: phocoenidae)

Responsable: Dr. Jorge de la Rosa Velez
Institución: Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Marinas
Dirección: Carretera Tijuana-Ensenada Km 103, Ensenada, BC, 22860 , México
Correo electrónico: ND
Teléfono/Fax: Tel: 91(617)4 4170 Fax: 01 (61) 74 4103
Fecha de inicio: Noviembre 30, 1994
Fecha de término: Septiembre 27, 1996
Principales resultados: Informe final
Forma de citar el informe final y otros resultados:** De la Rosa Velez, J. 1997. Salud genética de una especie endémica altamente amenazada: la vaquita (*Phocoena sinus*) (Cetacea: phocoenidae). Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. B122.** México D. F.

Resumen:

La vaquita, *Phocoena sinus*, es la única especie de cetáceo junto con el baiji, que ha sido clasificada como críticamente amenazada por la IUCN World Conservation Union (IUCN); también el Gobierno de México la considera en peligro de extinción. Estas clasificaciones se deben a que el tamaño de la población de esta especie es muy pequeño y a que sigue disminuyendo debido a las actividades humanas. La vaquita sufre una alta mortalidad incidental al enmallarse en redes pesqueras. La estimación más reciente del tamaño de su población es de 224 individuos, con una pérdida del 18% anual. Para caracterizar la composición genética de la vaquita, se secuenció una porción de la región control del ADN mitocondrial de 43 individuos colectados entre 1985 y 1993. Todos los individuos presentaron una secuencia idéntica. A pesar de que se ha reportado previamente una baja variabilidad genética para otras especies de cetáceos, esta ausencia absoluta de polimorfismo en la región más variable del ADN mitocondrial es única.

Al considerar lo anterior, se utilizó esta especie como caso de estudio para evaluar el riesgo de depresión endogámica en una especie naturalmente rara. Primero, se modeló la dinámica de la deriva génica para el ADNmt, para determinar si la vaquita ha sido una especie rara históricamente y, por lo tanto, si este proceso de deriva ha moldeado la variabilidad observada actualmente. Se modelaron dos historias de la población posibles, que resultan en diferentes cantidades de variabilidad genética: 1) el escenario de la fragmentación y 2) el escenario del fundador. Se simuló ensayos con diferentes historias de vida para 10,000 años, seguidas por una contracción poblacional de 57 años. Los resultados mostraron que las poblaciones se fijaron en los primeros 10,000 años para un rango de abundancias posibles y para ambos escenarios.

La contracción reciente de la población no mostró pérdida alguna de la diversidad de haplotipos para diferentes probabilidades de mutación y en ningún caso hubo fijación en los últimos 57 años. El modelo refuerza la hipótesis de que la vaquita es una especie naturalmente rara.

Se ha argumentado que la vaquita está condenada a la extinción por depresión endogámica y que por lo tanto cualquier esfuerzo para su conservación resulta fútil.

Por lo tanto, se investigó la hipótesis de la sentencia. Se combinaron datos de la historia de vida de la vaquita, de otros mamíferos marinos y de incrementos en mortalidad por endogamia, en zoológicos, para evaluar si una reducción en la tasa de crecimiento de esta marsopa es suficiente como para llevarla a la extinción.. El modelo demográfico mostró que las tasas de crecimiento pueden ser positivas o negativas dependiendo de la edad en la primera reproducción, la razón de la mortalidad de juveniles a adultos y el taxón utilizado como modelo para los cambios en los parámetros demográficos. En ninguno de los ejercicios se condena a la vaquita a la extinción por depresión endogámica. Esto lleva a recomendar, que las acciones encaminadas para su conservación no deben ser rechazadas por razones genéticas.

Actualmente, se está continuando este trabajo sobre la variabilidad genética en esta marsopa endémica, analizando loci de microsatélites. Se cuenta con más de 20 cebadores para este efecto. A pesar del hecho de que la vaquita es reconocida internacional y nacionalmente como una especie críticamente amenazada, aún existen desacuerdos sobre los factores de riesgo más significativos para su sobrevivencia. Esta situación ha retrasado las medidas apropiadas para su conservación y se estima que la población sigue disminuyendo, lo que mantiene su estado de vulnerabilidad. Para facilitar la toma de decisiones, se revisaron las evidencias para cada uno de los principales factores de riesgo enmarca dentro de los resultados de los modelos anteriores. que podrían ser agentes causales de la reducción del tamaño poblacional. Estos son: (1) alteraciones del hábitat, (2) reducción del desempeño de funciones vitales por elevadas concentraciones de contaminantes, (3) mortalidad incidental en redes pesqueras. El análisis de estos factores se ha considerado, para evaluar la reducción de la eficacia biológica por la reducida variabilidad genética y la depresión endogámica.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INFORME FINAL PROYECTO B122
SALUD GENÉTICA UPE UNA ESPECIE ENDÉMICA
ALTAMENTE AMENAZADA: LA VAQUITA
(PHOCOENUS SINUS) CETACEA. PHOCOENIDAE)

RESPONSABLE Dr. Jorge de la Rosa Vélez
COLABORADORES: Biól. Lorenzo Rojas Bracho
Biól. Lorenzo Rojas Bracho Dr. Adrew Dizon

INTRODUCCIÓN GENERAL

La vaquita *Phocoena sinus* es probablemente la especie aislada más rara y la menos conocida de las marsopas (Silber, 1990; Vidaj, 1995). Actualmente se le considera como una de las dos especies de cetáceos más amenazada en la actualidad. De hecho, La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) en la edición revisada de su *Red list of Threatened Species* (n preparación), en la cual las especies son clasificadas bajo nuevos criterios para las distintas categorías de "amenazada", solo dos especies de cetáceos fueron ubicadas en la categoría más "peligrosa" (*Critically Endangered*): el baiji y la vaquita. Su extinción es probable a menos que los esfuerzos de conservación se incrementen substancialmente. *La U.S. Endangered*

Species Act también la considera como una especie en peligro de extinción y se le incluye en el Apéndice 1 de la Convención Internacional para el Tráfico de Especies Amenazadas y en Peligro de Extinción (CITES). El Gobierno de México la considera como una especie rara y en peligro de extinción ;Villa, 1993).

La existencia de este mamífero fue desconocida para la comunidad científica hasta marzo de 1950, cuando Norris y MacFarland (1958) colectaron y describieron, con base en un cráneo, el espécimen original (holotipo). Desde su descripción en 1958 hasta hace poco, era prácticamente nulo el conocimiento que se había obtenido sobre su historia de vida, dinámica poblacional, ecología ^N conducta (Silber, 1990; Vidal, 1990). Recientemente, se ha ganado información sobre la abundancia distribución e historia de vida de este cetáceo altamente amenazado (Gerodette et al., 1993; Bar low et al., en prensa; Hohn et al., 1996).

La vaquita es un animal sumamente difícil de estudiar y censar, debido a las características de su habitat (aguas turbidas), la fracción de tiempo que permanece en la superficie y su conducta evasiva y tímida, así como por su forma irregular y desigual de emerger (Silber y Norris, 1991; Barlow et al., 1993). A pesar que estas dificultades complican hacer censos poblacionales confiable, desde hace tiempo queda claro que se trata de una especie poco abundante. Barlow (1986), Silber (1990), Barlow et al, (1993) y Gerodette et al., (1993) han estimado una población menor a ¹500 individuos. Recientemente, Barlow et al (en prensa), llevaron a cabo el mejor censo poblacional hasta la fecha. El tamaño estimado de la población es de 224.

El rango de distribución de la vaquita es aún motivo de discusión y permanece indefinido (Silber, 1990; 1991). Sin embargo, hasta donde las evidencias lo indican, parece ser que el rango histórico y actual de distribución de esta especie, se encuentra limitado al alto Golfo de California: El último censo realizado en verano de 1993, muestra que, probablemente, su distribución se restringe exclusivamente al perímetro occidental del alto Golfo (Gerodette et al., 1995) lo que aunado a otras evidencias indica que la vaquita es el cetáceo marino con la distribución más restringida (Brownell, 1986).

Recientemente se ha encontrado que los nacimientos son altamente estacionales, de finales de *febrero* a principios de abril, y producen crios en años alternos. La distribución de edad insólita (bimodal) , con una ausencia de animales entre los tres y seis años (Hohn et al., 1996). En esta especie, una de las dos más pequeñas entre los cetáceos marinos, las hembras tienen una longitud mayor a la de los machos, 140.6 a 150 cm y 134.9 a 140 cm respectivamente (Brownell et al., 1987; Hohn et al., 1996).

En cuanto a la región, se debe mencionar que el Golfo de California ha sido descrito como un área ,subtropical, muy fértil, con tasas de productividad primaria excepcionalmente *altas*, es considerada como una de las regiones más productivas del mundo. Particularmente, el alto Golfo es una región que se caracteriza por su alta concentración de nutrientes, típica de aguas muy ricas y volúmenes de zooplancton que exceden los valores reportados para regiones de surgencia, como Costa Rica y Perú (Cummings, 1977; Farfán y Alvarez-Borrego, 1992). Además el alto Golfo es una Área importante de reproducción, crianza y alimentación para muchas especies de importancia biológica (endémicas y en peligro de extinción) y comercial (Walker, 1960 en Brownell, 1986; Guevara-Escamilla, et al, 1973; Escobar y Arenillas, 1987). Recientemente ha sido declarada por su valor biológico, en particular por la importancia de la conservación de la vaquita, área natural protegida con carácter de Reserva de la Biósfera (D.O. F., 10 de junio de 1993).

VARIACIÓN GENÉTICA EN EL ADNmt DEL CETÁCEO MÁS AMENAZADO: LA VAQUITA *Phocoenus sinus* (Norris y McFarland 1958).

2.1 INTRODUCCIÓN

En general, las especies de la familia Phocoenidae son vulnerables a las actividades humanas por sus hábitos costeros. En especial la mortalidad incidental y la degradación de su hábitat han forzado a sus poblaciones a tamaños pequeños. Este es el caso particular de la vaquita., que probablemente nunca ha sido una especie abundante. Aunque desde el siglo pasado se han reportado especies de cetáceos en el Golfo de California, no existen reportes comprobados de vaquita (Brownell, 1983). El mayor peligro para esta especie es la mortalidad incidental en redes pesqueras (agalleras y de arrastre). Barlow et al (en prensa) estiman que se pierde cerca del 20% de la población anualmente, mientras que D`Agarosa (1995) estimó que esta pérdida es del 10 al 12% anual sólo para el Golfo de Sta. Clara, Son.

Debido a la herencia matrilineal y la ausencia de recombinación del ADNmt, lo que lleva a que el tamaño efectivo de los genes mitocondriales sea sólo un cuarto de los nucleares, es que este marcador genético es particularmente apropiado para detectar o seguir eventos evolutivos en la historia reciente de las poblaciones. Dentro de estos eventos se pueden considerar el efecto de fundador o colonización de nuevos hábitats y los cuellos de botella. Con esto en mente se decidió secuenciar la región más variable de esta molécula. En este estudio se da a conocer la primera información genética sobre la variabilidad genética de esta especie.

2.2 METODOLOGÍA

Se colectaron muestras de piel de individuos muertos en actividades pesqueras entre 1988 y 1993. La mayoría de los animales provinieron de la pesca ribereña del Golfo de Sta. Clara, Son., aunque se tienen muestras de otras regiones que comprenden todo el rango de distribución de esta especie (figura 1).

El ADN total (nuclear más mitocondrial) fue extraído de cada muestra utilizando métodos estándar como el del fenol-clorofoma (Sambrooke et al 1989) y el del cetil-trimetil-bromuro de amonio a 2 % (CTAB: CTAB al 2% p/v, 0.5 M NaCl, 20mM NaEDTA, 100mM Tris base, pH 8.5 - 9.0) seguido por purificación con cloroformo (J. Smith com. pers. Rhodes University, Dept. Microbioj, Grahamstown, 6140 South Africa, Oct., 1994).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, se llevó a cabo en cicladores térmicos Perkin Elmer 9600 y 480, para amplificar una porción de 400 pb del segmento hipervariable de la Región Control bajo las siguientes condiciones: precalentado a 90°C seguido por 35 ciclos a 94°C por 45 seg.; a 48°C por 1 min. y 72°C for 1:30 min para el 9600 y por 35 ciclos a 94°C por 2:30 min., 48°C por 2 min. y 72°C por 3 min. para el 480. En ambos casos al final de los ciclos se llevó a cabo una extensión de 5 minutos a 72°C. Se utilizaron diferentes cebadores o primers durante las diferentes etapas del experimento: Thr, Thr2, Thr3, D y B. Los productos de la PCR fueron purificados por medio de Microcon 100 (Amicon Inc., Beverly, MA., USA,) y QIAquick (QIAGEN Inc. Chatsworth, CA., USA).

Cabe recordar las dificultades que se presentaron para secuenciar la región control del ADNmt. Del primer conjunto de 11 muestras únicamente 6 se pudieron secuenciar con los cebadores Thr, D y B. Las restantes mostraron una serie de bases ambiguas que impidieron su determinación. Con la prevención del problema, aunada a la llegada de un nuevo conjunto de tejidos, se procedió a buscar la manera de poder obtener secuencias limpias. En todos los casos se lograban obtener bandas claras e intensas tanto en la extracción como en la amplificación. Sin embargo, las secuencias eran de calidad muy pobre. Se llevaron a cabo varios experimentos para tratar de resolver este problema: controles positivos con otras especies, diluciones "frescas" de cebadores, modificación de las condiciones de la PCR (número de ciclos y temperaturas de renaturalización), variación en las concentraciones de MgCl₂, (1.5 - 5.0 mM). Finalmente se diseñó una nueva serie de cebadores, la LB9 en el gen dei Cyt t, que permitió secuencias a través de los genes tRNA Treonina y Prolina, para, posteriormente, diseñar dos cebadores más: Thr2 y Thr3. Al mismo tiempo se uso un PRIZM diferente ;FS). Se programaron nuevas condiciones para la PCR. Primero, se amplificaron las muestras con Thr2 y B a 94° C por un rutinas: El tiempo de transición, entre la temperatura de renaturalización y la de extensión, se prolongó de 1 seg. a 1 min., hasta que alcanzó los 72° C durante 3 min. Al final de los 35 ciclos se mantenía a 72° C durante 5 min. Aquellas muestras que no mostraron bandas claras en el minigel, fueron reamplificadas con Thr3 y 8. Primero se probaron temperaturas de renaturalización altas (56° C) y se fueron reduciendo hasta llegar a 53° C. Asimismo, los tiempos se bajaron de 3 min. a 30 seg. La secuenciación cíclica, y por lo tanto la secuenciación, se llevaron á cabo con Thr3 y D.

El resultado de los ajustes a la técnica original fue que todas las muestras dieron secuencias limpias. Para ubicar la dificultad que representó secuenciar el ADNmt de la vaquita, cabe mencionar que se secuenciaron 12 ballenas pilotos en tan solo 10 días. Tiempo semejante esperábamos para la váquítá al inicio de este proyecto.

La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático de Applied Biosystems 373A (ABI, Foster City, CA). Las secuencias se obtuvieron en ambas direcciones (cadena L. y H) para todas las muestras e conservación y fueron alineadas a ojo por medio del *software* de ABI (SeqEd).

Un tercio de las muestras fueron secuenciadas por medios no automatizados por la Dra. P. Rosel (UN H), así como cuatro muestras más.

2.3 RESULTADOS.

Se lograron secuenciar 400 pb de un total de 40 individuos, lo que representa casi el 18 % del tamaño poblacional, de acuerdo a la estimación más reciente (ver la sección 2.1). No se encontró variabilidad alguna en ninguna de las muestras, es decir, todas las secuencias fueron idénticas.

2.4 DISCUSIÓN

En un esfuerzo por caracterizar la variabilidad genética de la vaquita, se examinaron 400 pb de la Región Control del ADNmt. Esta sección del genoma mitocondrial es la más variable y ha sido utilizada con éxito en distintos estudios para estimar la variabilidad genética de especies raras o amenazadas (ver Avise y Hamrick, 1996). En este estudio se encontró que la variabilidad genética en las 40 secuencias analizadas de la Región Control es igual a cero. Esta ausencia en la variabilidad contrasta con la reportada para otras especies de cetáceos (Baker y Palumbi, 1996). Aun en aquellos casos en que el número de muestras fue pequeño, como en el caso de la marsopa de Dall, *Phocoenoides dalli*, y de Burmeister, *Phocoena spinipinnis* (el pariente más cercano de la vaquita), se encontró que la variabilidad genética y el número de haplotipos es mayor para la misma porción del ADNmt.

Los resultados obtenidos son semejantes a los reportados por Rosel et al (1995) para la marsopa común *Phocoena phocoena* del Mar Negro. En este caso se obtuvieron las secuencias de nueve animales, de las cuales siete fueron compartidas por siete animales. Las otras dos secuencias difirieron entre sí, y con las restantes siete, en una substitución. La comparación resulta interesante, pues al igual que la vaquita, esta población se encuentra aislada y no hay indicaciones de flujo genético con la gran población del Atlántico. Tampoco existen avistamientos confirmados de marsopas comunes en las costas occidental y oriental del Mediterráneo. En el caso de la vaquita, no existen reportes confirmados de esta especie a lo largo de las costas occidental y oriental (del Golfo de California). Probablemente todas las especies de focoénidos divergieron filogenéticamente hace dos a tres

millones de años y se pudieron haber aislado entre hace tres y un millón de años.

La variación genética en las poblaciones está en función de varios factores. Por un lado, del tamaño efectivo de la población (N_e), es decir, el número de individuos que contribuyen al reservorio, genético de la población y dejan descendencia a la siguiente generación. Por el otro, las poblaciones pequeñas están sujetas a la pérdida o fijación de alelas debida a las fuerzas del azar, es decir, la deriva génica. El parámetro más difícil de evaluar es el N_e , que toma en cuenta la estructura poblacional, variaciones en el tamaño poblacional, variaciones en el éxito reproductivo o desigual número de hembras y machos que dejan descendencia (Hill y Allendorff, 1989). Como la vaquita es una especie "nueva", apenas fue descrita a mediados de este siglo y no fue sino hasta 1987 cuando se identificó plenamente la morfología externa, evaluar si esta especie siempre ha tenido un tamaño poblacional efectivo pequeño o si ha sufrido un cuello de botella, es sumamente difícil. Sin embargo, el hecho de que se conocía desde hace tiempo la presencia de otros pequeños cetáceos en el Golfo de California y que no hay evidencias históricas que indiquen que la presencia de esta especie estuviera al sur del alto Golfo (Brownell, 1986), sugieren que la vaquita no ha sido una especie abundante en la historia reciente.

Una pérdida significativa de la variabilidad genética requiere ya sea de una virtual extinción o de un tamaño poblacional que se haya mantenido muy bajo durante un tiempo prolongado (Amos, 1996). Estudios recientes con la anguila americana (Avise et al, 1986), el mirlo de alas rojas (Ball, 1988) y los bagres (Avise, 1987) han revelado niveles muy bajos de variabilidad genética. Esto ha sido atribuido a valores de N_a muy bajos. Ejemplos semejantes se dan con mamíferos marinos como la foca elefante (Hoelzel et al, 1993), la ballena franca del norte (Schaeff et al., 19113) y el delfín de hector (Taylor et al, en preparación). Aún más, el N_e en el largo plazo es generalmente igual o menor al tamaño real de la población (N). Nunney (1991, 1993) indica que en términos generales, para la mayoría de las especies, N_e es de dos a tres veces menor el valor de 14 (el tamaño poblacional de los censos). Sin embargo Frankham (1995), en un estudio sobre el tamaño efectivo de la población en 192 especies, señala que la razón de (N_e/N) es mucho menor a las reconocidas previamente (Nunney, 1993 y Nunney y Campbell (1993) y que la variable más importante para reducir esta razón son fluctuaciones en el tamaño poblacional.

Por lo tanto la vaquita, que actualmente tiene un tamaño poblacional pequeño, debe tener un N_A muy bajo y probablemente éste haya sido el caso durante la mayor parte de sus historia.

Una consideración semejante se ha hecho para el chacal de Simien o lobo Etíope (*Canis simensis*). que probablemente sea el cánido en mayor peligro de extinción. No se encontró variabilidad genética en 394 pares de bases en ocho individuos (Gotteli et al, 1994) y solo se encontraron dos secuencias diferentes en muestras de museo de una población

norteña ya extinta. Los autores sugieren que un tamaño poblacional pequeño o en disminución puede ser una característica de la evolución reciente de este lobo, debido a una pérdida en hábitat adecuados como resultado de cambios climáticos durante los eventos de la última glaciación y más recientemente debido a actividades humanas. Estos bajos niveles de variabilidad se pueden deber a, o son consistentes con, un tamaño efectivo de población en equilibrio de unos cientos de individuos (Gottelli *op. cit.*).

DEI mismo modo, si la vaquita es una especie reciente (desde el Pleistoceno), su baja variabilidad genética puede deberse tanto a un evento de fundador como a un cuello de botella, resultado de los eventos del Pleistoceno. Desde su descripción, Norris y McFarland (1958) sugirieron que la vaquita era una población o especie relictas de una especie ancestral que cruzó el Ecuador desde el Hemisferio sur, durante alguno de los muchos períodos de enfriamiento del Pleistoceno, y quedó atrapada en el Golfo de California a medida que las temperaturas se elevaron. Se cree que el Golfo ha funcionado como una trampa para especies templadas que mantienen poblaciones aisladas subtropicales en estas aguas (p. ej. *Sebastes* sp) (Norris y McFarland *op. cit.* Escobar y Arenillas 1987). Este hecho se ve reforzado porque el pariente más cercano de esta especie es *P. spinipinnis*, que se encuentra en aguas occidentales y orientales de Sudamérica (Norris y McFarland, *op. cit.*, Rosel et al, 1995).

El efecto en la heterocigosis de un evento semejante depende del tamaño mínimo de la población y de la tasa de crecimiento de la misma. Si la duración del cuello de botella es relativamente corto y el crecimiento rápido, entonces la pérdida de variabilidad es pequeña. Si en cambio la duración del cuello de botella es duradero por muchas generaciones, la pérdida de heterocigosis es significativa (Nei, 1987; Barton y Charlesworth, 1984), los efectos de cuello de botella en el ADNmt son muy extremos, por ser ésta una molécula muy sensible a los cambios en tamaño poblacional. Esto se debe a dos aspectos: por un lado el tamaño efectivo de las moléculas de ADNmt, que se pueden considerar como N_f por el número efectivo de hembras, es más pequeño que el N , por un factor de cuatro (Brown et al, 1989; Moritz, 1994). Es decir, el número efectivo de genes (ADNmt) es un cuarto del de los nucleares, porque los primeros son heredados uniparentalmente y se cree que son homoplásmicos (n y no $2n$). Por lo tanto, el tiempo de fijación para el ADNmt es menor que para los genes nucleares y la pérdida de variabilidad para este genoma, durante los cuellos de botella, es más pronunciado (Harrison, 1989).

Este fenómeno en combinación con un cuello de botella vicariante del Pleistoceno, un tamaño efectivo poblacional de largo plazo o ambos, pueden explicar la falta de variabilidad en la Región Control del ADNmt de la vaquita. El hecho de que el lobo de Etiopía también sea considerado como una especie relictas del Pleistoceno, así como que la probable formación de la población de la marsopa común sea en el

mismo período, parecen apoyar esta alternativa. Asimismo, apoya también el hecho que del Pleistoceno al presente sea un tiempo suficiente como para perder la mayor parte de la variabilidad genética de una especie. Además, si se considera lo sensible que es el N_e a las fluctuaciones del tamaño poblacional y la relación tan estrecha de este parámetro con la variabilidad genética (Wright, 1969), posibles fluctuaciones del tamaño poblacional en la historia de la especie pueden resultar en una variabilidad genética abatida. Por otro lado un efecto de fundador, seguido de una disminución drástica del tamaño poblacional (cuello de botella, como lo mencionado anteriormente), bien pueden explicar la variabilidad genética {observada en *P. Sinus*}

La pérdida de variabilidad genética en una especie poco abundante siempre trae consigo implicaciones (y preocupaciones) sobre la endogamia y sus consecuencias negativas, incluyendo la pérdida de la eficacia biológica por la fijación de alelos deletéreos. Sin embargo, si una población siempre ha sido pequeña, existe la posibilidad de que las mutaciones recesivas letales hayan sido purgadas por selección natural, al momento de encontrarse en condición homocigota (Lande, 1988; Avise, 1994; Pope, 1996). Esto puede llevar a una baja en la carga genética de las

poblaciones (Charlesworth y Charlesworth, 1987). Por lo tanto, la vaquita no debe ser predestinada a la extinción por falta de polimorfismo en la región control del ADN mt. .

Es decir, no podemos establecer una línea directa entre la variabilidad genética en esta molécula de ADN, la salud genética de la vaquita, una elevada endogamia y la depresión endogámica. Hay especies adaptadas a una baja variabilidad genética y endogamia, inclusive hay reportes de poblaciones heterocigotas que sufren un cuello de botella, pasan por un período de depresión endogámica y luego se adaptan a condiciones de endogamia (Pope, 1996).

Es importante aclarar, por lo tanto, que el efecto de la pérdida de la variación genética en el éxito adaptativo de las especies, depende de la historia genética de la especie en cuestión.

Es importante mencionar que existen una serie de ejemplos de especies que a pesar de haber sido reducidas a números mínimos y poseer una bajísima variabilidad genética (nuclear y mitocondrial) se han logrado recuperar en números. Particularmente notable es el caso del elefante marino (*Mirounga angustirostris*), que sufrió un cuello de botella extremo, por sobreexplotación en el S. XIX, del cual se recuperó la población a partir de menos de 30 individuos;. Actualmente, la población de la foca elefante se estima en cerca de

12,000 individuo; y no se detectó polimorfismo de alozimas en 60 loci y en el ADN mitocondrial fue muy limitado, tres sitios polimórficos y dos haplotipos (Bonner y Selander, 1974; Hoelzel et al, 1993). Es importante señalar que el sistema de apareamiento de esta especie haría más difícil su recuperación (N, muy bajo por sistema de harem).

No cabe duda de que existe una preocupación generalizada en cuanto a de que la variabilidad genética es fundamental para la sobrevivencia a largo plazo de las especies, por ejemplo es su importancia en la adaptabilidad de las especies a los cambios ambientales. A corto plazo, sin embargo, los aspectos demográficos por tamaño poblacional pequeño (efecto Allee) como tasa de crecimiento, factores ambientales y conductuales, entre otros, pueden presentarse por sobre los genéticos (Burgman, 1993; Lande 1987). En el caso de la vaquita el

aspecto demográfico que puede estar comandando, en el corto plazo, sus esperanzas evolutivas es la mortalidad incidental en redes de pesca ("La variabilidad genética no es importante si la especie se extingue Lande, 1987). Es decir, la tasa a la que la vaquita puede desaparecer por mortalidad incidental, 20% anual, supera a la tasa debida a la acumulación de mutaciones deletéreas en una población.

Hohn *et al* (1996) en su trabajo de historia de vida de vaquita señalan que es capaz de presentar una tasa de crecimiento positiva. Por lo tanto si se elimina la mortalidad incidental la población puede presentar un crecimiento. Aún más, si la vaquita recupera su tamaño poblacional, la recuperación genética puede restablecerse por mutación. Esto mantendrá el potencial adaptativo de la vaquita. Otro aspecto importante es el cambio ambiental. La interrupción del flujo del Río Colorado y sus efectos a largo plazo debe ser evaluada particularmente ahora que se ha reportado dentro de la dieta la vaquita especies no sólo estuarinas sino también anádromas. Sin embargo, hasta que no se cuantifiquen estos cambios, se debe considerar que la vaquita está amenazada inmediatamente por la mortalidad incidental en redes pesqueras, tanto agalleras como de arrastre.

3. MICROSATELITES Y VARIABILIDAD GENETICA: EFECTOS DE LA ENDOGAMIA EN LA RECUPERACIÓN DE LA VAQUITA

3.1 INTRODUCCIÓN

Si existe un debate sobre la importancia de la endogamia en la sobrevivencia o extinción de las poblaciones pequeñas, en cambio no hay duda de que la endogamia puede reducir la tasa de crecimiento poblacional. Ralis y Ballou (1991) mostraron que la mayoría de los ungulados y primates mantenidos en cautiverio, mostraban un incremento en la mortalidad juvenil cuando se presentaba la endogamia. Este decremento es provocado por la presencia y exposición de alelos deletéreos recesivos, al ser heredados alelos idénticos por descendencia (AID). A pesar de que alelos deletéreos o letales son comunes en el genoma de la mayoría de los individuos, la probabilidad de heredar AID de ambos progenitores es muy rara en poblaciones grandes. Poblaciones cuyo tamaño ha sido históricamente pequeño, han tenido la oportunidad de purgarse de estos alelos o carga genética, debido a que en estas poblaciones los individuos tienen una probabilidad mayor de heredar AID y estos individuos serían fuertemente seleccionados en contra o negativamente. El caso contrario sucedería en las poblaciones mayores, pues la probabilidad de heredar dos AID deletéreos es muy baja. Por lo tanto, una población que sufra una reducción drástica del tamaño poblacional o cuello de botella, tendrá más probabilidades de sufrir un incremento en la mortalidad debido a la endogamia, que una población que "naturalmente" ha sido pequeña. Aún poblaciones que han sufrido una reducción rápida, pueden tener suficiente tiempo para purgarse de alelos deletéreos, antes de extinguirse. Generalmente esta purga puede darse en el transcurso de pocas generaciones (Hartl, 1989).

Aunque en general es poco lo que se sabe sobre la historia de vida de la vaquita, recientemente Hohn *et al* (1996) han aportado datos interesantes. En el capítulo anterior se reportó la nula variabilidad genética en la porción más variable de la Región Control del ADNmt, y las dificultades para "engancharse" estos resultados con efectos de depresión endogámica. En este capítulo se señala que la variabilidad genética en el ADN nuclear, evaluada por medio de microstélites, presenta el mismo resultado que con el ADNmt. Por lo tanto, todo parece indicar que la variación genética en esta especie se encuentra altamente reducida en ambos genomas. Con base en estos resultados, en el presente capítulo utilizamos modelos demográficos para explorar si, dado lo que se sabe hasta ahora de la vaquita, cualquiera de las dos hipótesis siguientes puede ser rechazada: i) Dado que se elimine la mortalidad incidental de esta especie, los efectos de la endogamia no causarían la extinción, y

dada la misma condición ii) los efectos de la endogamia sí causarán su extinción. Utilizamos los pocos datos accesibles de la vaquita, junto con las tasas de sobrevivencia para otros mamíferos marinos, así como los efectos de la endogamia en la sobrevivencia de juveniles de especies de mamíferos en cautiverio, para explorar los rangos de los efectos posibles para el crecimiento de la población, incluyendo los de la endogamia, partiendo del hecho que dejan de actuar los agentes causales de la reducción de la población de vaquita. A saber, la pesca con redes agalleras.

3.2 1113TAIRAS.

El procedimiento con microsátélites es semejante al descrito para amplificaciones de segmentos del ADNmt, por medio de la PCR, y que se mencionó anteriormente. En este caso, los cebadores se diseñan para que reconozcan las secuencias conservadas que flanquean las repeticiones en tanques. Se probaron cinco cebadores, de los cuales tres dieron los mejores resultados (amplificaron y se pudieron determinar los alelos). Los cebadores optimizados para evaluar la variabilidad genética de la vaquita fueron: EV 37, EV 94 Y EV 104. Para lograr esto, se variaron las concentraciones de los cebadores (10 y 5 microM) y las condiciones de la PCR. No se consideró alterar la concentración de MgCl₂, pues se mejoraron los resultados cambiando las temperaturas y los tiempos de la PCR.

Las condiciones iniciales fueron: 35 ciclos, diez de los cuales se llevaron a cabo a 93° C durante un minuto (desnaturalización); 48° C por un minuto (renaturalización) y 72° C por 50 seg. (extensión). Los 25 ciclos restantes se corrieron a 90° C durante 45 seg.; 55° C por un minuto y 73° C. Los productos amplificados se corrieron en un gel de Nusieve al 4% o en uno de agarosa al 2%, para comprobar su amplificación y determinar su dilución para cargarlos en un gel de acrilamida, en un secuenciador automático (ver capítulo anterior).

Posteriormente, se llevó a cabo una PCR de *touchdown* (que permite a los cebadores iniciar la extensión y multiplicación aún si su secuencia no corresponde a la del template) en el cual se bajó un grado centígrado la temperatura cada tres ciclos (de 58° C a 49° C), para volverla a subir a 56° C. Hubo una amplificación pobre con esta técnica. Los tiempos para la renaturalización y la desnaturalización fueron de 45 seg. Se optó por mantener las mismas temperaturas pero con tiempos más cortos (30 seg.). Mejoraron las amplificaciones para los EV 37 y 94. Sin embargo las corridas en el autosecuenciador fueron pobres. Inmediatamente se intentó una amplificación de *touchdown* con un método diferente: 95° C 60° C y 72° C para bajar a 4°C (112° C cada ciclo) y posteriormente para volver a subir a 55° C. En este caso la duración total fue de 30 ciclos. Posteriormente, se llevaron a cabo amplificaciones iniciando con temperaturas de renaturalización más altas: 59° C y se fueron

bajando a la tasa de un grado centígrado cada amplificación. Esto se hizo con el fin de determinar la temperatura máxima de renaturalización. De esta forma se determinó que 57° C y 56° C. eran las temperaturas más indicadas. Esto se llevó a cabo con el fin de optimizar los resultados del autosecuenciador (eliminar los picos anteriores, en el cuarto informe parcial).

Así, se llevaron a cabo las amplificaciones con una temperatura inicial de 56° C y se bajó a 4+i C para volverla a subir a 57° C. De nuevo se utilizó el método de bajar la temperatura de renaturalización a la tasa de un grado centígrado cada tres ciclos. Esto mejoró notablemente los resultados, principalmente con el EV94 y el EV37. Sin embargo, este último cebador funcionó prácticamente igual de bien con el primer método de dos grupos de ciclos y cambiando las concentraciones de los cebadores de 10 microM a 5 microM. También se corrieron muestras de *Phocoenoides dalli*, pariente cercano de la vaquita (Familia Phocoenidae), para comparar el polimorfismo obtenido mediante los cebadores empleados.

Posteriormente, se creó un modelo que explora los rangos posibles para las tasas de nacimientos, de sobrevivencia, edad máxima, edad a la primera reproducción (AFR), intervalo entre nacimientos y reducción de la sobrevivencia en el primer año debido a la endogamia. Los parámetros demográficos se utilizan en una matriz de Leslie (Caswell, 1989) para calcular la tasa de crecimiento poblacional (r). Si asumimos un crecimiento exponencial (ec. 1), entonces una población declinará hasta la extinción si $r < 0$.

$$N_{t+1} = N_t e^{rt} \quad (1)$$

Donde N = abundancia, t = tiempo y r = tasa de crecimiento poblacional.

Una muestra de 56 vaquitas reveló un intervalo entre nacimientos de dos años. No se encontraron animales entre las edades de 3 y 6 años, lo que complica la estimación de la edad a la primera reproducción. Ningún animal menor a tres años estaba maduro y todos aquellos mayores de seis si lo estaban. Por lo tanto se examinó la AFR entre estas dos edades, 3 y 6. El animal más viejo fue de 21 años. Pero debido a que la población de vaquita ha estado sujeta a altas mortalidades por actividades pesqueras durante varias décadas, es difícil considerar que esta edad represente la verdadera edad más vieja. Por lo tanto se utilizaron edades de 20 a 25 años.

Uno de los problemas más graves para modelar poblaciones de cetáceos es que se desconoce la tasa de sobrevivencia. La vaquita no es la excepción. Estimaciones de esta tasa para juveniles y adultos, existen sólo

para orcas (*Orcinus orca*, adulto (sa) = 0.99, primer año (spa) = 0.96, razón de primer año a adulto (spa/sa) = 0.96) y tursiones (*Tursiops truncatus*, adulto (sa) = 0.96, primer año (spa) = 0.80, razón de primer año a adulto (spa/sa) = 0.83; Wells y Scott, 1993). Ambas especies son más longevas y tienen mayores intervalos entre nacimientos que la vaquita. Los pinnípedos tienen crías anualmente y representarían la opción más pesimista como patrón de vida para vaquita (lobo fino *Callorhinus ursinus*: adulto (sa) = 0.110, primer año (spa) = 0.67, razón de primer año a adulto (spa/sa) = 0.75; Barlow y Boveng, 1991). Dada la edad más avanzada y el intervalo entre nacimientos, la sobrevivencia de los adultos debe ser más semejante a la de los tursiones y la razón de sobrevivencia (spa/sa), debe ser intermedia entre las dos últimas. Por lo tanto se examinan los siguientes rangos: tasa de sobrevivencia de adultos 0.9 a 0.96 y la razón de la tasa de sobrevivencia del primer año a la edad adulta de 0.75 a 0.85.

Ralls y Ballou (1983) resumen los cambios de sobrevivencia para poblaciones de 16 especies de ungulados y 16 de primates en cautiverio. La mayoría de ellas presentan un fuerte incremento en la mortalidad, con la endogamia, aunque algunos (inclusive con una muestra grande, por ejemplo, de chimpances) no muestran este aumento. Como endogamia, estos autores consideraron cualquier probabilidad de que los alelos pudieran ser idénticos por descendencia, de acuerdo a los pedigrís de cada especie. Los individuos fueron considerados como endogámicos o no endogámicos (no intentaron relacionar la mortalidad con ningún coeficiente de endogamia). La mayoría de las poblaciones son sumamente pequeñas, de modo que los incrementos reportados deben ser considerados como casos extremos. En la tabla 1 se muestran los valores promedio para los distintos taxa. Las poblaciones de primates son generalmente más pequeñas que las de ungulados y pueden, por lo tanto presentar cierta cantidad de endogamia, lo que es consistente con el bajo incremento en mortalidad el primer año. En principio esto podría ser más consistente con la vaquita que es naturalmente rara, sin embargo se considera un rango completo de los efectos de la endogamia, que se muestran en la tabla 1, para nuestro análisis.

Tabla 1 Tasas de mortalidad media no ponderada en el primer año para animales en cautiverio.

	<i>MORTALIDAD MEDIA SIN</i>	<i>MORTALIDAD MEDIA CON</i>	<i>PORCENTAJE DE INCREMENTO</i>
<i>PRIMATES</i>	0.295	0.498	69
<i>UNGULADO</i>	0.216	0.543	151
<i>AGRUPADO</i>	0.256	0.521	103

3.3. RESULTADOS

El resultado más sorprendente fue no encontrar polimorfismo en el genoma nuclear con los cebadores utilizados. Se identificaron tres alelos, uno por cebador: para el EV37 de 178 pb; con el EV94 de ~ 210 pb y con el EV104 de 152 pb (figuras 2a - 2c). En las muestras de la marsopa de Dañ los tres presentaron polimorfismo. En muestras de marsopa común también (Valsecchi y Amos, 1996).

Dados estos resultados, que pueden indicar elevada endogamia, se procedió a modelar los efectos de la endogamia. En las figuras 3a - 3d, se muestra la tasa de crecimiento poblacional con diferentes niveles de endogamia para razones constantes de sobrevivencia del primer año a adulto (0.80), una edad máxima de 25 años y diferentes valores de AFR. Únicamente se consideraron valores para escenarios biológicos plausibles. No se consideró biológicamente plausible que una especie tenga un crecimiento poblacional, en ausencia de efectos de la endogamia, <0.01 . Muchas de las combinaciones de baja sobrevivencia de los adultos (0.9), alta AFR (6) y baja spa/sa (0.75), produjeron tasas de crecimiento negativo y por lo tanto fueron consideradas biológicamente poco probables. Como es de esperarse, una baja AFR resulta en una tasa de crecimiento mayor que puede tolerar mejor una reducción en la sobrevivencia de primer año. La razón spa/sa tiene un efecto mayor en la habilidad de la especie para tolerar la depresión endogámica. En las figuras 4a - 4c se muestra claramente este efecto para una AFR constante (5) y una edad máxima de 25 años. Por ejemplo, para la tasa más alta del efecto de la endogamia (incremento de 150 %), el porcentaje de tasa de sobrevivencia de adultos con $r > 0$ va de 50 %, con una razón = 0.85, a 0 % cuando la razón es de 0.75. Esta información se resume en la tabla 2 (no se da información para las diferentes edades máximas, ya que este parámetro tuvo un efecto despreciable en los resultados).

Tabla 2. Rango de porcentajes para tasas probables de sobrevivencia de adultos cuando $r > 0$ (i.e. efectos

$r > 0$ (i.e efectos de la extinción de la endogamia causan la extinción).

PORCENTAJE DE INCREMENTO EN LA MORTALIDAD PRIMER AÑO									
ENDO	50%			100%			150%		
RAZON	0	0	0	0.	0.	0.	0.7	0.80	0.
AFR						—			
3	8	1	1	56	71	10	14	43	7
4	7	8	1	43	57	86	14	29	5
5	8	8	8	33	67	71	0	33	5
	8	1	8	40	60	67	0	40	5

3.4 DISCUSIÓN

Parece sorprendente que los cebadores utilizados no hayan detectado polimorfismo. Varias razones se consideraron para seleccionar a los microsátélites como marcadores genético,, y particularmente a los EV37, 94 y 104. En cuanto a estos, se seleccionaron por haber sido polimórficos en la marsopa común y en la de Dall, especies emparentadas con la vaquita. En cuanto a los microsátélites, la razón para seleccionarlos radica en el enorme número de alelas que se puede resolver con estos marcadores genéticos, lo que los hace particularmente atractivos para investigar cuellos de botella y flujo génico (Scribner et al, 1994). En este sentido los resultados obtenidos con el ADNmt concuerdan perfectamente con lo encontrado con los microsátélites. Además la facilidad de uso se combina con la conservación de las secuencias que flanquean las repeticiones en tandem, lo que permite que un grupo de cebadores diseñados para una especie, amplifique loci homólogos en especies emparentadas (Schlotterer et al., 1991; FitzSimmons et al., 1995; Valsecchi y Amos, 1996). Ejemplos en este sentido se han reportado para primates, cánidos, artiodáctilos y teleósteos (ver Dutton, 1995). Particularmente esta conservación en cetáceos ha sido aprovechada. Cebadores diseñados para algunos odontocetos (ballenas dentadas, marsopas y delfines), fueron polimórficos no sólo para otras especies de odontocetos, sino también para especies del otro suborden de cetáceos, los mysticetos o ballenas barbadas (Schlotterer *et al.*, 1991; Valsecchi y Amos, 1996) lo que indica conservación 'de loci de microsátélites polimórficos sobre un período de 35 a 40 millones de años (Schlotterer *et al.*, 1991). Más espectacular, en este mismo sentido, es lo reportado por FitzSimmons et al. (1995), para especies de tortugas a través de casi 300 millones de años de evolución divergente.

Por otro lado, las tasas de mutación para estos marcadores pueden ser muy altas, superiores a 10^{-3} por generación (Slatkin, 1995). Probablemente el mecanismo por medio del cual se forman alelos de tamaños nuevos

sea el *slippage* intra-alélico de la polimerasa. El *strand slippage* también puede ser otra fuente de variación, para el número de repeticiones dentro de un microsatélite (Schlotterer y Tautz, 1993; Weber y May, 1989 en Dutton, 1995). Debido a esto (elevada tasa mutacional y *slippage*) los microsatélites tienden a presentar un gran número de alelos y elevada heterocigosis. Todo lo anterior, más el hecho de que probaran ser polimórficos para especies emparentadas con la vaquita, apoya plenamente la selección de estos marcadores genéticos para el estudio de esta especie. Sin embargo, no es posible considerar que esta sea la variación genética en *P. sinus*, probablemente ni para estos cebadores. Es decir, es difícil imaginar una variabilidad de cero y más aún en un marcador con las tasas (de mutación de los microsatélites, la cual permitiría la aparición de variantes en unas cuantas generaciones, aún si el tiempo generacional fuera de entre cuatro y siete años. El modelo evolutivo propuesto para el proceso mutacional de los microsatélites, ha sido el de *stepwise* (Kimura y Ohta, 1978; Valdés *et al.*, 1993; Shriver *et al.*, 1993). Aunque éste fuera el modelo y no el de alelos infinitos, no explicaría la ausencia absoluta de polimorfismo por convergencia (Nei, 1987). La primera explicación es que haya una mala determinación de individuo; heterocigotos y estén siendo clasificados como homocigotos. Esto se daría si en la población fuesen comunes los alelos nulos, los cuales se sabe ocurren en microsatélites (Bruford y Wayne, 1993). Estos se pueden presentar por modificaciones (por ejemplo, supresión de pb) de las regiones que flanquean los microsatélites y coincidir con los sitios donde se sientan los cebadores. Los procesos que afectan a las pequeñas poblaciones, como a la de la vaquita, podrían modificar estas secuencias. Para evaluar la presencia de estos alelos, sería necesario detectar algunos heterocigotos por cebador y cuantificar el exceso de homocigotos. También por estudios de "no herencia" o falta de herencia de alelos de los progenitores en su descendencia. Ninguno de estos estudios es posible bajo las circunstancias en que se encuentra la información sobre la vaquita. Por lo tanto se debe tomar con mucha precaución la deficiencia de heterocigotos, así como comparaciones de esto entre poblaciones. Un indicio indirecto al respecto, es que hubo muestras que no amplificaron con unos cebadores y sí con los otros (por ejemplo, cuatro muestras que no amplificaron con EV37 si lo hicieron con el 94). Una idea que se está planeando llevar a cabo con estas muestras, es la de ir bajando la temperatura de renaturalización (a partir de 46° C), a la inversa de lo que se hizo para detectar la máxima temperatura de renaturalización. Esto con la idea de ver si se logra detectar la presencia de otro alelo, que por mutación en el sitio de renaturalización no se detecte a temperaturas más altas.

Una segunda explicación, que no se contrapone con la anterior, es que el número de cebadores debe ser incrementado. El costo de este paso es alto. Sin embargo, se planea conseguir más cebadores y continuar con esta parte del trabajo. Tamizar el genoma nuclear en busca de microsatélites específicos para vaquita sería ideal, sin embargo el costo en tiempo y recursos de esta técnica, es muy elevado y en un futuro se

puede pensar en esta alternativa.

Lo que está claro, es que ambos genomas (mitocondrial y nuclear) presentan una muy baja variabilidad genética. A partir de este trabajo y del ejercicio del modelo, dado el conocimiento que se tiene en este momento de la vaquita (variabilidad genética, historia de vida y tamaño poblacional), de la historia de vida de otros mamíferos marinos y efectos de la endogamia en la sobrevivencia del primer año de vida para mamíferos longevos, parece difícil concluir sobre el efecto de la endogamia en la población altamente amenazada de vaquita. Es decir, se pueden rechazar ambas hipótesis: que la endogamia causará ciertamente la extinción y que la endogamia no causará la extinción. Dado lo que sí se sabe, los efectos de la endogamia en la vaquita no son conocidos o predecibles. Es posible especular en términos de cuál es el escenario más probable. Es muy poco factible que esta especie tenga una historia de vida semejante a los lobos de piel fina, en los cuales la $s_{pa/sa} = 0,75$ y la sobrevivencia de los adultos = 0.90. Asimismo, es difícil pensar que los efectos de la endogamia sean tan severos para el taxón exógamo (*outbred*) de los ungulados, que sufrió un incremento de 150% en la mortalidad durante el primer año. Lo más probable es, entonces, que *P. sinus* se encuentre en el rango intermedio de los parámetros examinados. Un examen de la tabla 2, puede sugerir que la endogamia no lleve a la vaquita a la extinción, aun en el caso de que estas tasas elevadas sean reales. Ciertamente se puede concluir que no es posible proyectar que la vaquita se extinguiría por endogamia, si dejan de operar los factores causales, es decir, aún si se evitara la mortalidad en redes agalleras y de arrastre. Como ya se mencionó en el capítulo anterior, casos como el del elefante marino (a pesar de que su $s_{pa/sa}$ sea más parecida a la del lobo de piel fina del norte) indican que poblaciones llevadas casi a la extinción pueden recuperarse. Otro ejemplos pueden ser el de la ballena gris, la ballena cabeza de arco, la ballena franca del sur y la nutria marina (IWC14810SIUCN). También son notables los ejemplos de poblaciones fundadas por un número pequeño de individuos que actualmente han incrementado sus poblaciones notablemente (ver Avise y Hamrick, 1996).

Conclusiones

1. Mediante el análisis por secuenciación de la Región Control del ADNmt, en 40 especímenes de *Phocoena sinus*, no se encontró ninguna variación genética.
2. No se detectó ningún polimorfismo en el ADN nuclear, mediante el análisis de microsatélites, empleando la serie de cebadores EV37 (N=18), EV94 (N=15) y EV104 (N=15), a pesar de que estos fueron polimorficos en dos especies emparentadas con la vaquita (la marsopa de Da; y la marsopa común).
3. Se identificaron tres alelos, uno por cebador, de 178 pb, 210 pb y 152 pb, respectivamente.
4. La nula variación genética en ambos casos, puede deberse a un efecto de fundador, un cuello de botella, o ambos, combinado con un pequeño tamaño efectivo de la población (N_e).
5. El exceso de homocigotos detectado por medio de microsatélites debe considerarse un resultado preliminar e interpretarse con precaución, pues puede deberse a la presencia de alelos nulos no detectados.
6. Es necesario probar una serie mayor de cebadores para el estudio de variación mediante microsatélites, para poder estimar el polimorfismo del genoma nuclear. Para lograr esto, se requiere la elaboración de nuevos cebadores o realizar un tamizado del genoma en busca de marcadores específicos para vaquita.
7. Los datos genéticos obtenidos en este estudio, refuerzan la conclusión de los trabajos realizados relativos a la estimación de abundancia, en cuanto a que el tamaño de la población es pequeño. Los datos también permiten concluir que el tamaño efectivo de la población asimismo es pequeño. Cualquier intento para modelar la historia evolutiva de la especie es vano, ante el valor nulo de variabilidad genética.

Con la información genética y demográfica con que se cuenta hasta el momento, no es posible condenar a la vaquita a la extinción por endogamia, como ha sido sugerido en diversos foros. Existen ejemplos bien documentados de especies que han recuperado sus tamaños poblacionales y salud genética, aun habiendo sufrido reducciones más drásticas que por la que atraviesa la vaquita. El ejemplo más claro es el del elefante marino *Mirounga angustirostris*. Por lo tanto, el resultado obtenido en este estudio no es antecedente de la desaparición de la especie en cuestión siempre y cuando los agentes causales de la reducción del tamaño poblacional sean suspendidos (redes agalleras y de arrastre actuando en el Alto Golfo de California).

Los estudios demográficos y genéticos coinciden en señalar que se trata de una población extremadamente pequeña. De la teoría de la Biología de Poblaciones se conoce que los procesos al azar cobran mayor importancia en la definición de la historia evolutiva de la especie, a medida que su tamaño disminuye. Por lo tanto, es fundamental procurar la eliminación de cualquier actividad que modifique el parámetro de mortalidad total que vaya más allá {le la mortalidad natural de la especie.

Agradecimientos.

Principalmente se desea agradecer a la Dra. P. Rosel su asesoría y cooperación para completar la secuenciación de las 40 muestras. A la Dra. B. Taylor por su invaluable participación en la elaboración del modelo de endogamia. Sin la ayuda de ambas, este estudio hubiera quedado truncado. A Sean Costa y Cristi Lux por su apoyo en el laboratorio y su ánimo cuando parecía que la vaquita era "insecuenciable". A los Dres. G. O'Correy-Crowe y O. Ryder por su asesoría y consejos.

Alvarez-Borrego, S. 1983. Gulf of California. In: B.H. Ketchum (ed). Estuaries and Enclosed Seas. Elsevier Scientific Publ. Conclusions. Amsterdam: 427-449.

Amos, B. 1996. Levels of genetic variability in cetacean populations have probably changed little as a result of human activities. *Rep. Int'l. Whal. Commn.* 46:657-658

Avise, J.C. 1989. A role of molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *TREE*. 4:279-281.

Avise, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, Inc. New York, NY. USA., 511 pp.

Avise, J.C. and J.L. Hamrick (Eds.) Conservation Genetics: Case Histories from Nature. Chapman and Hall., N.Y., 1996. 512pp.

Avise, J.F.H., C.A. Reeb, and N.C. Saunders. 1987. Geographic population structure and species differences in mitochondrial DNA of mouthbrooding catfishes (Ariidae) and demersal spawning toadfishes; (Batrachodidae). *Evolution* 41:991-1002.

Avise, J.I., G.S. Helfman, N.C. Saunders, and L.S. Hales. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetics consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 83:4350-4354.

Baker, C. S. and S. R. Palumbi. 1996. in: Avise, J.C. and J. L. Hamrick (eds.) Conservation Genetics: Case Histories from Nature. Chapman and Hall., N.Y., 1996. pp10-49.

Ball, R.N., S. Freeman, F.C. James, E. Bermingham and J.C. Avise. 1988. Phylogeographic population structure of red-winged blackbirds assessed by mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1558-1562.

Barlow, J. 1986. Factors affecting the recovery of *Phocoena sinus the vaquita or Gulf of California* harbor porpoise. US NMFS SWFC Adm. Rep. No LJ-86-37 19 pp.

Barlow, J. 1986. *Factors affecting the recovery of Phocoena sinus the vaquita or Gulf of California* harbor porpoise US NMFS SWFC Adm. Rep. No LJ-86-37 19 pp.

Barlow, J, et al. 1993. An experimental aerial survey for vaquita (*Phocoena sinus*) in the northern Gulf of California, Mexico. *Mar. Mamm. Sci.* 9(1):89-94

Barlow, J., T. Gerrordette and G. Silber. 1996. First Estimates of Vaquita *Phocoena sinus* in the Gulf of California, Mex. In press *Mar. Mamm. Sci.*

Barlow, J. and P. Boveng. 1991. Modeling age specific mortality for marine mammal populations. *Mar. Mamm. Sci.* 7(1):50-65

Barton, N. H. and B. Charlesworth. 1984. Genetic revolutions, founder effects, and speciation. *Ann. Rev. Eco; Syst.* 15:133-164

Bonell, N.L. and R. K Selander. 1974. Elephant Seals: genetic variation and near extinction. *Science* 184:908-909.

Brown, W.M. et al. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1967-1971

Brownell, R.L., 1983. *Phocoena sinus* Mammalian Species 1-3;

Brownell, R.L., 1986. *Distribution of the vaquita P. sinus in Mexican waters.* *Mar. Mamm. Sci.* 9(1):89-94;

- Bruford, AM.W. and R.K Wayne. 1993. Microsatellite and their applications to populatins genetic studies. *Current Opinions in Genetics and Development* 3:1-5.
- Burgman. M.A., S. Ferson and H.R. Akcakaya. 1993). *Risk Assesement in Conservation Biology*. Chapman and Hall. Cambridge, Great Britain. 314 pp.
- Casweil, H. 1989. *Matrix population models:construction, analysis, and interpretation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. USA
- Charlesworth D., and B. Charlesworth. 1967 Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:237-268.
- Cumminp, J.A. 1977. Seasonal and aerial variation of zooplankton standing stocks in the Northem Gulf of Cs lifornia. M.Sc. Thesis., Univ. Arizona, Tuczon, Arizona. 61 pp.
- D'Agarosi, C. 1995. Mortalidad incidental de la vaquita en el Golfo de California. Tesis de Maestría, ITESM, Campus Guaymas, Guaymas, Son,
- Diario Ofi'ial de la Federación (DGF). 1993. Tomo CDLXXVII No.8. Jueves 10 de junio de 1993: 25-28
- Dutton, P. H 1995. *Molecular Evolution of Sea Turtles, with special reference to the Leatherback D. coriacea*. Ph.D Thesis. Texas A&M University. College Station, TX. USA.
- Escobar •Femández, R. y J.I. Arenillas-Cuetara. 1987. Aspectos Zoogeográficos de la íctiofauna en los Mares Adyacentes a la Península de Baja California, Mex. Tesis Profesional, Fac. Ciencias Marinas, UABC. 217pp.
- Farfán, C.: y Alvarez-Borrego,S. 1992. Zooplankton Biomass of the Northemmost Gulf of California. *Ciencias Marinas* 18 (3):17-36
- FitzSimmons, N.N., C. Moritz, and S.S. Moore. 1995. Conservation and Dynamics of Microsatellite Loci oven a 300 million Years of Marine Turtle Evolution. 1995. *Mol. Biol. Evol.* 12(3):432-440.
- Frankham, R. 1995. Effective population sizeladult population size ratios in wildlife: a review. *Gen. Res.* 66:95-107
- Gerrodete, T. et *al.* 1993. How many vaquita remain?. Can we monitor changes in population size?. TEinth Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Galveston, Texas. U.S.A. November 11 -15, 1993.
- Gerrodef,e, T. et al. 1995. Vaquita distribution in the Upper Gulf of California, Mex. in: (ed) Bjorge, A. and G.Donovan. Special Issue 16. *Int'l. Whal. Comm. (IWC)* Cambridge, UK
- Gotteli,D., C. Sillero-Zubiri, G.D. Appelbaum, M.S. Roy, D.J. Girman, J. Garcia-Moreno, E.A. Ostrander, and R.K Wayne. 1994. Molecular Genetics of the most endangered canid: the *Ethiopian wolf, Canis simensis*. *Molec. Ecol.* 3:301-312.
- Guevara-Escamilla, S. et al. 1973. Biología. En: Estudio Químico sobre la Contaminación por Insecticidas en la Desembocadura del Río Colorado. Tomo II, Reporte Final a la Dirección de Acuacultura de la Secretaría de Recursos Hidráulicos. UABC., Ensenada, BC., Mex.: 235-264.
- Harrison,G;.H. 1989. Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population Evolutionary Biology. *TREE.* 4:6-11
- Hillis, D.M y C. Moritz (ed). 1990. *Molecular Systematics*. Simauer Associates, Inc. Pub. Sunderlarid, Mass., USA 588 pp

Hoelzel, A.R., J. Halley, S.J. O'Brien, C. Campagna, T. Ambom, B. LeBoeuf, K. Ralls and G.A. Dover. 1993. Elephant Sea; Genetic Variation and the Use of Simulation Models to Investigate Historical Population Bottlenecks. *J. Heredity*. 84:443-9.

Hohn, A.A., A.J. Read, S. Fernandez, O. Vidal and L.T. Findley. 1996. *J. Zool., Lond.* 239:235-251.

Kimura, N. and T. Ohta. 1971. *Theoretical aspects of population genetics*. Princeton Univ. Press. Princeton, NJ. USA.

- Lande, R. 1991. Genetics and Conservation of Whales. Reports of the Intl. Whal. Comm. Special Issue 13.
- Lande, R. 1988. Genetics and Demography in Biological Conservation. *Science* 241:1455-1460.
- Moritz, C. 1994. Applications of mtDNA analysis in conservation: a critical review. *Mol. Ecol.* 3:401-11.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, USA.
- Norris, K. S. y W.N.Mc. Farland. 1958. A new harbor porpoise of the Genus *Phocoena* from the Gulf of California and Mexican Waters. Univ. California Press, *Publ. Zool.* 63 (4):291-40
- Nunney, L. 1991. The influence of age structure and fecundity on effective population size. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 246:71-6.
- Nunney, L. 1993. The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution* 47:1329-41.
- Pope, T.R. 1996. Socioecology, population fragmentation, and patterns of genetic loss in endangered primates. In: Avise, J. C. and J. L. Hamrick (eds.) *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall. New York. pp 119-152.
- Ralls, K.K. and J. Ballou. 1983. Extinctions: Lessons from Zoos. In: Schonewald-Cox, C.M. *et al* (ed) *Genetics and Conservation. A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations*. The Benjamin Cummings Publishing Company. Menlo Park, CA., USA. pp xvii-xx. pp 164-183.
- Rosel, P.E., M.G. Haygood, and W.F. Perrin. 1995. Phylogenetic Relationship among the True Porpoises (Cetacea:Phocoenidae). *Mol. Phyl. Evol.* 4:463-474.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, 2nd. Ed. 3 vols. Cold Spring Harbour, NY. USA.
- Schaeff, M., S.D. Kraus, M.W. Brown, and B.N. White. 1993. Assessment of the population structure of the Western North Atlantic right whales (*E. glacialis*) based on sightings and mtDNA data. *Can. J. Zool.* 71:339-45
- Schlotterer, C. and D. Tautz. 1993. Slippage Synthesis of Microsatellites. *Nuci. Ac. Res.* 20:2111-115.
- Schlotterer, C., W. Amos, D. Tautz. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*. 354:63-65
- Scribner, K.T., J.W. Amstutz, and Terry Burke. 1994. Comparative Analysis of Intra and Interpopulation Genetic Diversity in *Bufo bufo*, using Allozyme, Single-Locus Microsatellite, Multilocus Minisatellite Data. *Mol. Biol. Evol.* 11(5):737-748.
- Shriver, N.D., L. Jin., R. Chakraborty and Boerwinkle. 1993. VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model. *Genetics* 134:983-993.
- Silber, G.K. 1990. Occurrence and distribution of the vaquita *Phocoena sinus* in the northern Gulf of California. *Fish. Bull.* 88(2):339-345.
- Silber, G.K. and K.S. Norris. 1991. Geographical and seasonal distribution of the vaquita, *Phocoena sinus*. *Anales. Inst. Biol. UNAM, Ser. Zool.* 62(2):263-268.
- Slatkin, N.L. 1995. A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics* 139:457-462
- Valdes, A.M., M. Slatkin, N.B. Freimer. 1993. Allele Frequencies at Microsatellite Loci: The Stepwise Model Revisited. *Genetics*. 133:737-749.

- Valsecch , E. and W. Amos. 1996. Microsatellite markers for the study of cetaceans populations. *Mol. Ecol.* 5:151-156.
- Vidal,O. '95 Population Biology and explotation of the *vaquita Phocoena sinos*. in: (ed) Bjorge, A. and G. Donovan. Special Issue 16. int'l. Whal. Comm. (IWC) Cambridge, UK
- Villa-Rarr irez, B. 1993. Recovery Plan for the Vaquita, *Phocoena sinos*. No publicado, 36pp.
- Weber, J. L., and P. E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed usin the polymerasa chaira reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44:388-396.
- Wright, S3. 1969. Evolution and the genetics of populations, vol. 2: The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Zeichel, 6. 1969. Primary productivity in the Gulf of California. *Mar. Biol.* 3 (3):201-207.

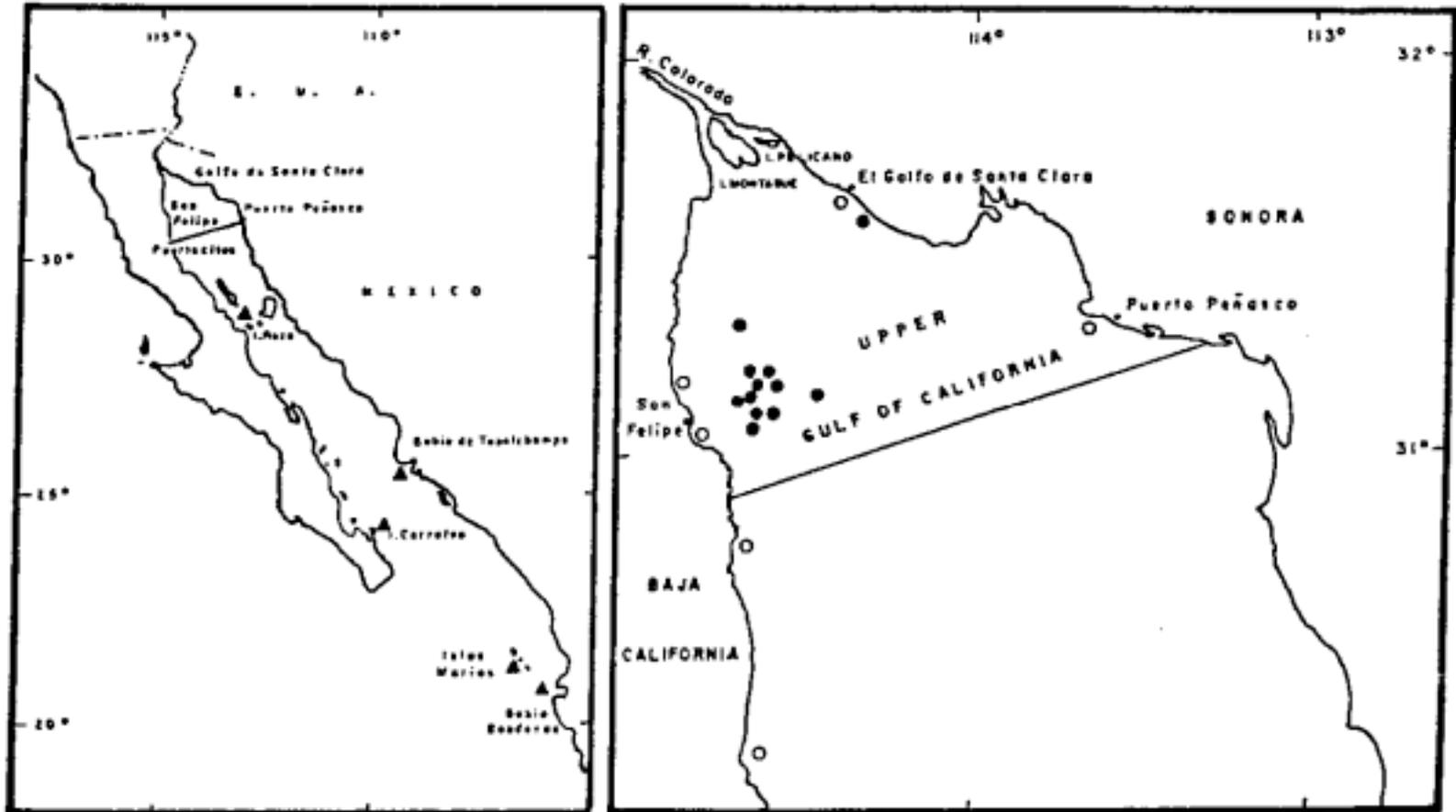


Fig 1. Área de distribución de la vaquita *Phocoena sinus* en círculos negros indican los avistamientos y los blancos los animales recuperados en redes agalleras. Los triángulos señalan registros no confirmados.

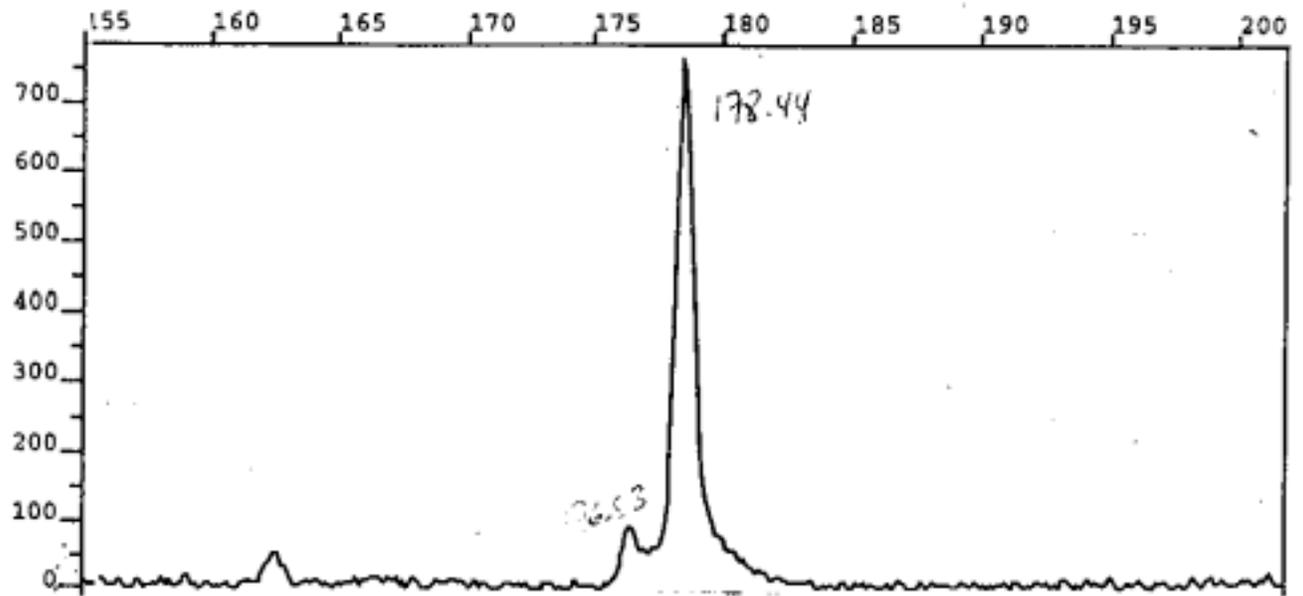


Fig. 2. Cromatograma del locus monomórfico de 178 pb detectado por medio del cebador EV3V.

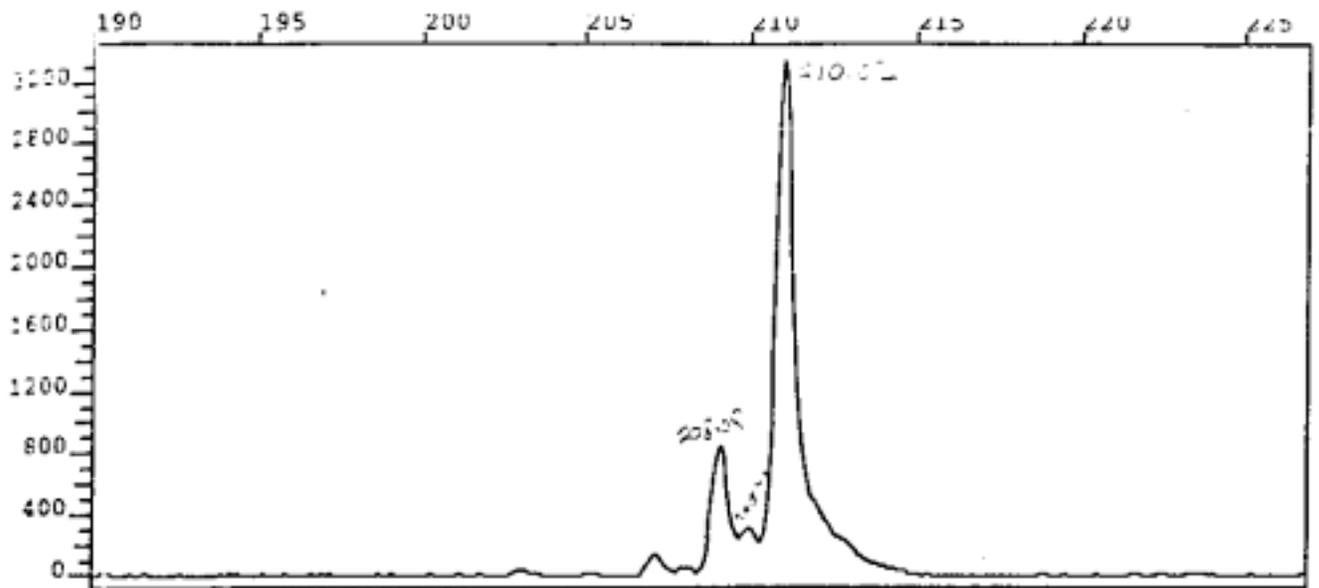


Fig. 2b. Cromatograma del locus monomórfico de 210 pb detectado por medio del cebador EV94

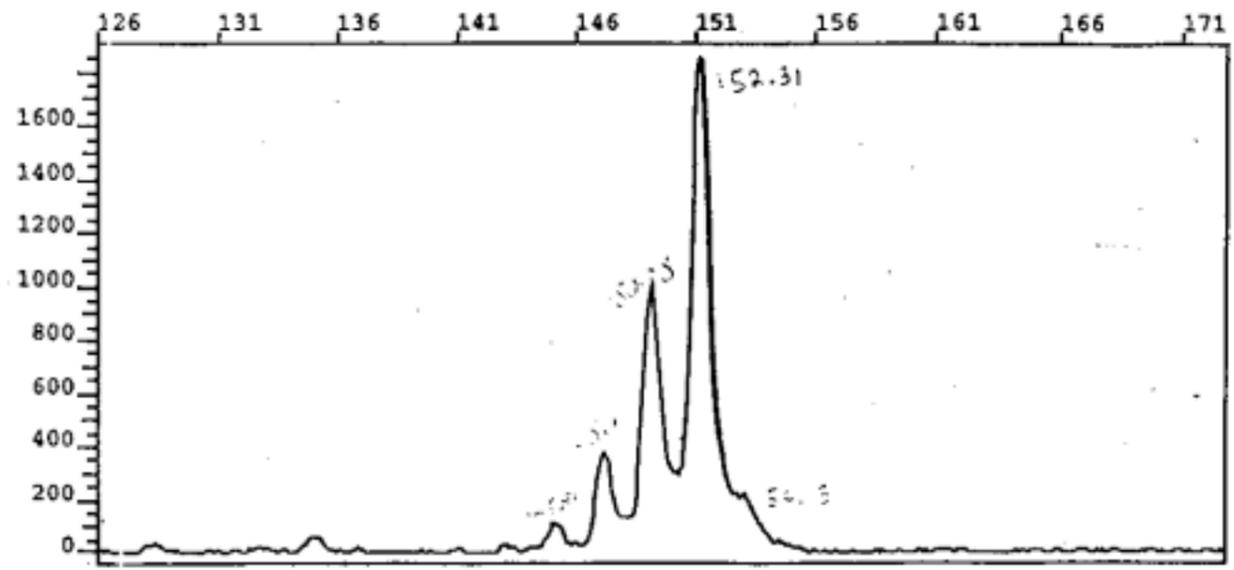


Fig. 2c. Cromatograma del locus monomorfo de 152 pb detectado por medio del cebador EV104

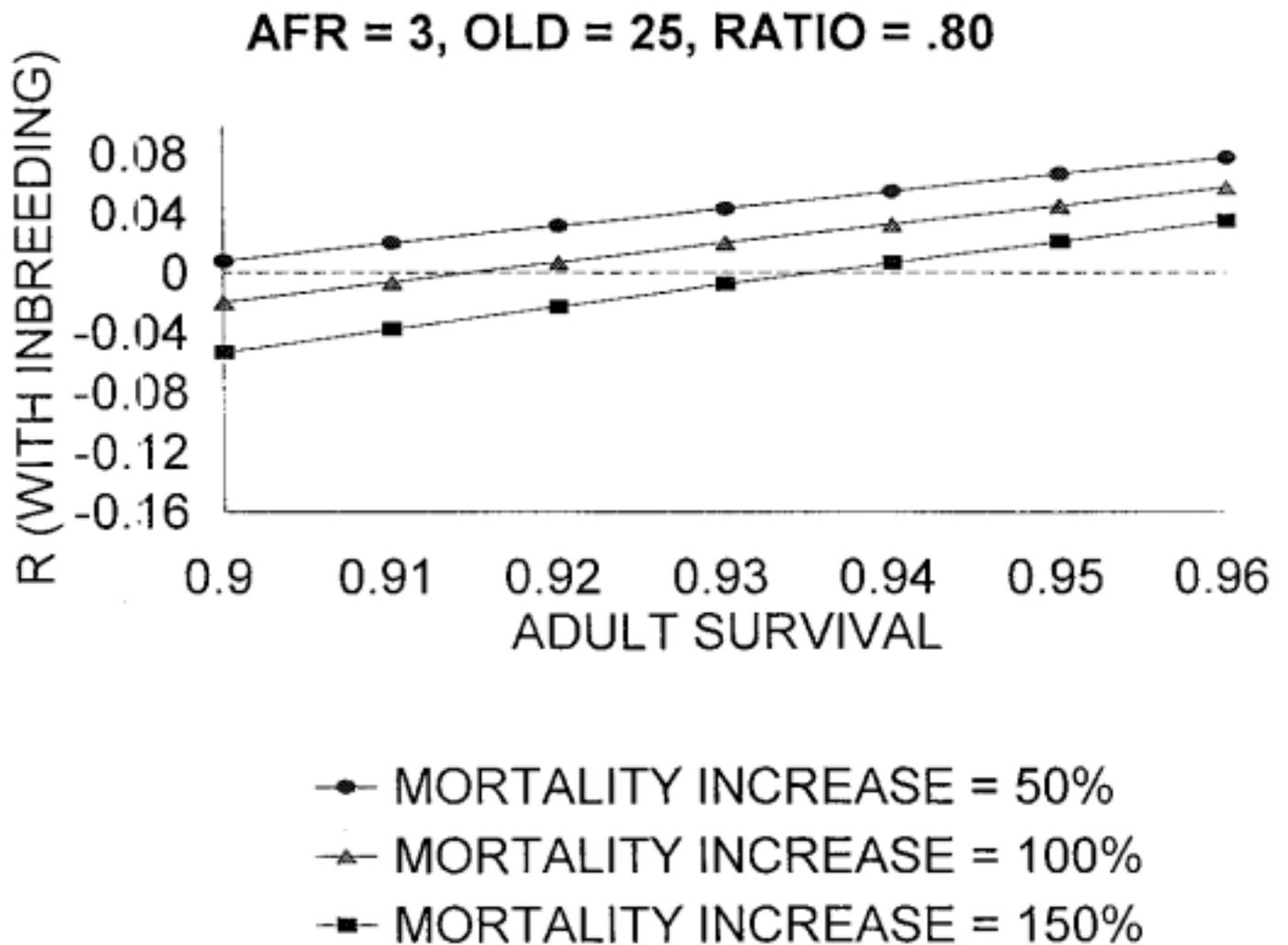


Fig 3a. TASA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL CON DIFERENTES NIVELES DE MORTALIDAD POR ENDOGAMIA AFR (EDAD DE LA PRIMERA REPRODUCCIÓN)= 3 AÑOS, EDAD MÁXIMA 25 AÑOS Y RAZÓN DE LA SOBREVIVENCIA AL PRIMER AÑO ENTRE LA SOBREVIVENCIA DEL ADULTO (SPA/SA) 0.80

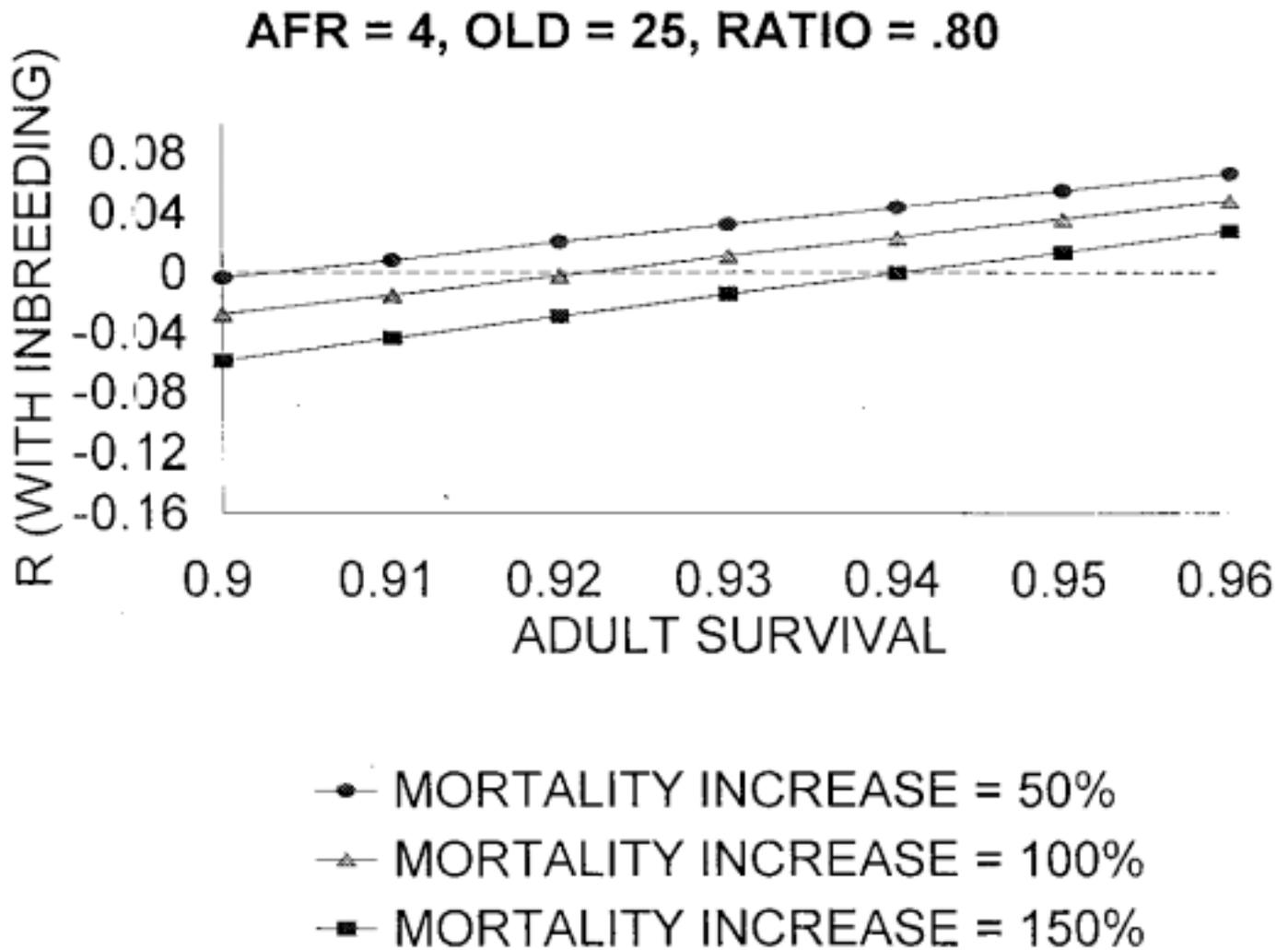


Fig 3b. Tasa de crecimiento poblacional con diferentes niveles de mortalidad por endogamia AFR (Edad de la primera reproducción) = 4 años edad máxima 25 años y razón de la sobrevivencia al primer año entre la sobrevivencia de adulto (s_{pa}/s_a) - 0.8

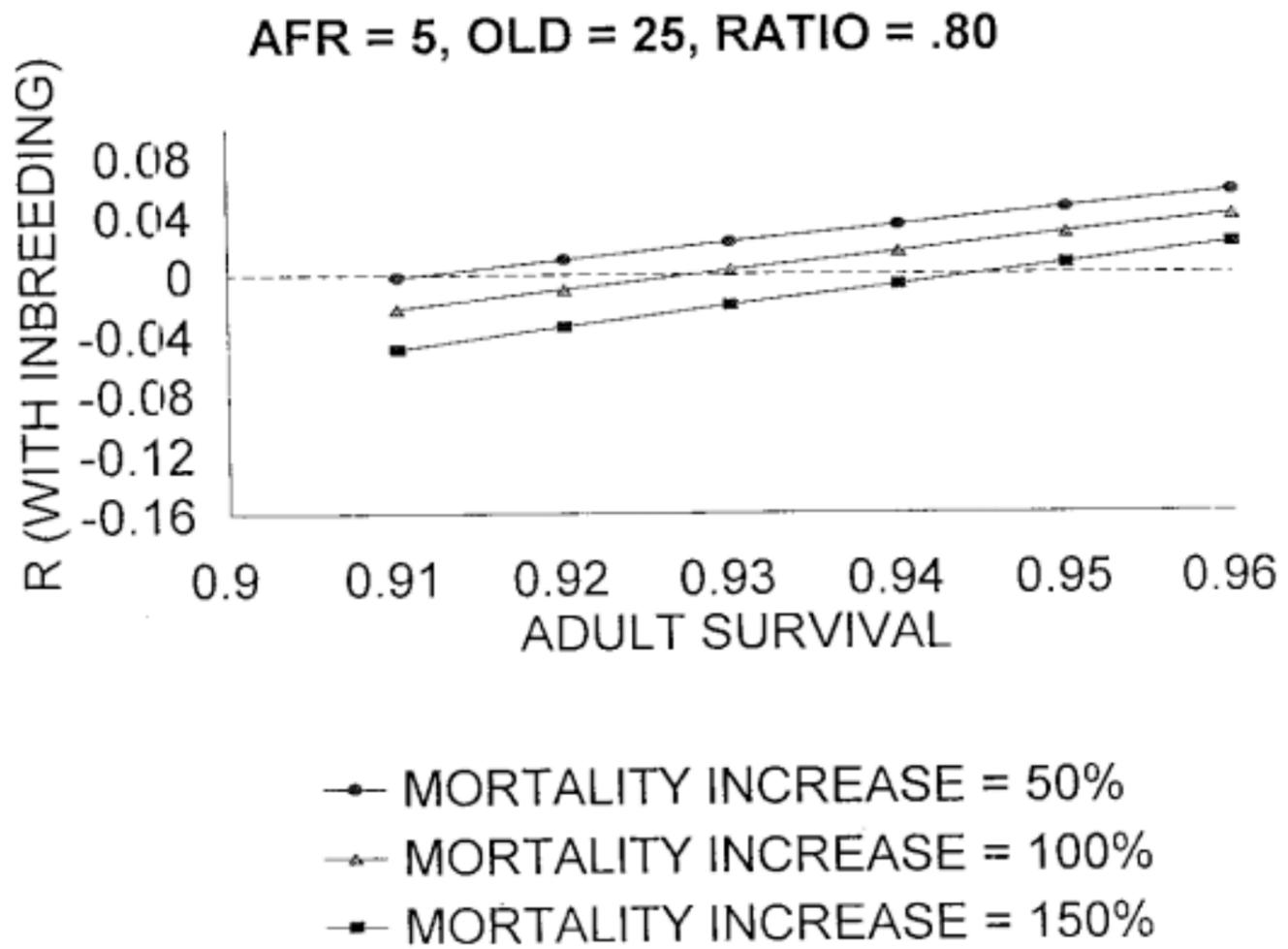


Fig 3c. Tasa de crecimiento poblacional con diferentes niveles de mortalidad por endogamia AFR (Edad de la primera reproducción) = 5 años, edad máxima 25 años y razón de la sobrevivencia al primer año entre la sobrevivencia de adulto (s_{pa}/s_a) = 0.80

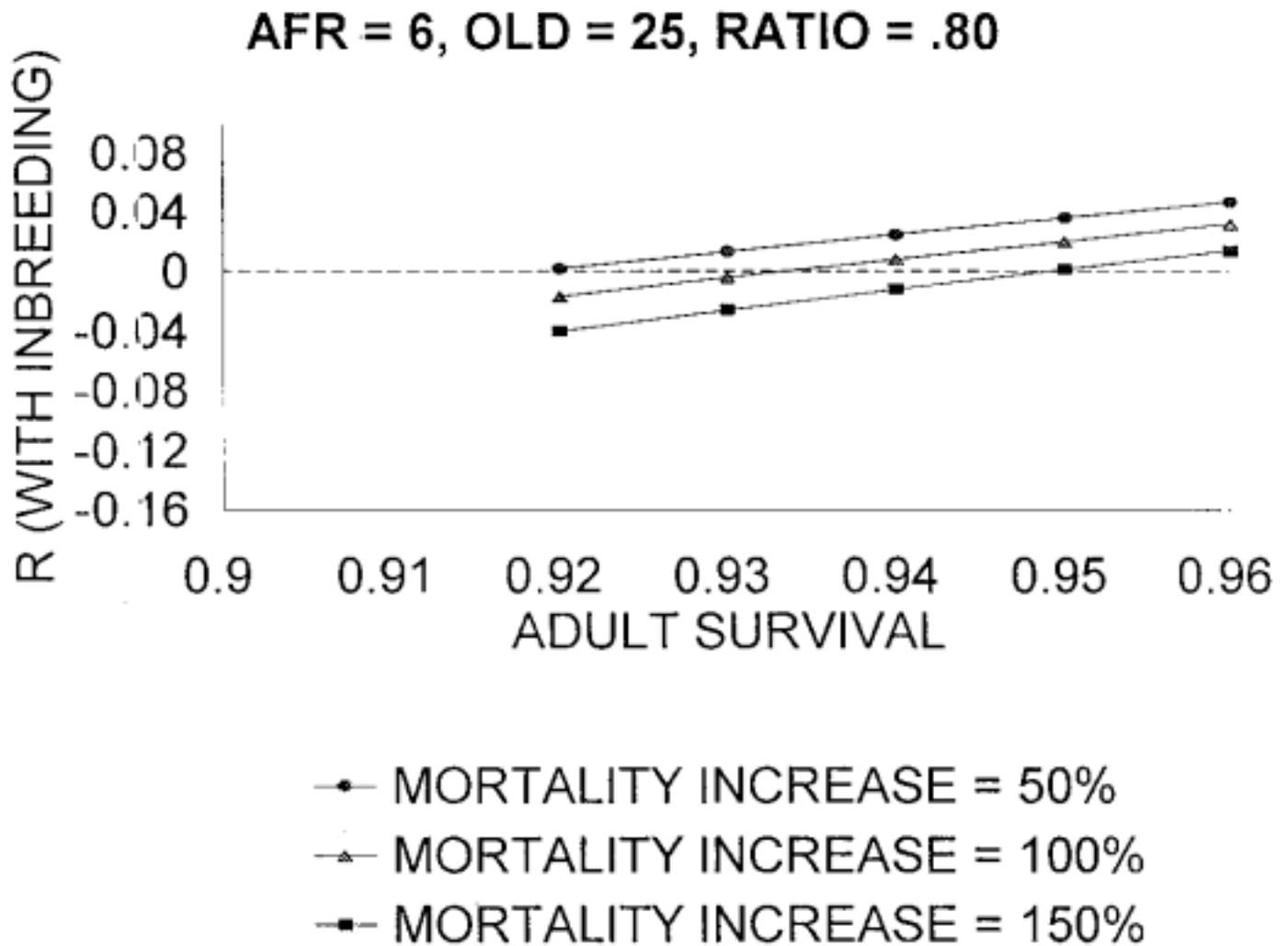


Fig 3d. Tasa de crecimiento poblacional con diferentes niveles de mortalidad por endogamia AFR (edad de la primera reproducción) = 6 años, edad máxima 25 años y razón de la sobrevivencia al primer año entre la sobrevivencia del adulto (spa/sa) = 0.80

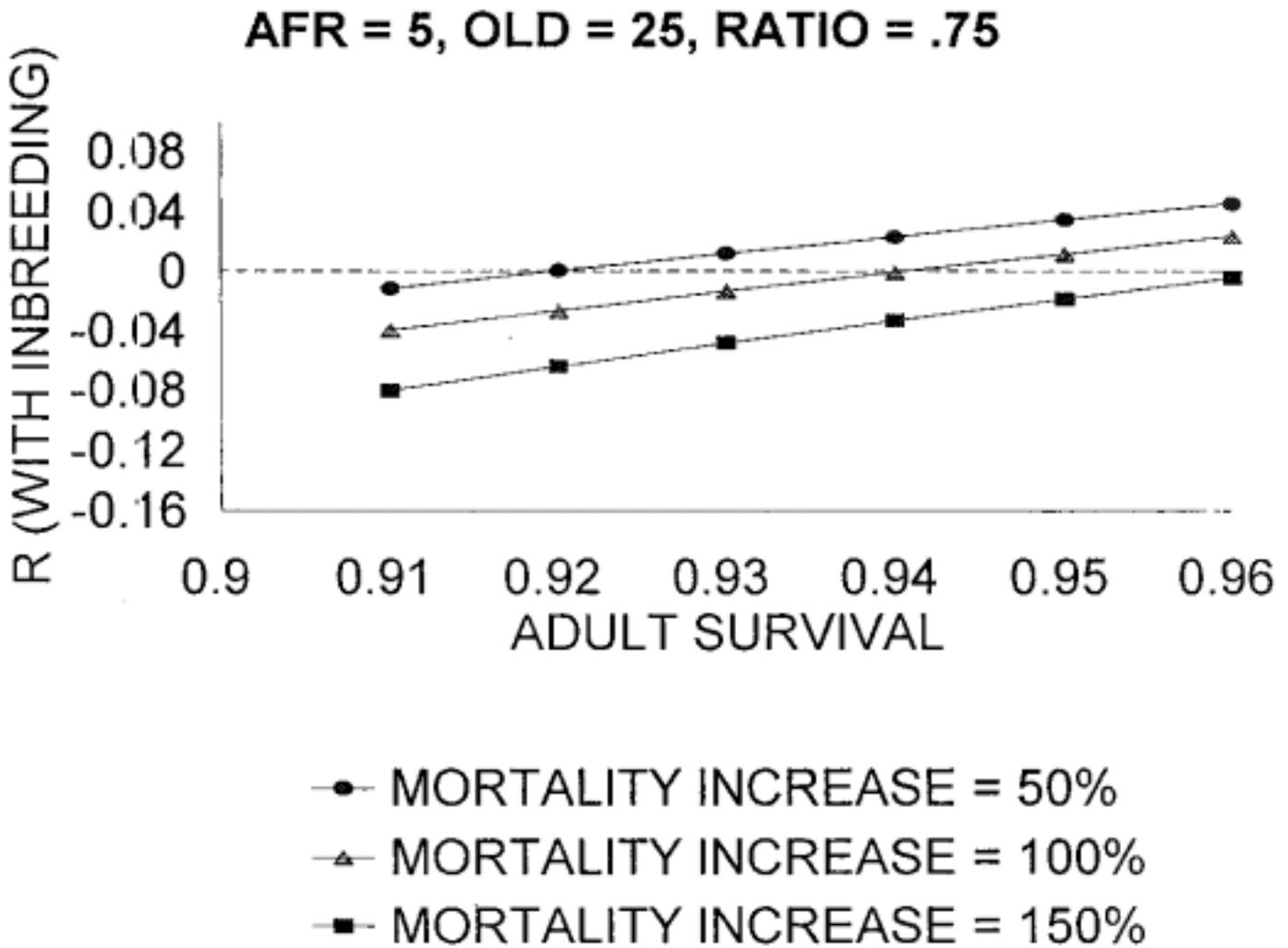


Fig 4a. Efecto de la depresión endogámica para diferentes razones (spa/sa) AFR (Edad de la primera reproducción) = 5 años, edad máxima 25 años y razón de la sobrevivencia al primer año entre la sobrevivencia de adulto (spa/sa) 0.75. con este valor la tolerancia a la depresión endogámica es muy baja

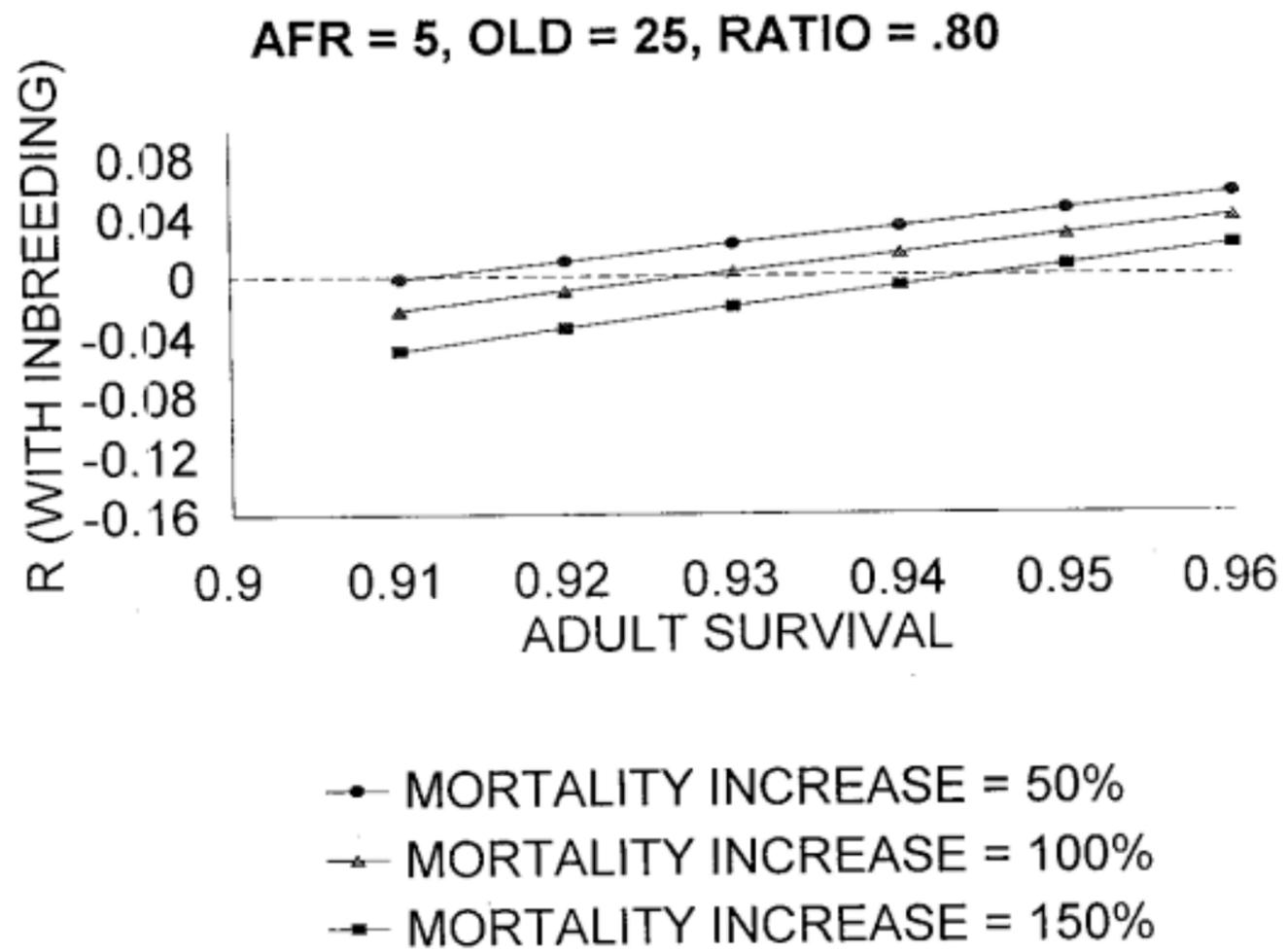


Fig 4b. Efecto de la depresión endogámica pra diferentes razones (spa/sa). AFR (edad de la primera reproducción) = 5 años, edad máxima 25 años y razón de la sobrevivencia al primer año entre la sobrevivencia de adulto (spa/sa) ' 0.80. Notar a partir de este valor el incremento de la sobrevivencia.

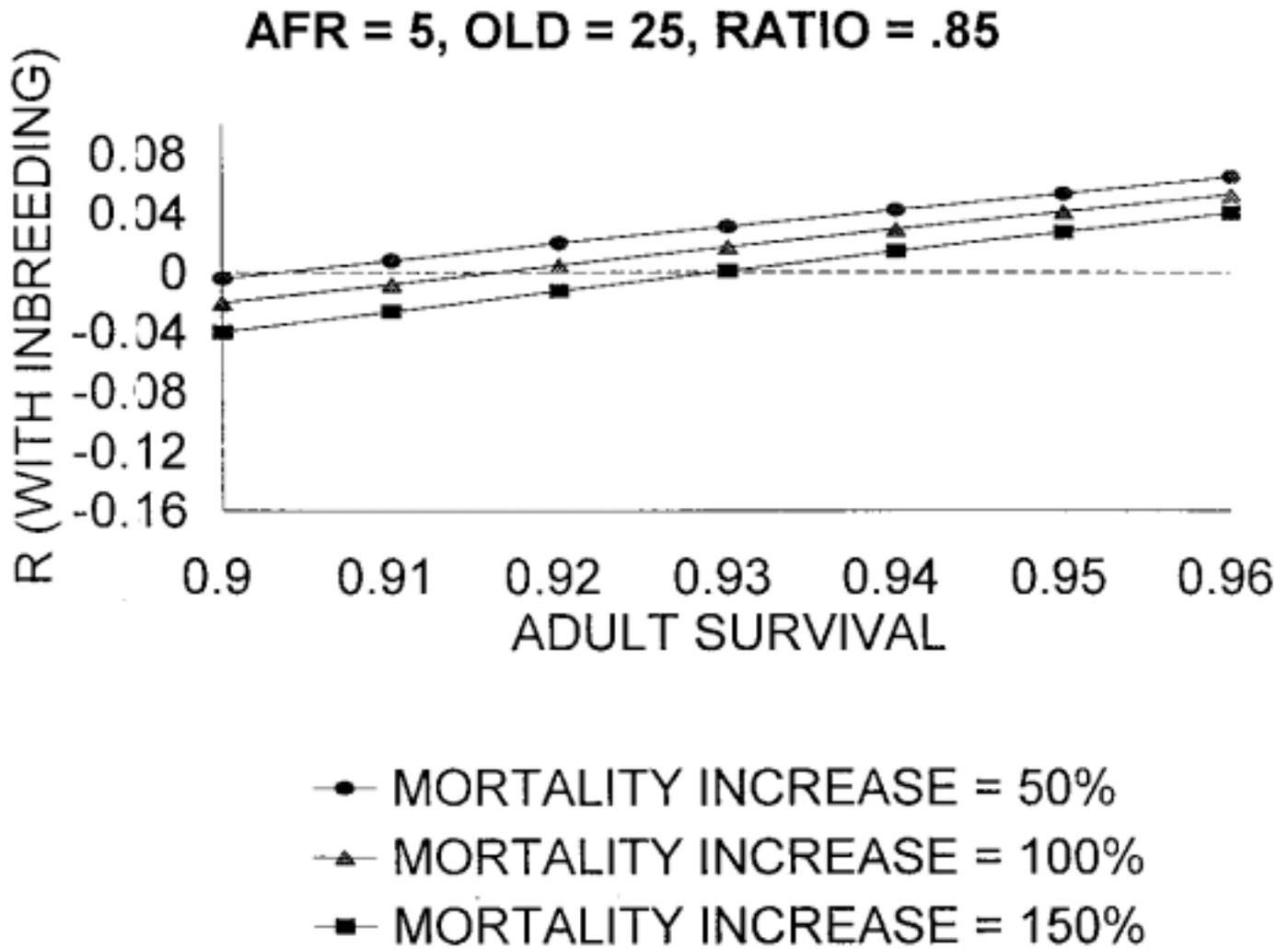


Fig 4c. Efecto de la depresión endogámica para diferentes razones (spa/sa). AFR (edad de la primera reproducción) = 5 años, edad máxima 25 años y razón de la sobrevivencia al primer año entre la sobrevivencia de adulto (spa/sa) = 0.85