

INFORME FINAL

Título del Proyecto: “Estructura poblacional y evaluación clínica del delfín tonina (*Tursiops truncatus*) en el archipiélago Sabana-Camagüey”.

Código: DB-014

Programa Ramal: “Diversidad Biológica”

Clasificación: Aplicado.

Institución cabecera: Acuario Nacional de Cuba

Nombres y apellidos del Investigador Principal: MC Nirka López León

ANTECEDENTES DE LA TEMÁTICA

Los delfines *Tursiops truncatus* constituyen la especie mejor conocida de todos los cetáceos. Su distribución es cosmopolita y han demostrado una gran extensión de variación geográfica en su morfología (Wells y Scott, 2002). Muchos libros para audiencias científicas y públicas se han centrado en esta especie (Caldwell y Caldwell, 1972; Leatherwood y Reeves, 1990; Reynolds *et al.*, 2000) y también un número de artículos que constituyen revisiones integrales han sido publicados (Leatherwood y Reeves, 1982; Shane *et al.*, 1986; Wells y Scott, 1999), representando una consulta obligada para el conocimiento integral de la especie.

Los estudios longitudinales de *Tursiops truncatus* en el medio natural comenzaron en los años 70 (Irvine y Wells, 1972; Würsig y Würsig, 1977, 1978; Wells *et al.*, 1980; Irvine *et al.*, 1981). Anterior a estos estudios los registros de campo estuvieron limitados a descripciones generales de la actividad y el tamaño de los grupos (Caldwell, 1955; Norris y Prescott, 1961), o acontecimientos específicos de observaciones inusuales (Hoese, 1971).

La mayoría de las investigaciones en la especie *T. truncatus*, se han concentrado en el morfotipo costero, en hábitats estuarinos y bahías (Wells, 1991). Sin embargo, este morfotipo también se ha estudiado en zonas costeras expuestas, principalmente en el hemisferio norte, donde se ha detectado que suelen tener extensas áreas de distribución y patrones estacionales de residencia local (Defran y Weller, 1999).

Un número de estudios alrededor del mundo (Estados Unidos, Escocia, Argentina y Australia) han demostrado que los delfines pueden ser residentes estacionales, o durante todo el año en áreas costeras particulares (Wells *et al.*, 1999a). En algunos casos puede ser muy difícil de comprender lo que constituye el rango de hábitat para un grupo de delfines. Parte del problema está dado porque no todas las comunidades de delfines son tan estacionarias o estables como la de Sarasota Bay (Wells, 1991). Los patrones de residencia estacional observados en algunas localidades, como las costas de Carolina (Hohn, 1997), significan que un rango de hábitat efectivo, o múltiples rangos de hábitat, ligados por corredores, pueden abarcar de decenas a cientos de kilómetros de línea costera (Caldwell y Caldwell, 1972 y Reynolds *et al.*, 2000). En tales casos, la colaboración entre diferentes grupos de investigación puede complementarse para comprender qué hacen y cuanto se mueven los delfines en su medio natural.

Según Reynolds *et al.* (2000), las sociedades de delfines, debido a su categoría de fisión-fusión, se caracterizan por asociaciones fluidas a largo plazo y repetidas, más que constantes en el tiempo. Este sistema social, por supuesto, no es desconocido en los primates, tales como los chimpancés y los humanos, en los que la mayor parte del día es dedicada a interactuar y reforzar relaciones de varios tipos con una variedad de individuos. La estructura social de diferentes poblaciones de toninas puede ser muy diversa, como resultado de la amplia diversidad de ambientes que ocupan. Una elevada diversidad social dentro de un grupo de mamíferos estrechamente relacionados, ha sido atribuida primariamente a las diferencias en los recursos alimentarios, las presiones de depredación y las características físicas del ambiente.

Los estudios de población y estimaciones de abundancia realizados con la especie *T. truncatus*, así como la caracterización genética que estructuran estas poblaciones son sumamente importantes para establecer planes de manejo y cuotas de captura, y son cada vez más comunes debido a su importancia intrínseca principalmente por ser la especie con más demanda de captura para exhibición en todo el mundo (Álvarez *et al.*, 1995; Ortega, 1996; Carretta *et al.*, 1998; Cortez *et al.*, 1998; Barco *et al.* 1999). Este tipo de estudios se han realizado también en otras especies como el delfín de río del Amazonas, *Sotalia fluviatilis* (Pizzorno *et al.*, 1998), Vaquita, *Phocoena sinus* (Rojas *et al.*, 2000), grandes cetáceos como la ballena azul *Balaenoptera musculus* (Gendron, 2000), e incluso varias especies de cetáceos al mismo tiempo en el Pacífico Este Tropical (Wade y Gerrodette, 1993), siendo estos últimos un buen ejemplo del interés que existe por hacer estudios de este tipo en todas las especies de cetáceos conocidas, aún aquellas que no son sujetas a explotación.

Los estudios de genética poblacional y el surgimiento de nuevas técnicas de biología molecular en los últimos 20 años han permitido identificar unidades de conservación sobre la base del conocimiento de la estructura genética de las poblaciones y su dinámica (ej. Frankham *et al.*, 2002). La estructura poblacional de las especies marinas está determinada por factores tales como las corrientes marinas, la topografía de los fondos marinos, la temperatura del agua, la historia de vida y el comportamiento (ej.: Block *et al.*, 2001; Bekkevold *et al.*, 2005; Bowen *et al.*, 2005; Stevick *et al.*, 2006; Fontaine *et al.*, 2007); no obstante, las barreras al flujo genético son difíciles de predecir en los ambientes marinos. Esto resulta particularmente interesante en especies de delfines, y cetáceos en general, que pueden realizar grandes migraciones oceánicas y habitar una gran variedad de hábitats costeros y oceánicos en aguas tropicales y templadas (Martin y Reeves, 2002).

En sentido general los resultados de los estudios sobre estructuración poblacional en mamíferos marinos son heterogéneos, muchos son los autores que encuentran mediante el empleo de marcadores moleculares nucleares y mitocondriales altos niveles de estructuración genética entre las poblaciones en estudio, incluso entre aquellas que se encuentran a poca distancia geográfica unas de otras (ej. Natoli *et al.*, 2004; Islas-Villanueva, 2005; Ezcorza-Treviño *et al.*, 2000; Parsons *et al.*, 2002; Natoli *et al.*, 2005). Sin embargo otros investigadores como Quérouil *et al.*, (2007) cuando analizan poblaciones costeras y pelágicas de regiones geográficamente distantes, no encuentran estructuración genética significativa entre ninguna de ellas.

Se sabe que el sonido en los mamíferos marinos es importante para la comunicación, el reconocimiento individual, la evitación de los depredadores, captura de las presas, orientación navegación, selección de la pareja y para las relaciones madre-cría (Hill, 2003). Dentro de los efectos negativos de la contaminación acústica sobre este grupo de animales se hallan daños

físicos, disfunciones fisiológicas como la pérdida temporal o permanente de la audición, modificaciones en la conducta y desorientación debido al ruido ambiente. Desde el punto de vista individual, las consecuencias pueden ser desde casi indetectables hasta fatales (Carter *et al.*, 2009). Para poder entender estos cambios y posibles consecuencias primero hace falta estudiar las características del complejo sistema acústico de las especies.

Se han realizado estudios sobre el tema en diferentes partes del mundo. Se destacan dentro de los primeros, los aportes de Sayigh *et al.* 1990 sobre la comunicación madre-cría en el delfín mular en la Bahía de Sarasota. Estudios similares y otros que incluyen el análisis de la capacidad auditiva de la especie, han continuado en la misma área por más de 20 años (Hill, 2003; Cook, 2005; Carter *et al.* 2009). Otros estudios describen las propiedades de las emisiones acústicas de esta y de otras especies, incluyendo análisis de la variación de las emisiones con la variación geográfica (Jones y Sayigh, 2002; Oswald *et al.*, 2003; Oswald *et al.*, 2008). Los estudios acústicos de cetáceos se han realizado en todos los mares del mundo (Zbinden, 1986; Cokeron y Van Parijs, 2001).

La evaluación del estado de salud de las poblaciones naturales no solo permite tener conocimiento de las principales patologías que afectan a los delfines, sino que constituye un indicador de la degradación del hábitat debido a cambios antropogénicos (Scott *et al.* 1990). Wells *et al.* (2004) sugieren la implementación en otras áreas de un sistema de evaluación de salud integrado, basado en parámetros hematológicos de las poblaciones de Sarasota Bay, Florida.

Un aspecto importante, indicador del estado de salud de las poblaciones naturales es la estructura etaria. En el caso de los cetáceos, la edad puede determinarse en el monitoreo durante toda la vida del animal o basado en tejidos que manifiestan grupos de capas de crecimiento. Los tejidos duros de origen epidérmico, especialmente los dientes que poseen deposición de capas de crecimiento en la dentina y el cemento; además la mandíbula y los huesos del oído interno son materiales ampliamente utilizados para la determinación de la edad (Perrin and Myrick, 1980). La validez de estos métodos ha sido probada en animales de historia de vida conocida, tomando como referencia otros métodos como reportes de ovulación/gestación en las hembras y la aplicación de antibióticos como la tetraciclina que provoca marcas permanentes en tejidos duros. Se han dado muestras de la importancia del uso de las capas de crecimiento en estos tejidos para la detección de eventos en la historia de vida de los animales como el destete, maduración sexual, partos y posibles episodios de empobrecimiento nutricional y estrés ambiental (Manzanilla, 1989; Lockyer, 1993)

Los estudios de los delfines *Tursiops truncatus* en el medio natural, comenzaron en Cuba, de forma preliminar, en el año 1983, con una caracterización morfométrica de la especie (Blanco y Olaechea, 1997) donde se encontró diferencias morfométricas entre los delfines que habitan en Varadero, Isabela de Sagua y Caibarién, regiones pertenecientes al archipiélago Sabana-Camagüey. Guevara *et al.* 2003 realizó un estudio sobre los hallazgos patológicos y microbiológicos en delfines *Tursiops truncatus* procedentes del archipiélago en vida libre y cautiverio. En este trabajo se concluyó que para las poblaciones de delfines que habitan el área de estudio las patologías que con mayor frecuencia inciden son las respiratorias y las digestivas.

En Cuba, la primera aproximación al conocimiento ecológico de las poblaciones del delfín *Tursiops truncatus* se realizó por Ziane-Cherif (1995), a través de una recopilación de

testimonios sobre avistamientos en el Archipiélago Sabana-Camagüey y por Pérez-Cao (1996), con un estudio preliminar sobre variabilidad genética entre el Archipiélago Sabana-Camagüey y el Golfo de Guacanayabo, que arrojó como resultado fundamental que existe un cierto grado de diferenciación entre las dos poblaciones. Entre 1998 y 1999, se realizó un estudio prospectivo al área de Cayo Coco, que derivó un informe y en el año 2000 se llevó a cabo un estudio más abarcador y consistente en esta misma área, (Cortez *et al.*, 2000), en este estudio no se pudo encontrar una población residente en el área y el valor de densidad obtenido fue 0.18 individuos/Km². Gran parte de los resultados han sido presentados en las XXV y XXVI Reuniones Internacionales para el Estudio de los Mamíferos Marinos, SOMEMMA, 2000 y SOMEMMA, 2001, en México, así como en el V Congreso Internacional de Ciencias del Mar, celebrado en el 2000.

Desde Junio del 2002 hasta Agosto del 2003 se realizó un trabajo similar pero en la región más occidental del archipiélago, que corresponde a la costa Norte de Matanzas. Los resultados obtenidos fueron entregados al proyecto GEF/PNUD CUB/G32 “Acciones prioritarias para consolidar la biodiversidad en el Ecosistema Sabana-Camagüey” como el cumplimiento de uno de sus objetivos. En este estudio el valor de densidad calculada para el área fue de 1.28 individuos/Km². Por otra parte, éstos fueron presentados en calidad de ponencia en el VI Congreso de Ciencias del Mar bajo el título de Distribución y abundancia de delfines Tonina *Tursiops truncatus* en la costa norte de Matanzas (Pérez-Cao *et. al.*, 2003), celebrado en Ciudad de la Habana del 2 al 5 de diciembre del 2003. Fue impartida una Conferencia Magistral sobre el tema en la 32 Reunión de la Sociedad Europea de Mamíferos Marinos, que recibió un reconocimiento por parte de dicha Asociación en Valencia, España en Marzo de este año. Pérez-Cao en el 2004 defendió su tesis de maestría en el Centro de Investigaciones Marinas de la Universidad de la Habana titulada “*Abundancia y distribución de la tonina Tursiops truncatus (Montagu, 1821) en dos áreas del archipiélago Sabana-Camagüey, Cuba*”. En esta tesis se realiza un análisis comparativo de los resultados obtenidos en los estudios realizados en el área de Matanzas y Cayo Coco.

A partir de la continuación del estudio en el área de Matanzas aplicando la técnica de fotoidentificación principalmente y la técnica de marcaje y recaptura se estimó el tamaño poblacional entre 100 y 200 delfines para un área efectiva de 140 Km². Estos resultados se presentaron en el VII evento Internacional de Ciencias del Mar celebrado en diciembre del 2006 en Ciudad de La Habana. Estos resultados fueron parte de una tesis de maestría en el año 2007 presentada bajo el título de: Estructura poblacional de delfines *Tursiops truncatus* en la costa norte de la provincia de matanzas, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Muestreo a distancia y fotoidentificación

El estudio se desarrolló en la porción más occidental del archipiélago de Sabana - Camagüey, desde la península de Hicacos hasta el cayo Cruz del Padre, en la provincia de Matanzas, entre los 23° 06´ - 23° 18´ N, y 81° 18´ - 80° 52´ W (Fig. 1). El área fue escogida para implementar en ella un estudio a largo plazo debido a que se contaba con una base de datos de los delfines presentes en la misma desde el año 2002. En esta área los fondos marinos son del tipo arenoso-fangoso y fango-arenoso y predominan los pastos. En las lagunas interiores la elevada salinidad está por encima de las 35 ‰ y los ambientes se consideran de mesotróficos a eutróficos. El agua de la plataforma exterior se caracteriza por la oligotrofia y un predominio del transporte de partículas, la salinidad muestra valores mantenidos en unos 35-36 ‰. La profundidad del agua en las zonas recorridas varía entre los 2 y 30 m. Para una mejor evaluación

de la distribución espacial de la población se dividió el área de estudio en dos regiones: Costa Norte (CN) y Bahía de Cárdenas (BC), que difieren en sus características oceanográficas (Fig.1), al ser esta última una zona interior de una bahía de circulación más restringida, mientras que la primera zona está directamente sometida al efecto de las corrientes más oceánicas.

Entre los años 2007 y 2010 se efectuaron 22 salidas de campo al área de estudio, de seis días como promedio. Se utilizaron embarcaciones de poco calado, y se navegó a una velocidad menor a 18 km/h (9,7 nudos). Los censos se realizaron en recorridos lineales dispuestos al azar según lo dispuesto por la técnica de muestreo a distancia (Buckland *et al.*, 1993). Los delfines fueron buscados con binoculares (7-15 x 35 CF y 10 x 42 DCF HP) o a simple vista por cuatro personas simultáneamente. Todos los muestreos fueron llevados a cabo con el mar en estado 3 en la escala de Beaufort (o menor, con velocidad del viento menor de 5,6 m/s).

En cada encuentro con delfines (avistamiento) se anotó la ubicación geográfica (GPS, Magellan, ± 30 m de precisión). Para definir los grupos se consideró a todos aquellos delfines, en asociación aparente, moviéndose en la misma dirección y usualmente inmersos en la misma actividad (Shane, 1990a). Las crías fueron diferenciadas de los adultos al tener tallas iguales o menores a dos tercios de la talla del adulto acompañante. Para la diferenciación de los neonatos se tuvo en cuenta la presencia de surcos fetales y en caso de que éstos no fueran visibles, se consideró al menos tres de las siguientes características: la aleta dorsal flácida, la coloración muy oscura, talla menor de la mitad del adulto acompañante o una natación superficial desordenada con flotabilidad extrema (Barco *et al.*, 1999; Defran y Weller, 1999).

Para el análisis de los resultados se tuvo en cuenta la base de datos desde el año 2002 hasta el 2009 de los delfines del área.

El número de delfines y avistamientos por cada 100 km recorridos se comparó entre regiones y temporada climática. Los valores de densidad de delfines fueron estimados multiplicando el número de animales durante los recorridos por un ancho de banda fijo de 0,2 km que constituyó la distancia en la que ocurrió el 80 % de los avistamientos.

Para la fotoidentificación se utilizaron tres cámaras Nikon FM-100, con motor y objetivo de 70 - 300 mm, películas fotográficas de diapositivas Ektachrome 100 ASA durante las salidas 2002-2003. En las expediciones del período 2005-2008 se sustituyeron las películas por negativos Kodacolor 100 ASA. En las expediciones realizadas durante el 2008-2009 se emplearon cámaras digitales Nikon D-200. En dependencia del tamaño del grupo de delfines, en la toma de fotografías participaron entre dos y tres personas.

El análisis de las imágenes obtenidas siguió la técnica descrita por Wells *et al.* (1996). Se depuró el material fotográfico y se conservaron sólo las fotografías nítidas. Las diapositivas fueron digitalizadas en un Scanner HP a una resolución de 1 200 dpi y se eliminaron los bordes sobrantes de las imágenes alrededor de las aletas. Estas fueron clasificadas según la codificación propuesta por Wells *et al.* (1996) y comparadas individualmente. Las aletas que coincidían en el número y ubicación de las marcas se superponían en capas semitransparentes en Adobe Photoshop, versión 8.0, para corroborar su identidad.

Para determinar el grado de residencia de los delfines identificados y reavistados en el área, se clasificaron los animales según la frecuencia de reavistamientos entre salidas y años diferentes y además se incluyó los delfines fotoidentificados durante los dos últimos muestreos en el año

2010. Los delfines que en el período estudiado fueron observados por única vez se catalogaron como transeúntes y los delfines reavistados al menos en tres ocasiones y observados al menos cinco veces se denominaron residentes temporales o estacionales.

Para realizar las estimaciones de tamaño poblacional a partir de los datos obtenidos con la foto-identificación se utilizó el modelo Jolly - Seber (Jolly, 1965; Seber, 1982) para poblaciones abiertas. El análisis de los datos se realizó en el programa *Ecological Methodology* (Krebs, 2003). En todas las medias calculadas se utilizó el error estándar como indicador de variabilidad. Los valores de abundancia absoluta se expresaron con los límites de confianza (IC) al 95 %. Para la comparación de los indicadores de abundancia relativa por regiones y época se utilizaron pruebas para datos pareados paramétricas o no en dependencia de la normalidad de los datos. El análisis estadístico se realizó con el programa Statistica v 6.1 (Statsoft, 2005).

Análisis de marcadores moleculares (Microsatélites y ADN mitocondrial) para estructura genética

Se analizaron un total de 107 ejemplares capturados en diferentes sitios de la zona centro-norte del país (144Km de la Zona Central del Archipiélago de Sabana-Camagüey) y del Golfo de Guacanayabo (Guacanayabo y Cienfuegos). La región de Caibarién se subdividió en dos subregiones debido a la presencia en esta zona de un pedraplén que une la isla principal con la región oriental del Cayo de Santa María (Tabla 1).

Las muestras de sangre se conservaron en un tampón de lisis (Tris HCL 100 mM, EDTA 100 mM, NaCl 10 mM, 1 % SDS a pH8) en una proporción 1 en 10 y se almacenaron a 4°C.

Las extracciones de ADN genómico se realizaron a partir de 500 µl de lisado de células empleando la técnica de fenol/cloroformo previo tratamiento con proteinasa K (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN se precipitó con etanol 100% y se resuspendió en 50 µl de tampón TE 1X (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA). La calidad del ADN extraído se verificó en geles de agarosa al 1 % empleando tampón TBE 1% (40 mM Tris-Ácido Bórico, 1mM EDTA).

Loci microsatelites

Se amplificaron 5 *loci* microsatélites, informados en la literatura, que para otras poblaciones estudiadas presentaron niveles de variación moderados y cumplían con la premisa de que las frecuencias alélicas se han encontrado bajo equilibrio genético. Los *loci* escogidos fueron Ttr04, Ttr34, Ttr48 (Rosell *et al.*, 2005), MK6, MK8 (Krutzen *et al.*, 2001). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se efectuaron en un volumen final de 25 µl con las siguientes proporciones: aprox. 0.1 µg de ADN, tampón de amplificación 1X (Promega, USA), 250 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 200 nM de cada uno de los cebadores, 0.2 u de GoTaq Polimerasa (Promega, USA). Para todos los *loci* se empleó un programa de amplificación consistente en 3 min a 94°C de desnaturalización inicial de seguido de 35 ciclos con el siguiente perfil: 30 s a 92°C, 60 s a la temperatura óptima de unión de cada par de cebadores y 60 s a 72°C para la extensión de las cadenas. Al final del programa se añadieron 10 min a 72°C.

Los productos de la PCR fueron separados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%, usando cristales de 35cm de ancho por 45cm de largo y separadores de 0.4mm de espesor. Los geles se prepararon a partir de una solución de 100ml de una solución de acrilamida (6%)

conteniendo además formamida, tampón TBE 5X y urea, y se mezclaron con 500 μ l de persulfato de amonio (PSA) (BioRad) al 10%, y 100 μ l de TEMED (Farmacia). La corrida se efectuó a 70W durante 2 a 4 horas en dependencia del tamaño del *locus* analizado. El revelado de los geles se efectuó mediante tinción con plata utilizando el estuche SilverSequence Staining (Promega).

ADN mitocondrial

Se amplificó la región 5' de la región de control del ADN mitocondrial (ADNmt) (630pb). Como cebadores para las reacciones de PCR se utilizaron MTCRf (50-TTC CCC GGT GTA AACC) y MTCRr (50-ATT TTC AGT GTC TTG CTT T) según Hoelzel (1998). Las condiciones de reacción fueron las mismas descritas para los *loci* microsatélites.

Las secuencias del fragmento amplificado de la región de control y de *loci* microsatélites de algunos genotipos escogidos se realizaron utilizando el estuche de reactivos BigDye terminator (Applied Biosystems). Se empleó un secuenciador automático ABIPrism 3100 (Applied Biosystems).

Procesamiento de los datos

Loci microsatelites

Se calcularon diferentes estimados de la diversidad genética para cada localidad de muestreo. El número promedio de alelos por locus (A), la riqueza alélica (ag) y las frecuencias alélicas observadas, se determinaron usando el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). El desequilibrio por ligamiento genético entre pares de *loci* se estimó empleando el programa Genepop ver. 3.3 (Raymond y Rousset, 1995). Se estimaron las heterocigosidades observada (*Ho*) y esperada (*He*) mediante la expresión de Nei (1987), implementada en el programa Genepop ver. 3.3 (Raymond y Rousset, 1995). Sus desviaciones estándar fueron calculados mediante simulaciones de los datos utilizando el programa Genetix 4.1 (Belkhir *et al.*, 2000).

Estos parámetros genéticos fueron comparados entre todos los grupos muestreados, empleando el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001), su significación fue calculada mediante 1000 permutaciones.

Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg fueron estimados mediante el cálculo del estadístico F_{IS} (Wright, 1965), acorde a las fórmulas descritas por Weir y Cockerham (1984). Los valores de probabilidad se obtuvieron mediante permutaciones y el nivel de significación se ajustó aplicando la corrección de Bonferroni (Rice, 1989). La diferenciación genética entre las localidades de muestreo se estimó utilizando el estadístico F_{ST} (Weir y Cockerham 1984). Las desviaciones estándar de los estadísticos F , se obtuvieron mediante remuestreo *Jackknife* y los intervalos de confianza se calcularon mediante *bootstrap*.

Se calculó una matriz de distancia insesgada (Nei 1978) entre sitios de muestreo y a partir de esta se construyó un árbol por el método UPGMA utilizando el programa MEGA versión 4.02 (Tamura *et al.*, 2007).

ADN mitocondrial

Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el programa BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999) y alineadas con el programa Clustal X implementado en MEGA 4.02 (Tamura *et al.*, 2007). Los índices de diversidad nucleotídica (π), diversidad haplotípica (*Hd*) y la prueba de neutralidad de Tajima (Tajima, 1989) fueron estimados mediante el programa Dnasp v5 (Librado y Rozas 2009). Para ilustrar las relaciones entre los haplotipos se construyó una red de haplotipos por el método de la red de mínima extensión (del inglés *minimum spanning network*) utilizando el programa Network 4.5.1.6 (Bandelt *et al.*, 1999). No se realizan otros análisis de mayor

complejidad estadística debido a que el reducido tamaño muestra puede comprometer la potencia de las pruebas.

Conteo de capas de dentina para el análisis etario

La determinación de la edad en los cetáceos se realizó basada en el conteo de las capas de crecimiento de dentina. La dentina se acumula a razón de una capa anual. Se tomaron muestras de 30 delfines en vida libre (15 hembras e igual número de machos) y se adicionaron además los datos de 5 delfines hembras mantenidas bajo condiciones controladas en el Acuario Nacional; de estos últimos animales se poseían datos morfométricos de más de cinco años cada uno. Así se tuvo un total de 55 muestras de 35 delfines.

Los delfines, una vez capturados o extraídos de las piscinas, fueron situados a la sombra, sobre colchones y se mantuvieron húmedos rociándolos con agua. A los animales se les tomaron once medidas morfométricas. Para ello se empleó una cinta métrica con un error de ± 1 cm.

Para la extracción del diente se le abrió la boca al animal de forma forzada. A cada delfín se le extrajo el diente número 13 de la mandíbula inferior derecha. Para esto se le aplicó de forma local a cada animal 2 ml de lidocaína o xilocaína y se esperó de tres a cinco minutos. Pasado este tiempo se vuelve a inocular 1ml del anestésico como margen de seguridad. Se descarnó la encía alrededor del diente y se hizo perpendicular al plano de la boca para no dañar la muestra (diente); esto se realizó utilizando espátulas de ortodoncia número 3 ó 4. La extracción se efectuó con una pinza de ortodoncia 18R. Una vez extraído los dientes se procedió a aplicar hemostasia para evitar hemorragias. A los animales se les aplicó de forma intramuscular Amoxicilina 5mg/kg de peso corporal.

Las muestras se mantuvieron en agua salada durante una semana para que se descompusiera todo el tejido blando asociado a ellas. Posteriormente se lavaron con agua corriente y secaron a temperatura ambiente. Para lijar los dientes se usó primero una lija de agua de carburo de silicio #60, que es porosa y después una #220 para obtener un lijado más fino. Se lijaron longitudinalmente por dos superficies opuestas a la vez, haciéndolo con movimientos transversales, hasta obtener una delgada película de aproximadamente 1mm de espesor. Las láminas se observaron en un microscopio clínico a un aumento de 40x y por último se contó el número total de capas. Se consideró la edad equivalente al número de capas de dentina. Se correlacionó la edad con las diferentes medidas morfométricas y en los casos en que resultó significativa se procedió a realizar una regresión.

Análisis de parámetros hemoquímicos y de hemograma

Para la determinación de los rangos normales de los parámetros hematológicos se emplearon un total de 424 muestras de 225 delfines (127 hembras y 98 machos) asintomáticos manipulados a partir del año 2000. Las muestras de sangre se colectaron con material estéril que incluye jeringuillas y agujas de perfusión 21'. Estas muestras se conservaron en frío en tubos de ensayo de 7ml por un tiempo no mayor de 6 horas hasta su procesamiento. Se empleó el EDTA como anticoagulante para aquellas muestras utilizadas en el hemograma. Las destinadas para los análisis de hemoquímica, se centrifugaron a 6000 rpm y se les extrajo el suero sanguíneo con ayuda de micropipetas de 32 μ l. Se determinaron un total de 26 parámetros sanguíneos: de ellos 10 del hemograma y el resto son hemoquímicos. Estos parámetros son cuantificados por técnica

colorimétrica en espectrofotómetros específicos para ellos (Contador de Partículas Hematológico PCE 250 para el hemograma y un Refroton Plus de la firma Roche para la química del suero). El conteo para el diferencial de células blancas se realizó de forma manual con ayuda de un microscopio clínico y un aumento del 400x con lente de inmersión. Los frotis sanguíneos fueron fijados con metanol y teñidos con un kit rápido de tinción marca Eurotubo del productor español DeltaLab.

Análisis de la frecuencia de patologías presentes en los animales en el medio natural

Los diferentes signos y sintomatologías fueron detectados durante la observación clínica cuando estos signos eran evidentes y propios de alguna afección. A la auscultación pudieron detectarse algunas patologías respiratorias así como mediante las citologías de espiráculo, para lo cual se ubicaba el portaobjeto a 5 cm del espiráculo del delfín y se esperaba alguna espiración. Luego se fijaba con metanol en aerosol, se teñía con azul de metileno y se analizaba al microscopio clínico a un aumento de 400x. Para la detección de patologías digestivas se le abría la boca de forma forzada al animal para su revisión (en caso de gingivitis) y se sondeaba con una sonda gástrica para obtener contenido estomacal, al que se le determinaba la acidez con papel de pH, o por una sonda anal y análisis posterior de las heces fecales. Las enfermedades reproductivas se detectaban por revisión de la zona genital o por sondeo urinario con sondas infantiles. Otras enfermedades son detectadas durante los análisis de los hemogramas y la hemoquímica como las hepatitis, problemas cardiacos y aquellas infecciones serias se procedían a aislar e identificar los patógenos con sus cultivos específicos.

Análisis de enfermedades asociadas a la reproducción

Se realizó una inspección clínica de los genitales externos donde se determinó la presencia de lesiones y se describió la localización, forma, tamaño, aspecto y coloración de las formaciones tumorales. Se tomaron muestras para histopatología a partir de lesiones papilomatosas ubicadas en la región genital de 13 animales de vida libre sin tener en cuenta sexo ni talla. Las muestras, con tamaño de 0.1 cm x 0.2 cm fueron tomadas previa anestesia del área con lidocaína al 2 %, mediante un corte con bisturí o con un ponche donde solo se incluyó tejido tumoral. Las muestras colectadas durante el acto quirúrgico en tubos estériles se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Procesamiento

A las secciones de + 0,5 mm de tejido se les añadió 500 μL de PBS 1X para rehidratar el tejido y se dejaron a 40C durante 2h. Posteriormente se cortaron con bisturí, se centrifugaron durante 5 min a 12000 g a una temperatura de 40C Las extracciones de ADN genómico se realizaron empleando la técnica de fenol/cloroformo previo tratamiento con proteinasa K (Sambrook *et al.*, 1989) modificado.

Detección de papilomavirus.

Para la detección de papilomavirus del delfín (TtPV) se utilizaron dos ensayos de PCR basados en la amplificación de un fragmento del gen L1 de papilomavirus utilizando dos parejas de primers degenerados:

1-PCR de primers generales de papilomavirus (Forslund *et al.*, 1999): FAP59 (TAACWGTIGGICAYCCWTATT) y FAP64 (CCWATATCWHCATITCICCATC). La

incubación inicial de las muestras se realizó durante 10 min. a 94°C seguida de 45 ciclos (90 seg. a 94°C, 90 seg. a 50°C y 30 seg. a 72°C) y una incubación final de 7 min. a 72°C.

2- PCR primers de papilomavirus de pequeños odontocetos diseñados por Manuela Rehtanz¹ (com. pers.) a partir de la secuencia de papilomavirus de *Tursiops truncatus* (TtPV-1, 2, 3) y de papilomavirus tipo 1 de marsopas *Phocoena spinipinnis* (PsPv-1): primers doL1F2MR y doL1B1MR. El perfil de temperatura para estos primers fue de una etapa inicial de 4min a 94°C y 45 ciclos (1min a 94°C, 90seg a 45°C y 1min a 72°C) y una etapa final de 10 min a 72°C.

Detección de herpesvirus

Para la detección de herpesvirus del delfín se utilizó un PCR anidado con un juego de primers consenso para herpesvirus, diseñados por VanDevanter *et al.* (1996) de acuerdo a secuencias motifs conservadas del gen viral que codifica para la ADN polimerasa de diferentes especies herpesvirales: DFA (GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC), ILK (TCCTG

GACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA), KG1 (GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT: Primer antisentido), TGV (TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT) y IYG (CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT: Primer antisentido). El perfil de temperatura para la primera y la segunda reacción fue: 10 min. a 94°C seguido de 45 ciclos (30 seg. a 94°C, 60 seg. a 46°C y 60 seg. a 72°C) y una incubación final de 7 min. a 72°C. En la reacción se utilizaron 2 µL del molde en la primera reacción y 5µL en la segunda.

Como control positivo de las reacción de PCR de papilomavirus se utilizó ADN de papilomavirus bovino y en el caso del PCR de Herpesvirus, se utilizó el ADN de BHV1(chequeado previamente por PCR con primers específicos a dicho virus).

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio 0,08 µg/mL. Para determinar la talla aproximada de los productos fue incluido un patrón de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Promega*) con un rango de tallas de 250-10000 pb y 1 Kb plus DNA Ladder (*Invitrogen*) con un rango de tallas de 100-12000 pb. Las bandas se visualizaron a una longitud de onda de 312 nm en un transiluminador (*Uvitec*) y se fotografiaron con cámara digital para registrar los resultados.

OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Caracterizar la estructura poblacional de los delfines *Tursiops truncatus* y evaluar su estado clínico en el archipiélago Sabana-Camagüey, Cuba.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL PROYECTO

Determinar las características poblacionales del delfín *T. truncatus* en el archipiélago Sabana-Camagüey, en términos de parámetros demográficos y estructura genética.

Realizar la evaluación clínica de los delfines en vida libre que habitan en este archipiélago.

SALIDAS PREVISTAS:

¹ Manuela Rehtanz. Harbor Branch. Oceanographic Institution, Center for Coastal Research and Conservation. FL USA

1. Publicaciones científicas especializadas que actualicen e incrementen los conocimientos sobre la biología de la especie.
2. Publicaciones populares
3. Tesis de licenciatura y maestría

RESULTADOS

Resultado 1:

Durante los nueve años de seguimiento se hicieron 977 avistamientos de delfines, en 134 grupos (Tabla 2) en la costa norte de la provincia de Matanzas. En cada expedición se registró una mediana de 41 delfines, aunque este valor varió entre 8 y 68 individuos observados. El número de delfines observados anualmente varió entre 8 y 263, en relación directa con el esfuerzo de muestreo realizado (tiempo de navegación) ($r_s=0,71$; $p<0,05$). La mayoría de los avistamientos se concentraron en el extremo de la península de Hicacos, entre esta y los cayos Grupos de Blanco (Fig.1). Todos los avistamientos realizados en la zona costa norte se produjeron cercanos a la línea costera, en profundidades entre los 3 y 8 m, sin sobrepasar la isobata de los 20 metros, a una distancia promedio de $1,93 \pm 0,198$ Km.

El tamaño de grupo promedio fue de $7,5 \pm 0,67$ individuos aunque se observaron con mayor frecuencia los grupos menores de ocho individuos y en ocasiones grupos más numerosos hasta de 25 o 30 animales (Fig. 2). Se observaron crías en las 22 salidas de campo y en el 65 % de los grupos avistados con más de dos individuos. Las crías consideradas como neonatos constituyeron como máximo el 9 % del total de animales avistados (Fig. 3). Durante el período analizado los tamaños de los grupos con presencia de crías fueron considerablemente mayores que aquellos que no las presentaban ($Z=7,63$ $p<0,05$).

La abundancia de delfines fue mayor en las épocas más lluviosa del año, mismas que se localizaban mayoritariamente en el litoral más externo del área de estudio. Se encontró diferencias estadísticamente significativas en el número de animales encontrados por cada 100 km recorridos, respecto a la época ($t= 2,59$ $p=0,002$; $n=20$) y en el número de avistamientos realizados por cada 100 km recorridos entre las regiones ($U= 99,5$; $p<0,05$). Analizando la escala temporal, los valores de densidad de delfines en el área varían entre 0,1 y 1,8 delfines/km² (Fig. 4). Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre temporadas climáticas ($U= 15,0$; $p=0,016$). Los meses de mayores valores de densidad fueron mayo, junio, julio y agosto, coincidente con algunos de los meses de mayor precipitación.

foto-identificación

Durante el período analizado, a partir de las fotografías de las aletas dorsales se pudieron identificar inequívocamente 141 individuos de delfines. Las muescas en el borde posterior de la aleta dorsal constituyeron los elementos distintivos para el 82 % de los casos identificados, el resto fue identificado por otras muescas, manchas u otros elementos identificatorios. El 38 % ($n=53$) de los animales fueron avistados en una sola ocasión por lo que se catalogaron como transeúntes, mientras que 88 delfines (62 %) fueron observados en más de una ocasión: 33 delfines en dos visitas y 55 delfines en tres o más ocasiones. En la tabla 3 se muestran los animales con mayor frecuencia de avistamiento en el área en salidas y años diferentes. Durante las salidas del año 2004 no se pudo realizar sesiones de foto-identificación. De los 40 individuos incluidos en la tabla solo 16 (observados en cinco o más ocasiones) corresponden a los animales

catalogados como residentes temporales o, al menos, residentes estacionales en la costa norte de la provincia de Matanzas, Cuba.

Se aplicó el modelo de captura marcaje recaptura de Jolly-Seber (para poblaciones abiertas) a los datos de reavistamientos de delfines por salida, para hacer una estimación menos sesgada del tamaño poblacional, ya que los avistamientos por si solos –sin identificación de los individuos- puede sobreestimar grandemente este parámetro. Sin embargo, por las restricciones propias de este modelo solo se tuvo una cantidad adecuada de recapturas para lograr estimados válidos en los años 2008 y 2009. En agosto de 2008 se estimó la población en 133 delfines, con límites de confianza al 95 % entre 107 y 187 individuos. En octubre de ese mismo año, los reavistamientos fueron suficientes para estimar en 102 individuos la población (LC entre 85 y 138). En marzo de 2009 la población se estimó en 153 individuos (LC entre 94 y 327).

Resultado 2

Loci microsatelites

Los cinco *loci* analizados mostraron índices relativamente altos de polimorfismo y fueron similares entre si al comparar las localidades estudiadas (Tabla 4). El número de alelos por *locus* varió de 6 a 8, con el valor máximo observado para el *locus* MK8. Los estimados de heterocigosidad fueron muy similares entre todas las localidades. Solo se destaca el valor relativamente menor observado en las muestras provenientes del Golfo de Guacanayabo.

Los estimados del índice de diferenciación F_{ST} por *locus* oscilaron entre 0.02 ± 0.007 (*locus* MK8) y 0.033 ± 0.024 (*locus* Ttr48) con una media de 0.008 ± 0.007 . En todos los casos los valores fueron significativos, probablemente indicando heterogeneidad en las frecuencias alélicas por localidad. Sin embargo, el análisis entre pares de localidades mostró un solo valor significativo de F_{ST} , al comparar Punta San Juan y Guacanayabo, sugiriendo que de manera general no existe diferenciación genética entre estas (Tabla 5).

Para ilustrar de manera preliminar las posibles relaciones filogenéticas entre las muestras comparadas a nivel genético, se elaboró a partir de las distancias genéticas de Nei (1978) un árbol empleando el método de distancias UPGMA (Fig. 5)

ADN mitocondrial

Se secuenciaron 458pb del dominio 5' de la región de control del ADNmt. Se identificó un total de 17 haplotipos. De las localidades analizadas la que presentó mayor variación fue el Norte Cayo Santa María con 6 haplotipos y una diversidad haplotípica de 0.89 (Tabla 6). De forma similar a lo observado para los *loci* microsateélites los individuos procedentes del Golfo de Guacanayabo presentaron valores de diversidad menores que los detectados en el resto de las localidades. Las diversidades haplotípica ($Hd = 0.39$) y nucleotídica ($\pi = 0.002$) fueron las menores en todos los casos.

Los estimados de neutralidad según la prueba de Tajima (1989) indicaron neutralidad en todas las localidades, con la excepción del Este del pedraplén a Cayo Santa María. En este caso en particular se observó un exceso de sitios polimórficos en solo dos haplotipos, ambos en alta frecuencia en la localidad

Para ilustrar las relaciones entre los haplotipos se construyó una red de haplotipos por el método del árbol de mínima extensión (del inglés *minimum spanning network*) utilizando el programa Network 4.5.1.6 (Bandelt *et al.*, 1999). Los resultados aparecen en la Figura 6. Dos grupos de haplotipos divergentes por un número mínimo de 15 mutaciones distinguen las localidades del Norte con respecto a las del Sur

Resultado 3:

Al comparar las variables morfométricas entre hembras y machos mediante pruebas T de student no se observaron diferencias significativas para ninguna de las variables medidas. Se correlacionaron las variables morfométricas con la edad de los delfines estimada por el conteo de los grupos de capas de crecimiento de dentina. La única medida corporal que mostró correlación con la edad fue el largo total ($r=0.945$, $p<0.05$).

Al construir las curvas longitud total versus edad (Fig 7) y determinar la ecuación de regresión se observó que el crecimiento es logarítmico. Al comparar las curvas de crecimiento entre hembras y machos por un ANOVA bifactorial no se observó tampoco diferencias entre los modelos ($p<0.01$).

Resultado 4:

En la tabla 7 se presentan los valores hematológicos normales para el delfín tonina *Tursiops truncatus* provenientes del archipiélago Sabana-Camaguey

De los 225 animales revisados provenientes de vida libre, se obtuvieron 1061 muestras para el análisis. Como se puede apreciar, aunque la mayor parte de la población mostró algún signo clínico, las enfermedades que más se presentaron fueron las respiratorias, las digestivas y la combinación de estas (Fig. 8).

Resultado 5

Como resultados de la reacción en cadena de la polimerasa para los cebadores generales FAP 59/64 no se observó en ninguna de las muestras la amplificación del genoma del *Tursiops truncatus* papilomavirus (TtPV). Al emplear el juego de cebadores doL1F2MR y doL1B1MR se pudo visualizar una banda de aproximadamente 425 pb indicando la presencia del genoma viral de TtPV en 3 de las muestras analizadas (fig. 9), por lo que son consideradas positivas (21,4%).

De las 14 muestras analizadas en el caso de herpesvirus, se obtuvo una presencia viral positiva en cinco de ellas, como se observa en la figura 10. De las muestras positivas para herpes tres presentaron además coinfección con *Tursiops truncatus* papilomavirus (TtPV).

Discusión

El estudio de las poblaciones de cetáceos y en particular de los delfines ha revelado complejas interacciones sociales y comportamientos adaptativos que operan a diferentes escalas espaciales y temporales (Connor *et al.*, 2000; Reynolds III *et al.*, 2000). Esta complejidad debe ser tomada en consideración para cualquier investigación que se realice en la actualidad acerca de las características poblacionales de estas especies ya que determinar los límites entre demos y poblaciones son complejos (Sellas *et al.*, 2005). En el delfín Tonina (*Tursiops truncatus*) se han identificado diversos comportamientos que incluyen poblaciones abiertas con amplio recambio de individuos proveniente de diversas localidades, poblaciones cerradas, estables determinadas por hábitos tróficos específicos y explotación de recursos locales (Hoelzel, 1998)

La mayoría de las investigaciones realizadas en el mundo sobre la especie *Tursiops truncatus* se han concentrado en las poblaciones del morfotipo costero que habitan tanto en estuarios y bahías como zonas costeras expuestas. Varios autores sugieren que la ecología de distribución de esta especie, al igual que la de otros cetáceos, está determinada por la distribución de los recursos alimentarios y factores que influyen en la reproducción y crianza (Barco *et al.*, 1999).

El sitio de más avistamientos de delfines fue en la franja norte de la península de Hicacos, principalmente, en los alrededores del canal de Buba, lo que coincide con lo encontrado por Pérez-Cao (2009). Esta zona es la porción más externa del área de estudio y se diferencia de la bahía de Cárdenas por presentar mejores condiciones oceanográficas-topográficas, que permiten a los delfines capturar sus presas más fácilmente, y además cuenta con mayor riqueza de especies de presas (CUB/98/G32, 2001a). La relación entre la frecuencia de avistamientos y la concentración de los recursos alimentarios ha sido señalada con frecuencia en la literatura (ej.: Delgado, 2002; Morteo *et al.*, 2004).

La observación frecuente de grupos de uno a ocho individuos indica que esta población se caracteriza por formar unidades sociales de forrajeo pequeñas (1-6, pero ocasionalmente hasta 30 individuos). El tamaño de grupo promedio encontrado en la población es semejante al reportado para áreas del golfo de México, como por ejemplo: 7,5 indiv/grupo en la laguna de Yalahau, México (Delgado 1996); 6,37 indiv/grupo en el área adyacente a Isla Holbox, México (Lechuga *et al.*, 1995, citado por Delgado, 1996). Estos patrones de agrupamiento fueron similares a los reportados para delfines costeros en otras áreas, como por ejemplo la costa oeste de La Florida (Wells, 1986; Shane, 1990b) y a lo largo de la costa de Texas (Maze y Würsig, 1999). Los grupos con cría fueron mayores, relación explicada por el posible papel del tamaño de grupo para la protección de las crías o de su composición para el aprendizaje y entrenamiento de los juveniles (Irvine *et al.*, 1981; Scott *et al.*, 1990).

Durante el período analizado no se pudo identificar períodos de máxima actividad reproductiva con precisión. Los neonatos fueron clasificados, en su mayoría, por el tamaño, coloración y por la forma de salir a respirar, lo que permite inferir que el animal está en sus dos o tres primeros meses de vida (Delgado, 2002). Estas observaciones permiten argumentar dos posibles hipótesis: Los muestreos realizados en el área no cubrieron los períodos de los posibles nacimientos o existe un área adyacente y resguardada donde ocurren estos eventos y las madres con las crías se aventuran a las zonas más expuestas después de un tiempo corto en busca de mejores condiciones de alimentación. No obstante, el porcentaje de neonatos respecto a adultos registrados en este trabajo coinciden con los hallados en otras poblaciones costeras de la especie: 9,7 % en La Florida (Weigle, 1990) y entre 4 % y 6 % en las zonas marinas de Tabasco y Yucatán respectivamente (Delgado, 2002).

La densidades poblacionales de delfines en la costa norte de Matanzas, Cuba, se encuentra entre los valores registrados en otras poblaciones costeras de diferentes partes del mundo, 0 y 3 delfines/km² (Mullin *et al.*, 1990; Ortega, 1996; Wells y Scott, 1999). A diferencia de lo expresado por Perez-Cao *et al.*, (2009) para el área, se observa que a largo plazo parece existir un incremento del número de delfines en los meses de mayor precipitación, lo que puede relacionarse con la concentración de especies presas (Ej. familia Lutjanidae), ya que se tiene evidencia de delfines alimentándose de pargo criollo (*Lujanus analis*) en las salidas realizadas en esos meses. Por otra parte, el forrajeo es la conducta mayormente observada en los grupos avistados durante la investigación.

El análisis de los reavistamientos a largo plazo de los delfines apoya la hipótesis de que el área sostiene un núcleo poblacional, relativamente pequeño, con cierto grado de residencia o filopatría. De los animales reavistados con mayor frecuencia solo 17 pueden ser clasificados como residentes temporales. Se sabe que de dos animales capturados en esta área y liberados en Isabela de Sagua, luego de 11 años en cautiverio, la hembra fue recapturada nueve meses después

en Varadero, a una distancia aproximada de 110 km (Guevara², com. pers.). Durante este trabajo no se puede determinar con seguridad si el área posee un núcleo poblacional con residencia estable debido a que el muestro no fue lo suficientemente intensivo a lo largo del tiempo. No obstante, se podría decir que los patrones de fidelidad al área de los delfines en la costa norte de la provincia de Matanzas parecen ser similares a los reportados para los delfines a lo largo de la costa de Texas, donde algunos individuos son residentes, mientras que otros aparentan ser transeúntes o visitantes ocasionales de áreas adyacentes (Maze y Würsig, 1999).

De forma general, los valores de densidades y abundancias absolutas obtenidos en tres meses, coinciden en el rango entre 100 y 150 animales. Estos son los primeros estimados realizados para una población de delfines en Cuba, pero solo deben ser usados como índices de abundancia de los delfines en el área de estudio debido a que no tienen la suficiente precisión para ser empleados como base a planes de explotación de las poblaciones.

De acuerdo con Scott (1990) la residencia de delfines en un área particular no es prueba suficiente de que estos constituyan un *stock* aislado. Es necesario evaluar el grado de aislamiento y la tasa de intercambio genético entre grupos locales para poder concluir al respecto con una base sólida, y vincular observaciones ecológicas con la evidencia genética.

El área de captura utilizada por el Acuario para las extracciones de delfines constituye la región central del Archipiélago Sabana-Camaguey, factor que determinó el uso de esta región para realizar el análisis de estructura poblacional a nivel genético, aspecto de vital para determinar cuotas de capturas y evaluar posibles afectaciones a las poblaciones naturales a través de indicadores de pérdida de diversidad genética.

Los estimados del índice de diferenciación F_{ST} por *locus* de microsatélites analizados entre localidades, sugieren, de manera general, que no existe diferenciación genética entre los sitios muestreados. Varios factores pueden explicar estos resultados, primero, que exista un flujo genético alto entre estas poblaciones que conduzca a la homogeneización genética. Se conoce que los machos al presentar un comportamiento migratorio más activo que las hembras constituyen el vehículo principal que mantiene un flujo genético entre las poblaciones, contrarrestando el efecto de la deriva genética que se verifica esencialmente en las poblaciones cerradas (Tezanos-Pinto *et al.*, 2009). Segundo, que el relativamente pequeño tamaño de muestra por localidad y la alta variabilidad de los *loci* microsatelites disminuyan el poder de resolución del análisis y la existencia de heterogeneidad entre localidad quede enmascarada en la varianza. Tercero, que las unidades comparadas no constituyan reales unidades demográficas (Ej.: se trata de submuestras de una misma unidad demográfica). Hay que tener en cuenta que no existe información acerca de las características conductuales y dinámica de las poblaciones en las áreas de muestreo. Estos elementos nos conducen a indicar que los resultados obtenidos deben ser interpretados con precaución hasta no se cuente con un mayor número de muestras por localidad en escalas espacial y temporal.

De la representación preliminar de las posibles relaciones filogenéticas a través de las distancias de Nei (1978), un aspecto interesante a señalar es la identidad genética entre los individuos colectados a uno y otro lado del pedraplén construido desde la isla principal hasta Cayo Santa María. Esto pudiera interpretarse como un indicativo de la existencia de flujo genético irrestricto

² Dr. Celia Guevara, doctora en medicina veterinaria. Especialista en mamíferos marinos del Acuario nacional de Cuba

entre ambas localidades. Sin embargo, también es posible que el tiempo transcurrido sea aun corto para que se reflejen cambios en las frecuencias alélicas entre localidades producto de la deriva genética ya que el número de generaciones transcurrido no es mayor de uno (ver más adelante). Por otra parte, los ejemplares de estas dos localidades parecen asociarse con la localidad de Punta San Juan, que geográficamente también corresponde a una zona de plataforma contigua. El resto de las asociaciones son difíciles de explicar con los datos disponibles.

A partir del análisis del ADN mitocondrial resulta interesante destacar que se encontró neutralidad en todas las localidades, con la excepción del Este del pedraplén a Cayo Santa María. Este resultado puede sugerir el efecto de un cuello de botella, no detectado al analizar los *loci* microsatélites debido a su mayor tamaño efectivo poblacional. No obstante, como en otros casos los resultados son preliminares debido al pequeño tamaño de muestra.

Dos grupos de haplotipos divergentes por un número mínimo de 15 mutaciones distinguen las localidades del Norte con respecto a las del Sur. Este es un resultado muy importante que contrasta, parcialmente, con los resultados descritos al analizar la variación de los *loci* microsatélites. La ausencia de haplotipos mitocondriales compartidos entre ambas áreas sugiere un aislamiento histórico de las poblaciones, probablemente inducido por la barrera física que constituye la Isla de Cuba y/o por diferencias en recursos y hábitat. Por otra parte, el contraste entre la información ofrecida por un genoma con herencia materna y los genes nucleares transmitidos por ambos padres puede estar indicando un comportamiento filopátrico en las hembras, mientras que se mantiene un flujo génico producto de la migración de los machos entre áreas geográficas, como hemos sugerido previamente (Möller y Beheregaray, 2004). No obstante, si tomamos en cuenta las asociaciones inferidas del árbol UPGMA empleando las distancias genéticas estimadas a partir de los *loci* microsatélites y la ausencia de haplotipos compartidos entre ambas regiones tanto en machos como hembras, se pudiera sugerir que ambos sexos tengan un comportamiento filopátrico. Esto ha sido evidenciado para las poblaciones de esta especie en varias regiones geográficas (Natoli *et al.*, 2005; Sellas *et al.*, 2005). Nuevamente, es imperioso analizar un número de muestras mucho mayor tanto en individuos como *loci* genéticos para poder realizar los análisis estadísticos segregando sexos por localidades y determinar el grado de asociación genética entre los individuos de cada región.

Otro aspecto a destacar es la notable diversidad observada en la localidad del Norte de Cayo Santa María, donde además de dos haplotipos presentes en alta frecuencia en las localidades del Archipiélago Sabana-Camagüey, se detectaron otros cuatro haplotipos exclusivos. Este resultado pudiera sugerir de manera preliminar la presencia de una población demográficamente más grande o la confluencia de individuos provenientes de diferentes áreas geográficas. Debemos notar que esta localidad es la más externa (*offshore*) de las analizadas. Un mayor diversidad haplotípica se ha detectado en poblaciones costeras que en las de aguas interiores (Sellas *et al.*, 2005).

Los resultados del análisis del ADNmt sugieren de manera clara que al menos dos regiones, representadas por el Archipiélago de Sabana-Camagüey y el Golfo de Guacanayabo, albergan poblaciones genéticamente diferenciadas. Resultado, que es aparente solo de forma marginal para los *loci* microsatélite estudiados. Esto implica que ambas poblaciones o grupos de poblaciones deben ser manejadas de forma diferencial e independiente (constituyen diferentes unidades de manejo), tomando en cuenta factores tan importantes como la talla de la población, las tasas de renovación, etc. En particular, las poblaciones presentes en el Golfo de Guacanayabo parecen ser

de tamaño pequeñas teniendo en cuenta la pobre diversidad genética observada, lo que puede hacerlas particularmente sensibles a los efectos antrópicos y otros cambios ambientales. Un tiempo de generación estimada de 10 años (Wells, 2003) y una tasa de migración muy limitada pueden hacer que una vez extirpada una población local deban transcurrir muchos años antes que puedan establecerse nuevos ejemplares en la zona. Otro aspecto a considerar seriamente es evitar la trasplatación intencional o involuntaria de individuos entre las áreas genéticamente diferenciadas con el objetivo de preservar los caracteres adaptativos que han permitido a las poblaciones responder a los desafíos locales.

Otro aspecto que varía mucho en la especie analizada en este proyecto son sus medidas morfométricas y consecuentemente las curvas de crecimiento que exhiben según la ubicación geográfica. Para ello como se explicó anteriormente en el documento, fue necesario la determinación de la edad para la cual se consideró cada año como una capa de crecimiento (Lockyer, 2006). Si bien la metodología para obtener las secciones del diente no es la misma que sigue la autora, que incluye descalcificación y cortes con crío-micrótomos; el lijado de la muestra es igualmente efectivo (Delgado³, com. pers.) y más barato. La obtención de láminas finas de cada diente permite el conteo de las capas. En ocasiones se puede utilizar también la tinción superficial con eosina y se discriminan aún mejor las sesiones. Durante esta investigación como primer resultado relevante no se encontró diferencias significativas entre las variables medidas entre hembras y machos. Esto sugiere que no existen diferencias de tamaño entre los sexos en la población estudiada o que el número de muestras no es suficiente para discriminar las posibles diferencias.

Aunque se plantea que las medidas varían entre las diferentes poblaciones de delfines toninas, se generaliza que los machos son de mayor tamaño (Smith 2002). La especie se describe como sexualmente dimórfica y la principal diferencia entre sexos es en el tamaño corporal, ya que los machos tienden a ser más grandes que las hembras. Sin embargo, esto sólo se hace aparente en algunas localidades, por ejemplo, los estudios realizados por Hersh *et al.* (1990) y Mead y Potter (1990) sugieren que las poblaciones de la costa oeste del Atlántico norte y del norte del Golfo de México no presentan dimorfismo sexual aparente. En Moray Firth, Escocia, por otra parte, el dimorfismo se hace evidente en el tamaño y la forma de la aleta dorsal (Eisfeld, 2003). Blanco y Olachea (1997) señalan que si bien el largo total no difiere entre sexos para los delfines cubanos, si muestran diferencias sexuales en otras medidas como la distancia morro-aleta pectoral y otras distancias ventrales que no fueron consideradas en este estudio.

En cuanto la correlación fuerte encontrada entre la edad y el largo total, coincide con lo reportado para la especie por Cockcroft y Ross (1988) y Read *et al.* (1993) y para otras especies de delfines como el delfín chileno *Cephalorynchus eutropias* (Molina y Reyes, 1996).

Este patrón de crecimiento logarítmico coincide con el modelo descrito para la especie (Read *et al.*, 1993) aunque queda corroborar el ajuste de esta curva a los modelos de Gompertz o Von Bertalanffy que son los que más se corresponden para los grandes mamíferos.

La no existencia de diferencias significativas entre los modelos para hembras y machos contrasta con las investigaciones sobre el crecimiento de los individuos al oeste de la Florida, las cuales

³ Dr. Alberto Delgado. Jefe de investigación científica. Parque Xcaret, México

han demostrado que las hembras crecen inicialmente más rápido y alcanzan tamaños asintóticos a edades más tempranas (12 años) que los machos (20 años) (Read *et al.*, 1993). Observaciones similares han sido realizadas por Cockcroft y Ross (1988) en Sudáfrica. En nuestro caso esta diferencia es imperceptible con el tamaño de muestra empleado por lo que se necesita incrementarla. Además sería útil el análisis del crecimiento durante el primer año de vida en esta especie.

No obstante, esta investigación constituye el primer reporte de un estudio de crecimiento de un cetáceo en aguas cubanas y un aporte a los estudios etarios de las poblaciones naturales de esta especie en Cuba.

Es de vital importancia como parte de la evaluación clínica de una población la determinación de los valores de los rangos normales sanguíneos para la especie, si se tiene en cuenta que los parámetros de sangre pueden ser los mejores indicadores de afecciones en cualquier organismo. En esta investigación se obtuvo por primera vez los rangos normales para la especie en aguas cubanas, con el mayor número de muestras que hasta la fecha se haya trabajado. Estos valores no difieren mucho de los reportados para las poblaciones de esta especie en el Golfo de México (Wells, *et al.* 2004; Bossart *et al.* 2001).

Se destacaron los valores elevados de urea en sangre, que duplican los valores máximos reportados para este parámetro hemoquímico. El comportamiento histórico de la urea en sangre durante la última década refleja un incremento a partir del año 2003, lo que pudiera ser un indicador de cambio ambiental en la zona. Por la función osmorreguladora de la urea, su incremento pudiera estar relacionado con el proceso de hipersalinización que se ha descrito para la macrolaguna del archipiélago Sabana Camaguey en esos años, sin embargo esto debe ser estudiado con mayor detenimiento. Los rangos normales sanguíneos determinados en este proyecto pueden ser usados por otras entidades cubanas del tipo delfinario o acuario que hagan uso de la especie.

En cuanto a las principales enfermedades detectadas en delfines cubanos en su medio natural, es necesario destacar que también han sido descritas como las principales en otras poblaciones de la especie en el mundo, así como, de los ejemplares mantenidos bajo condiciones controladas en parques acuáticos y acuarios (Bossart y Dierauf, 1990; Bossart *et al.*, 2001). Estas enfermedades además son de rápida recuperación y no necesitan de seguimiento clínico en la mayoría de los casos. Por lo que se puede considerar nuestra población de delfines como sana.

No obstante, el hecho de obtener confirmación positiva de la presencia de herpesvirus y papilomavirus en las muestras de delfines analizada, es un indicador conciso de la aparición de enfermedades emergentes en nuestras poblaciones. En el caso de papilomavirus se confirma a nivel molecular la presencia del virus en las poblaciones cubanas de delfines. Esta enfermedad fue descrita anteriormente solo a través de histopatología por Cruz, 2006. La presencia viral positiva de herpesvirus constituye el primer reporte de la enfermedad para la especie en aguas cubanas. Hay que tener en cuenta que los TT son mamíferos muy activos socialmente y regularmente son observados en intensas actividades de contacto sexual (Gowan *et al.*, 2007). La existencia de estos virus en el sistema reproductor de los delfines, como en otros animales, puede comprometer seriamente a largo o corto plazo la supervivencia de la especie en dependencia de factores estresantes que provoquen la aparición de lesiones malignas que comprometan la

actividad reproductiva de la población (Bossart *et al.*, 2007). Además en el caso del herpesvirus se ha comprobado que puede provocar abortos espontáneos en varias especies de animales incluidos los humanos (Miller, 2007). Otro resultado importante fue la detección molecular de animales infectados con ambos virus en la misma lesión por primera vez a nivel mundial. La coinfección es posible que se deba a que ambas son catalogadas como enfermedades oportunistas relacionadas con animales inmunodeprimidos .

A partir de lo argumentado anteriormente son notables los aportes de información sobre la especie y sus poblaciones en aguas del archipiélago Sabana-Camaguey. Sin embargo, es resaltante que la mayoría de los resultados no son conclusivos y es necesario aumentar el número de muestras para llegar a ello. Se conoce que el estudio de los mamíferos marinos requiere de un soporte financiero elevado además del hecho de que son especies de compleja estructura social por lo que se complejiza el acceso a la información sobre la biología de estos organismos.

Es por ello que es necesaria la implementación de nuevos proyectos de investigación que den respuesta a las interrogantes que quedaron pendientes y se continúen enriqueciendo las bases de datos ya elaboradas en aras de detectar posibles indicadores frente a las posibles afectaciones del cambio climático que se vienen sucediendo en nuestros días.

ARTÍCULOS CIENTÍFICO TÉCNICOS PRODUCIDOS CON LOS RESULTADOS DEL PROYECTO:

López, N. (2007). Estructura y dinámica poblacional de los delfines *Tursiops truncatus* (Cetacea: Odontoceti) en la costa norte de la provincia de Matanzas, Cuba. Tesis presentada en opción al título académico de Master en Biología Marina y Acuicultura con Mención en Biología Marina. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Cuba. 72 p.

Fernández, G. (2009). Análisis de la variabilidad genética y de la estructura poblacional del delfín *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) en localidades del Archipiélago Sabana-Camaguey, Cuba. Tesis de Diploma. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba. 55 pp.

López, N., M. Blanco, R. López, C. Guevara y D. Cruz (2010). Distribución, abundancia y composición etaria de los grupos de *Tursiops truncatus* (Cetacea: Delphinidae) en la costa norte de la provincia de Matanzas, Cuba (En prensa). Revista Cubana de Ciencias biológicas.

López, N., G. Fernández, R. López, M. Blanco, C. Guevara, L. Sanchez, D. Cruz, L. Sanchez (2010). Principales amenazas del cambio climático para los cetáceos: Los delfines y los ecosistemas costeros cubanos. (En prensa). Conservación de la biodiversidad en ecosistemas marinos y costeros para la adaptación al cambio climático en el litoral de iberoamérica: Cuba como caso de estudio. Memorias del taller internacional RED CITED 2010.

López, N. (2009). Nuestros delfines. Mar y Pesca. No. 377 p: 28-30.

TRABAJOS PRESENTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS:

Guevara C, R. López, L. Sanchez, D. Cruz, M. Blanco, N. López y L. Sanchez (2009). Rango de valores hematológicos y hemoquímicos del delfín tonina (*Tursiops truncatus*) para aguas de la costa norte central de Cuba (Ponencia). XIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar y VIII Congreso de Ciencias del Mar, Marcuba.

Cruz D., M. Hernández, M. Barrera, M. Rodríguez, Ma A. Ríos (2009). Diagnóstico de papilomavirus en delfines *Tursiops truncatus* de las costas de Cuba. (Ponencia). Rango de

valores hematológicos y hemoquímicos del delfín tonina (*Tursiops truncatus*) para aguas de la costa norte central de Cuba. XIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar y VIII Congreso de Ciencias del Mar, Marcuba

López N., M. Blanco. G. Fernández, R. López, C. Guevara, D. Cruz (2009). Estructura poblacional del delfín *Tursiops truncatus* en la costa norte de la provincia de Matanzas (Conferencia temática). XIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar y VIII Congreso de Ciencias del Mar, Marcuba

López N. y G. Fernández (2010). Los delfines y los ecosistemas costeros cubanos: perspectiva frente al cambio climático (Conferencia). Taller sobre “Conservación de la biodiversidad en ecosistemas marinos y costeros para la adaptación al cambio climático en el litoral de Iberoamérica: Cuba como Caso de estudio”.

López R, C. Guevara, A. Sobrado, L. Sánchez, D. Cruz, M. Blanco, N. López y L. Sánchez (2009). Modelos de crecimiento del delfín tonina *Tursiops truncatus* para aguas cubanas. XIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar COLACMAR y VIII Congreso de Ciencias del Mar, MARCUBA 2009.

Pérez A., G. Fernández, E. García, N. López, A. Robaina y D. Hernández (2009). Caracterización genética de poblaciones del delfín mular *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) en localidades del archipiélago cubano. XIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar COLACMAR y VIII Congreso de Ciencias del Mar, MARCUBA 2009

CONCLUSIONES

- En la costa norte de la provincia de Matanzas, región más occidental del archipiélago Sabana-Camaguey, se cuenta con un núcleo poblacional residente estacional de 16 delfines de un total de 141 individuos identificados que hacen uso del área.

El tamaño poblacional de la especie en el sitio es variable condicionado a factores como la abundancia de presas y se encuentra entre los 100 y 150 individuos. Estos valores son los primeros estimados realizados para una población de delfines en Cuba, y pueden ser usados como índices de abundancia en el área de estudio

Los delfines que hacen uso del área se caracterizan de forma general por formar unidades pequeñas de forrajeo de 1 a 6 delfines que se observan en grupos más numerosos cuando hay presencia de crías o se combinan actividades como la socialización y el forrajeo.

- En la región norte central del archipiélago los resultados preliminares sugieren la no existencia de estructuración poblacional a nivel genético. Sin embargo, si se detectó la existencia de al menos dos poblaciones genéticamente diferenciadas, entre el archipiélago Sabana-Camaguey y el Golfo de Guacanayabo, según indica el ADNmt y muy marginalmente una de las comparaciones entre localidades empleando *loci* microsatélites.

Las poblaciones de ambas áreas deben considerarse como unidades de manejo y de conservación independientes.

La variabilidad genética mas reducida fue detectada en los individuos del Golfo de Guacanayabo, lo que sugiere de forma preliminar, que su tamaño efectivo poblacional es pequeño.

- Se obtuvo por primera vez la curva de crecimiento a través de una relación logarítmica entre longitud total vs. Edad para delfines *Tursiops truncatus* en la costa norte central del archipiélago Sabana- Camaguey.

No se observan diferencias evidentes entre las curvas de crecimiento descritas por sexo para la especie en el área.

- Las enfermedades más frecuentes detectadas en individuos manipulados en la costa norte central del archipiélago Sabana-Camaguey, están relacionadas con el sistema respiratorio y digestivo, son de fácil recuperación, y han sido descritas para otras poblaciones de la especie.

Se obtuvo los rangos hematológicos normales para la especie para aguas cubanas los cuales no se diferencian en gran medida de los descritos para la especie en otras regiones del mundo.

A pesar de que se puede valorar a la población de delfines *Tursiops truncatus* que habita en la costa norte central del archipiélago Sabana-Camaguey como sana, es necesario realizar un seguimiento de los valores de urea en sangre y de las enfermedades relacionadas con el tracto reproductor, estas últimas son consideradas como enfermedades emergentes y se les relaciona su frecuencia y aparición con el cambio climático.

RECOMENDACIONES:

- ✓ Intensificar y continuar el presente estudio mediante nuevos proyectos de investigación donde se logre aumentar el número de muestras para llegar a resultados más concisos y se trate de dar respuesta a las interrogantes pendientes.
- ✓ Combinar los estudios poblacionales a diferentes niveles (ecológicos, genéticos y clínicos) en la misma región en la medida de lo posible con el objetivo de obtener resultados más integradores.
- ✓ Establecer un programa de monitoreo, diseñado apropiadamente, para continuar el estudio a largo plazo de la población de delfines en el área de la costa norte de Matanzas, donde se apliquen nuevas técnicas que acopladas con la foto-identificación permitan el acceso a la información biológica de forma más eficiente.
- ✓ La metodología empleada en esta investigación puede ser utilizada para desarrollar estudios similares en otras poblaciones de delfines en Cuba. En estas nuevas investigaciones es importante incrementar el esfuerzo de muestreo para obtener estimados más precisos de los parámetros poblacionales.

REFERENCIAS

- Acevedo-Gutierrez A. y N. Parker, (2000). Surface behavior of bottlenose dolphins is related to spatial arrangement of prey. *Marine Mammal Science* 16(2). 287–298.
- Atkinson T., A. Gill y P.G.H. Evans (1998). A photo-identification study of Risso's dolphins in the Outer Hebrides, Northwest Scotland. The World *Marine Mammal Science* Conference. Abstracts. Monaco, 20-24 January 1998. The Society for Marine Mammalogy. 160 pp.
- Bandelt, H.-J., P. Foster & A. Rohlf (1999). Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16, 37–48.
- Barco, S. G., W. M. Swingle, W. A. McLellan, R. N. Harris y D. A. Pabst (1999). Local abundance and distribution of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the nearshore waters of Virginia Beach, Virginia. *Marine Mammal Sci.* 15(2). 394–408.
- Barros, N. B., E. C. M. Parsions and T. A. Jefferson, (2000). Prey of offshore bottlenose dolphins from the South China Sea. *Aquatic Mammals* 26(1). 2-6
- Blanco M. y A. Olaechea (1997). Morfometría del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), en la costa norte de la zona central de Cuba. Biblioteca Virtual de las Ciencias en CUBA. Disponible en.

<http://www.bibliociencias.cu/gsd/cgi-bin/library?e=d-000-00---0revistas--00-0-0--0prompt-10---4---0-11--1-es-50---20-about---00031-001-1-0utfZz-8-00&a=d&cl=CL1.9>

- Bekkevold, D., C. André; T.G. Dahlgren, L.A.W. Clausen, E. Torstensen, H. Mosegaard; G.R. Carvalho, T.B. Christenser, E. Norlinder, D.E. Ruzzante (2005). Environmental correlates of population differentiation in Atlantic herring. *Evolution* 59. 2656-2668.
- Belkhir K, P Borsa, J Goudet, L Chikni, F Bonhomme (2000). Genetix ver. 4.01, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome et Populations*, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier. France.
- Block, B.A., H. Dewar, S.B. Blackwell, T.D. Williams, E.D. Prince, C.J. Farwell, A. Boustany, S.L.H. Teo, A. Seitz, A. Walli y D. Fudge (2001). Migratory movements, depth preferences and thermal biology of Atlantic bluefin tuna. *Science* 293. 1310-1314.
- Bossart, G. D. (2001). Manatees. Capítulo 43. En. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, L. A. Dierauf y F. M. D. Gulland (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 939-960.
- Bossart, G. D. (2007). Emerging diseases in marine mammals. *Microbe* 2 (11). 544-549.
- Bowen, B.W., A.L. Bass, L. Soarez y R.J. Toonen (2005). Conservation implications of complex population structure. lessons from dloggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology* 14. 2389-2402.
- Buckland, S. T., D. R. Anderson, K. P. Burnham y J. L. Laake (1993). Distance Sampling. Estimating Abundance of Biological Populations. Chapman y Hall, London, reprinted 1999 by RUWPA, University of St. Andrews, Scotland.
- Caldwell, D.K. y M.C. Caldwell, (1972). Behavior of Marine Mammals. En. S. H. Ridgway (ed) *Mammals of the sea*. Charles Thomas, Springfield, IL.
- Campbell, G.S., B. A. Bilgre, y R.H. Defran, (2002). Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Turreffe Atoll, Belice. occurrence, site fidelity, group size, and abundance. *Aquatic Mammals* 28(2). 171-180.
- Carter H., L. Saying, J. Blum y R. Wells, (2009). Whistles as potential indicator of stress in bottlenose dolphins. *Nicks & Notches*. 10-11.
- Cockcroft, V. G. y G. J. B. Ross (1988). Age, growth and reproduction of bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* from east coast of southern Africa. *Fisheries Bulletin* 88 (2). 289 – 302.
- Cokeron P.J. y S.M. Van Parijs, (2001). Vocalizations of eastern australian Risso's dolphins, *Grampus griseus*. *Can. J. Zool.* 79(1).160-164.
- Connor, R. C., R. S. Wells, J. Mann, A. J. Read (2000a). The bottlenose dolphin. Social relationships in a fission–fusion society. In. *Cetacean Societies. Field Studies of Dolphins and Whales* (eds. Mann J, Connor RC, Tyack PL, Whitehead H), pp. 91–126. University of Chicago Press, Chicago.
- Connor, RC; M.R. Heithaus; P. Berggren; y J.L. Miksis, (2000b). Kerplunking. Surface fluke-splashes during shallow-water bottom foraging by bottlenose dolphins. *Marine Mammal Science* 16(3).646-653.
- Cook, M., (2005). Hearing abilities of free-ranging bottlenose dolphins in Sarasota Bay. *Nicks & Notches*. 2-3.
- Cortez, A. M., H. Pérez C. y V. Lio, (2000). Abundancia y distribución de delfines tonina (*Tursiops truncatus*) en áreas aledañas a Cayo Coco en el Archipiélago Sabana-Camagüey, Cuba. Informe final. Proyecto GEF/PNUD. CUB/98/G32. 64 pp.
- CUB/98/G32 (2002). Inventario de la flora y la fauna marina del Archipiélago Sabana-Camagüey (Norte de Matanzas). Informe Parcial. Instituto de Oceanología.
- Cruz, M. D (2006). Papilomatosis en genitales de delfines *Tursiops truncatus* en zonas costeras del archipiélago cubano. Tesis presentada en opción al título académico de Master en patología veterinaria, 52 pp.
- Defran, R. H. y D.W. Weller, (1999). Occurrence, distribution, site fidelity, and school size of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) off San Diego, California. *Marine Mammal Science* 15(2). 366–380.

- Defran, R.H., D.W. Weller, D.L. Kelly, and M.A. Espinosa, (1999). Range characteristics of pacific coast bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the southern California bight. *Marine Mammal Science* 15(2). 381–393.
- Delgado, A. E. (1996). *Ecología poblacional de las toninas Tursiops truncatus, en la laguna de Yalahau, Quintana Roo, México*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. 93 p.
- Delgado, A. E. (2002). Comparación de parámetros poblacionales de las toninas, *Tursiops truncatus*, en la región sureste del Golfo de México (Estados de Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo). Tesis para obtener el grado académico de Doctor en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. 152 pp.
- Eisfeld, S. M (2003). The social affiliation and group composition of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the outer southern Moray Firth, NE Scotland. Thesis submitted for the degree of master of Science. School of Biological Sciences. University of Wales, Bangor. 85 pp.
- Escorza-Treviño, S y A. E. Dizon, (2000). Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology*. 9.1049-1060.
- Fontaine, M.C.; S.J. Baird; S. Piry; N. Ray; K.A. Tolley; S. Duke; A. Birkun; M. Ferreira; T. Jauniaux; A. Llavona; O.B. Oztu; A. Oztürk; V. Ridoux; E. Rogan; M. Sequeira; U. Siebert; G.A. Vikingssol; J.M. Bouquegneau y J.R. Michaux (2007). Rise of oceanographic barriers in continuous population of a cetacean. the genetic structure of harbor porpoise in old world waters. *BMC boil.* 5. 30
- Frankham, R.; J.D. Ballou y D.A. Briscoe, (2002). Introduction to conservation genetics. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Gerrodette, T., (1999). Preliminary estimates of 1998 abundance of four dolphin stocks in the Eastern Tropical Pacific. Southwest Fisheries Science Center Administrative Report LJ-99-04. 24 pp.
- Goudet, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Guevara, M. C.; L. Sánchez, L. Sánchez y V. Lio (2003). Hallazgos patológicos en delfines tonina (*Tursiops truncatus*) procedentes del medio natural y de cautiverio. *CD – ROM MAR Cuba 2003*.
- Hersh, S. L., D. K. Odell y E. D. Asper (1990). Sexual dimorphism in bottlenose dolphins from the east coast of Florida. *Marine Mammal Sci.* 6 (4). 305 – 315.
- Hill, M. 2003. Hearing abilities of free-ranging bottlenose dolphins. *Nicks & Notches*. 8.
- Hoelzel, A. R (1998). Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages. Implications for conservation policy. *J. Hered.*, 89, 451–458.
- Hoelzel, A. R., C. W. Potter, P. B. Best (1998). Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' populations of the bottlenose dolphin. *P. Roy. Soc. Lon. B Bio.*, 265, 1177–1183.
- Irvine, A. B., M. D. Scott, R. S. Wells, y J. H. Kaufmann (1981). Movements and activities of the Atlantic Bottlenose Dolphin, *Tursiops truncatus*, near Sarasota, Florida. *Fish. Bull.* 79(4). 910-913.
- Irvine, A. B. y R. S. Wells (1972). Results of attempts to tag Atlantic bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. *Cetology* 13. 1-5.
- Islas-Villanueva, V.(2005). Genética de poblaciones y filogeografía de toninas *Tursiops truncatus* en el sur del Golfo de México y el Caribe. *Tesis de Maestría*. UNAM, México. 97p.
- Jolly, G. M. (1965). Explicit estimates from capture- recapture data with both death and immigration-stochastic model. *Biometrika* 52. 225- 247.
- Jones, G. J. y L. S. Sayigh, (2002). Geographic variation in rates of vocal production of free- ranging bottlenose dolphins. *Marine Mammal Science* 18(2). 374-393.
- Krebs, C. J. (1999). *Ecological methodology*, 2nd ed. Addison-Wesley Educational Publishers, Inc
- Leatherwood, S. y R.R. Reeves, (1982). Bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, and other toothed cetaceans, in J. A. Chapman and G. A. Feldhamer, eds. *Wild mammals of North America. Biology, management, economics*. John Hopkins University Press, Baltimore, MD.p. 369-414
- Leatherwood, S. y R.R. Reeves, (1990). *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, USA.
- Librado P, J. Rozas (2009). DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *BIOINFORMATICS*, 25, 1451-1452.

- Lockyer, C. 1993. A report on patterns of deposition of dentine and cement in teeth of pilot whales, genus *Globicephala*. *Rep.int. Whal. Commn* (14). 137-161.
- Lockyer, C. (2006). Age – How is it determined and validated in marine mammals? Proceedings of VI European Seminar on Marine Mammals. Biology and Conservation. 8 pp.
- Mann, J. 1999. Behavioral sampling methods for cetaceans. a review and critique. *Marine Mammal Science*. 15(1). 102-122.
- Manzanilla, S.R. (1989). The 1982-1983 El Niño event recorded in dentinal growth layers in teeth of Peruvian dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Can.J.Zool.* 67.2120-2125.
- Martin, A.R. y R.R. Reeves (2002). Diversity and zoogeography. In. Hoelzel R (et) *Marine Mammal Biology an Evolutionary approach*. pp.1-37.
- Maze, K.S. y B. Würsig, (1999). Bottlenose dolphins of San Luis Pass, Texas. Occurrence patterns, site fidelity, and habitat use. *Aquatic Mammals* 25(2). 91-103.
- Mead, J. G. y C. W. Potter, (1990). Natural history of bottlenose dolphins along the central Atlantic coast of the United States. En. Leatherwood, S. y R. R. Reeves (Eds.). *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, San Diego, CA. pp. 165 – 195.
- Miller
- Molina, D. y J.C. Reyes. (1996). Determinación de la edad en el delfín chileno *Cephalorynchus eutropias* (Cetacea. Delphinidae) *Revista Chilena de Historia Animal* 69.183-191.
- Morteo, E., G. Heckel, R. H. Defran y Y. Schramm (2004). Distribución. Movimientos y tamaño del grupo del tursión (*Tursiops truncatus*) al sur de bahía de San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas* 30(1A). 35-46.
- Morton, A., (2000). Occurrence, photo-identification and prey of pacific white-sided dolphins (*Lagenorhynchus obliquidens*) in the Broughton Archipelago, Canada 1984–1998. *Marine Mammal Science* 16(1). 80–93.
- Müller M. y M. Bossley, (2002). Solitary bottlenose dolphins in comparative perspective. *Aquatic Mammals*. 28(3). 298-307.
- Möller, L. M., Beheregaray L. (2004). Genetic evidence for sexbiased dispersal in resident bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mol. Ecol.*, 13, 1607–1612.
- Mullin, K.D., R.R. Lohofener, W. Hoggard, C. L. Roden y C. M. Rogers, (1990). Abundance of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the coastal Gulf of Mexico. *Northeast Gulf Science* 11(2). 113-122.
- Natoli, A.; V.M. Peddemors y A.R. Hoelzel (2004). Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Evo. Biol.* 17. 363–375.
- Natoli, A., A Birkun, A. Aguilar, A. Lopez, A. R. Hoelzel (2005). Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proc. R. Soc. B*, doi.10.1098/rspb.2005.3076.
- Nei, M., (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics*, 89, 583- 590.
- Nei, M., (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- Oswald J.N., J. Barlow y T. F. Norris. (2003). Acoustic identification of nine delphinids species in the eastern tropical pacific ocean. *Marine Mammal Science* 19(1). 20-37.
- Oswald J.N., S. Rankin y J. Barlow. (2008). Two whistle or not to whistle? Geographic variation in the whistling behavior of small odontocetes. *Aquatic Mammal* 34(3). 288-302
- Ortega, O. J. G. (1996). Distribución y abundancia de las toninas *Tursiops truncatus* en la Bahía de Ascención, Quintana Roo, México. Tesis de Maestría, CCH, UNAM, México. 82 pp.
- Parsons, K.M.; L.R. Noble; R.J. Reid y P.M. Thompson (2002). Mitochondrial genetic diversity and population structuring of UK bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). is the NE Scotland population demographically and geographically isolated?. *Biological Conservation*. 108. 175-182.
- Pérez-Cao, H., (1996). Genética Bioquímica Poblacional del Delfín Tonina *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) de Cuba. Tesis de Diploma. Universidad de la Habana. 64pp.

- Pérez-Cao, H. (2003). Abundancia y distribución de delfines tonina (*Tursiops truncatus*) en la costa norte de Matanzas en el Archipiélago Sabana-Camagüey, Cuba. Informe final. Proyecto GEF/PNUD. CUB/98/G32. 54 pp.
- Pérez-Cao, H. (2004). *Abundancia y distribución de la tonina Tursiops truncatus (Montagu, 1821) en dos áreas del archipiélago de Sabana-Camaguey, Cuba*. Tesis presentada en opción al título académico de Master en Biología Marina y Acuicultura con Mención en Biología Marina. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Cuba. 86 p.
- Pérez-Cao, H., N. López, M. Blanco y G. González (2009). Abundancia y distribución del delfín tonina (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) en la costa norte de la provincia de Matanzas, Cuba. *Rev. Invet. Mar.* 30(1):55-61.
- Perrin, W.F. y Myrick Jr, A.C. (1980). Age determination of toothed whales and sirenians. *Rep. int. Whal. Commn* (3). 229pp.
- Quérrouil, S., M. A. Silva, L. Freitas; R. Prieto; S. Magalhães; A. Dinis; F. Alves; J. A. Matos; D. Mendonça y F. S. Hammond (2007). High gene flow in oceanic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) of the North Atlantic. *Conservation Genetics*.
- Raymond, M, F. Rousset (1995). GENEPOP (version 1.2). population genetic software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 86, 248–249.
- Read, A. J., R. S. Wells, A. A. Hohn y M. D. Scott (1993). Patterns of growth in wild bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. *J. Zool. Lond.* 231. 107-123.
- Read, A.J.; K.W. Urían; B.Wilson y D. M. Waples, (2003). Abundance of bottlenose dolphins in the bays, sounds, and estuaries of North Carolina. *Marine Mammal Science* 19 (1).59-73.
- Reynolds III, J. E. and S. A. Rommel, (1999). *Biology of Marine Mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington and London. 578 pp.
- Reynolds III JE, RS Wells, SD Eide (2000). *The Bottlenose Dolphin. Biology and Conservation*. University Press of Florida, Florida. Gainesville. FL. 288 pp
- Rice, D. W., (1998). *Marine mammal of the world. Systematics and distribution*. Special Publication No. 4, Society For Marine Mammalogy, Lawrence. KS.
- Rosell P.E., V. Forgetta, K. Dewar (2005). Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Molecular Ecology Notes*, 5, 830–833
- Sambrook J, E. F. Fritsch, T. Maniatis (1989). *Molecular cloning. a laboratory manual*, 2nd edition. *Cold Spring Harbor Press, New York*. 9.10-19.19.
- Sayigh L., P. Tyack, R. Wells y M.D. Scout. 1990. Signature whistles of free-ranging bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. stability and mother-offspring comparison. *Behav. Echol. Sociobiol.* 26.247-260.
- Sayigh, L., K. Urían, A. Bocconcelli, D. Koster, G. Jones, K. Halbrook y A. Read, (1998). Photo-identification and acoustic monitoring of bottlenose dolphins near Wilmington, NC, USA. Evidence for residency and extended home range. *The World Marine Mammal Science Conference. Abstracts*. Monaco, 20-24 January 1998. The Society for Marine Mammalogy. 160 pp.
- Scott, G. P. (1990). Management-oriented research on bottlenose dolphins by the Southeast Fisheries Center. En: Leatherwood S. y R.R. Reeves (Eds.) *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, USA. p 623-639.
- Scott, M. D., R. S. Wells y A. B. Irvine (1990). A long term study of bottlenose dolphins on the west coast of Florida. En. Leatherwood S. y R. R. Reeves (Eds.). *The Bottlenose Dolphins*. pp. 235-244.
- Seber, G. A. F. (1982). *The Estimation of Animals Abundance*. 2nd edition. Charles Griffin and Company, London.
- Sellas A.B., R.S. Wells, P.E. Rosel (2005). Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal fine scale geographic structure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Gulf of Mexico. *Conservation Genetics*, DOI 10.1007/s10592-005-9031-7
- Shane, S.H., R.S. Wells y B. Würsig, (1986). Ecology, Behavior and Social Organization of the Bottlenose Dolphin. A Review. *Marine Mammal Science* 2(1). 34-63.

- Shane, S. H. (1990a). Behavior and Ecology of the Bottlenose Dolphin at Sanibel Island, Florida. En. Leatherwood S. y R. R. Reeves (Eds.). *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, USA. pp. 245-265.
- Shane, S. H. (1990b). Comparison of Bottlenose Dolphin Behavior in Texas and Florida, with a Critique of Methods for Studying Dolphin Behavior. En. Leatherwood S. y R. R. Reeves (Eds.). *The Bottlenose Dolphin*. Academic Press, USA. pp. 541-558.
- Smith, J. F. (2002). Marine mammals. In, FAO species identification guide for fishery purposes. Vol. 3. Bony fishes part 2 (Opistognathidae to Molidae), sea turtles and marine mammals. Ed. Carpenter, K. E. Rome. 2031 pp.
- StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.
- Stevick, P.T.; J. Allen; P.J. Clapham; S.K. Katona; F. Larsen; J. Lien; D.K. Mattila; P.J. Palsboll; R. Sears; J. Sigurjonsson; T.D. Smith; G. Vikingsson; N. Oien y P.S. Hammond (2006). Population spatial structuring on the feeding grounds in North Atlantic humpback whales. *J. Zool (Lond.)*, 270. 244-255.
- Tamura K, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar (2007). MEGA 4. Molecular evolutionary genetic analysis (MEGA) Software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24,1596-1599.
- Tezanos-Pinto G., C.S. Baker, K. Russell, K. Martien, R.W. Baird, A. Hutt, G. Stone, A. A Mignucci-Giannoni, S. Caballero, T. Endo, S. Lavery, M. Oremus, C. Olavarria, C. Garrigue (2009). A worldwide perspective on the population structure and genetic diversity of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in New Zealand. *Journal of Heredity*, 100(1), 11-24.
- Weir B.S., C. C. Cockerham (1984). Estimating *F*-statistic for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Weigle, B. (1990). Abundance, Distribution and Movements of Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in Lower Tampa Bay, Florida. *Rep. Int. Whal. Commn (Special Issue 12)*. Cambridge, UK. pp. 195-201.
- Wells, R. S. (1986). *Structural aspects of dolphin societies*. Ph. D. Thesis. University of California, Santa Cruz. 98 p.
- Wells, R.S., (1991). The role of long-term study in understanding the social structure of a bottlenose dolphin community. En K. Prior and S.N. Kenneth (Eds.) *Dolphin societies. Discoveries and Puzzles*. University of California Press, Berkeley, CA. p. 199-225.
- Wells, R.S. y M. D. Scott, (1999). Bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). En: *Handbook of Marine Mammals*, Vol. 6. Academic Press. San Diego CA.
- Wells, R. S., M.K. Bassos, K.W. Urian, W.J. Carr y M.D. Scott (1996). Low-Level Monitoring of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Charlotte Harbor, Florida 1990-1994. NOAA Tech.Mem. NMFS-SEFSC-384, 36 pp. +8 Tables, 10 Figures and 5 Appendices.
- Wells, R.S., D. J. Boness, and G. B. Rathbun, (1999a). Behavior. En. John E. Reynolds III and Sentiel A. Rommel (eds), *Biology of Marine Mammals*. p. 324-422.
- Wells, R.S., H.L. Rhinehart, P. Cunningham, J. Whaley, M. Baran, C. Koberna and D.P. Costa, (1999b). Long distance offshore movements of bottlenose dolphins. *Marine Mammal Science*. 15(4). 1098-1114.
- Wells, R. S. y M. D. Scott (2002). Bottlenose dolphins. En. Willian F. Perrin, Bernd Wursig y J. G. M. Thewissen (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. pp. 122-127.
- Wells R. S (2003). Dolphin social complexity. Lessons from longterm study and life history In. *Animal Social Complexity. Intelligence, Culture, and Individualized Societies* (eds. Waal FBMde, Tyack PL), pp. 32-56. Harvard University Press, Cambridge.
- Wells *et al* (2004). Bottlenose dolphins as marine ecosystem sentinels. *Developing a health monitoring system*. Nicks and Notches. 2003.
- Würsig, B. y M. Würsig (1977). The photographic determination of group size, composition, and stability of coastal porpoises (*Tursiops truncatus*). *Science* 198. 755-756.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution*, 19. 395-420.
- Zbinden, K. (1986). Echolocation pulse design in bats and dolphins. *Myotis* 23. 195-200.

Ziane-Cherif, N. (1995). Recopilación de testimonios sobre avistamientos de toninas *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) en el Archipiélago Sabana y Camagüey. Memorias de la Jornada Científica 35 Aniversario. 21-22 de diciembre. Acuario Nacional de Cuba. 15 pp.

FIGURAS:

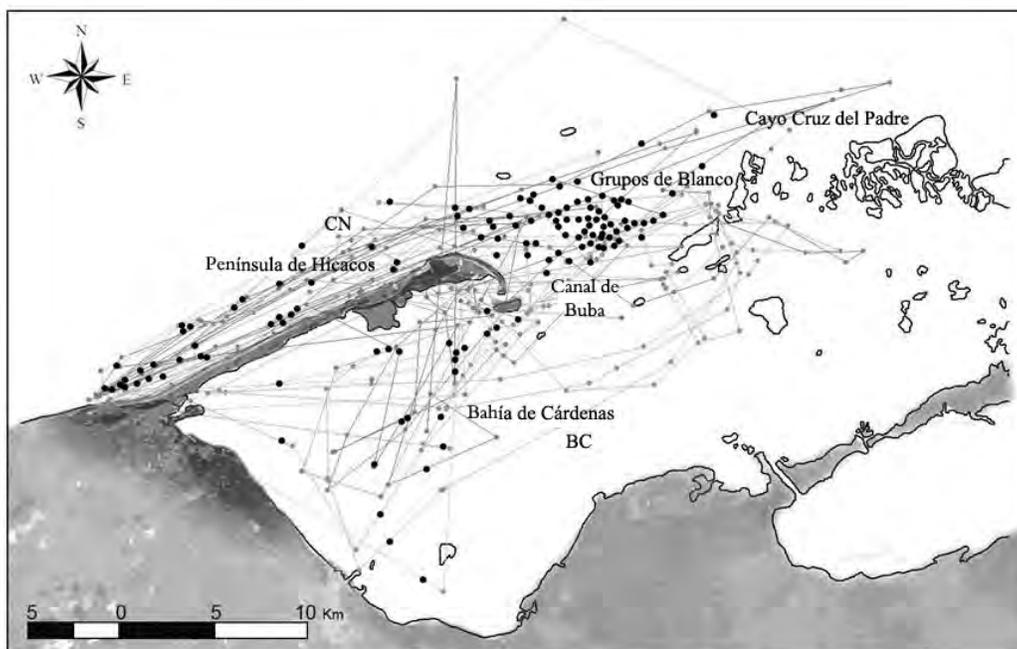


Figura 1: Distribución espacial de los avistamientos de grupos de delfines (*T. truncatus*) en la costa norte de Matanzas, Cuba, entre los años 2002-2009.

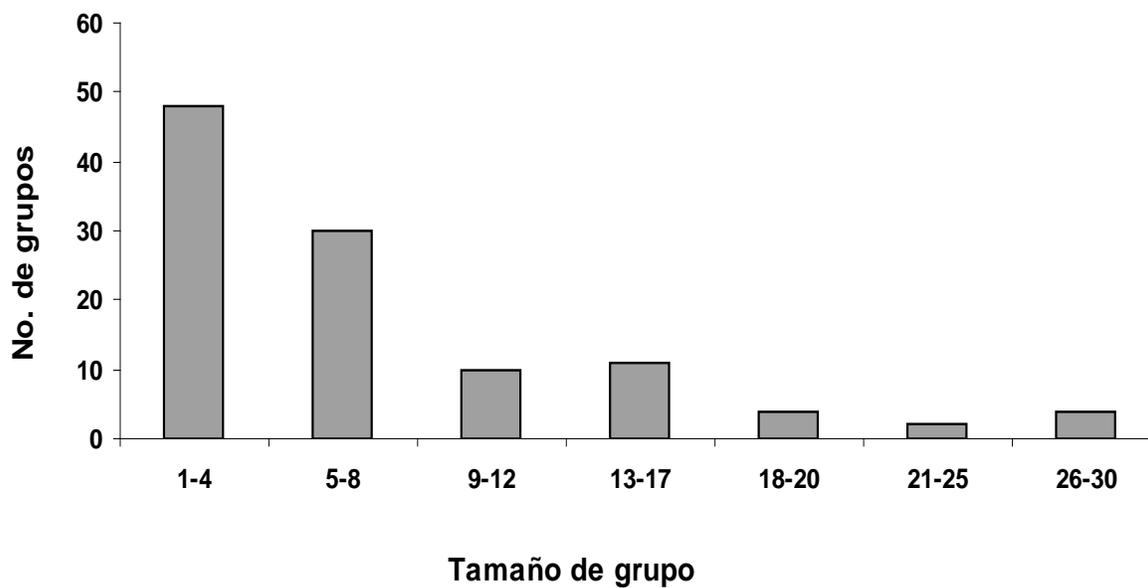


Figura 2: Frecuencia de los tamaños de grupo de delfines (*T. truncatus*) encontrados durante el período 2002-2009 en la costa norte de la provincia de Matanzas, Cuba

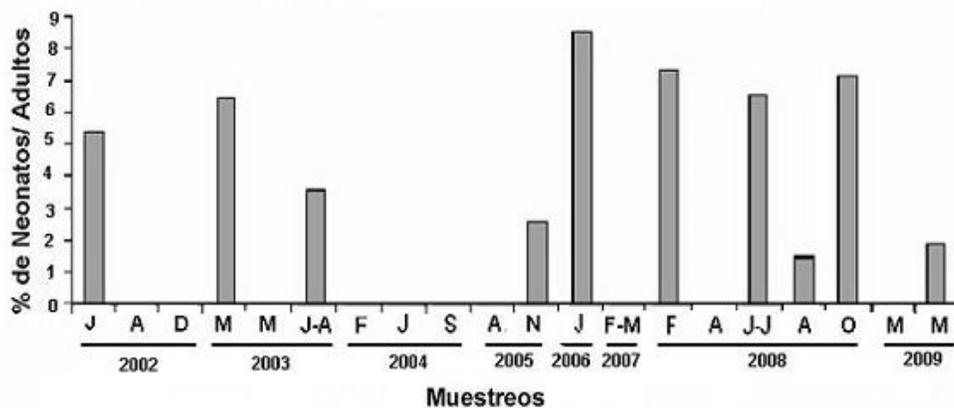


Figura 3: Porcentaje de neonatos respecto al total de adultos presentes en los grupos encontrados durante el período 2002-2009 en la costa norte de la provincia de Matanzas, Cuba

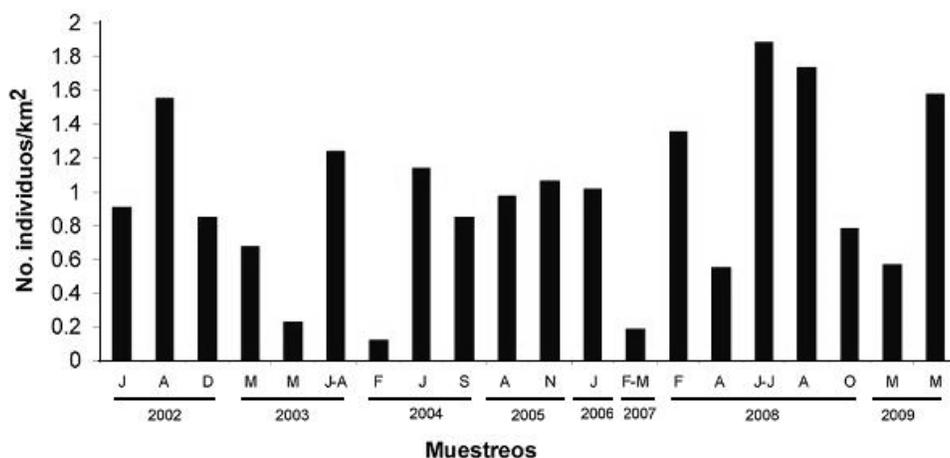


Figura 4. Valores de densidad de delfines (*T. truncatus*) encontrados durante el período de muestreo 2002-2009 en la costa norte de la provincia de Matanzas, Cuba

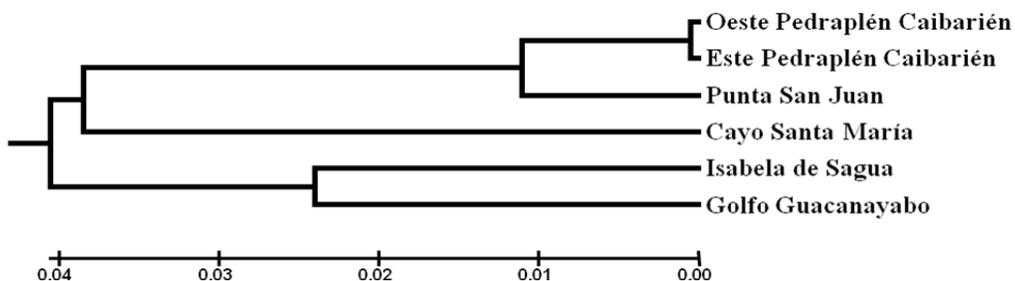


Figura 5. Árbol UPGMA no enraizado obtenido a partir de las distancias genéticas de Nei (1978), que muestra la relación de las localidades entre sí.

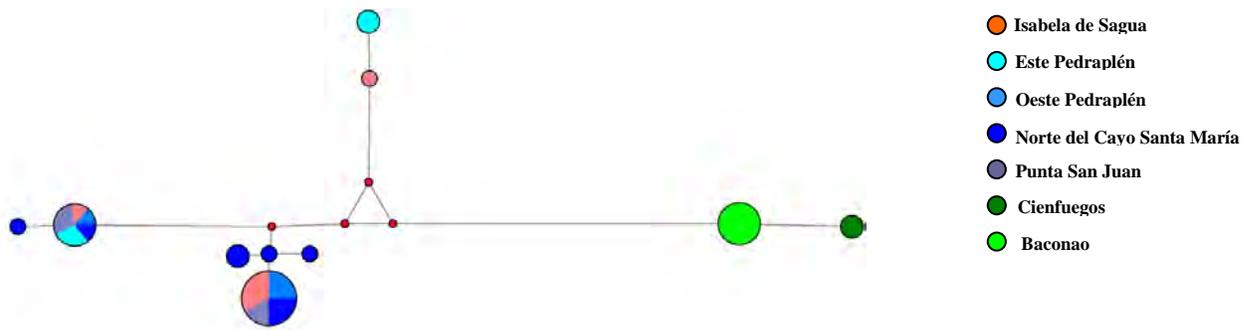


Figura 6: Rede de haplotipos de la región no codificadora del ADNmt de *Tursiops truncatus*. Los colores diferentes representan las diferentes localidades geográficas (ver leyenda). Los puntos rojos constituyen haplotipos inferidos que conectan haplotipos observados en la muestra. El diámetro de los círculos es proporcional al número de individuos que comparten un haplotipo dado.

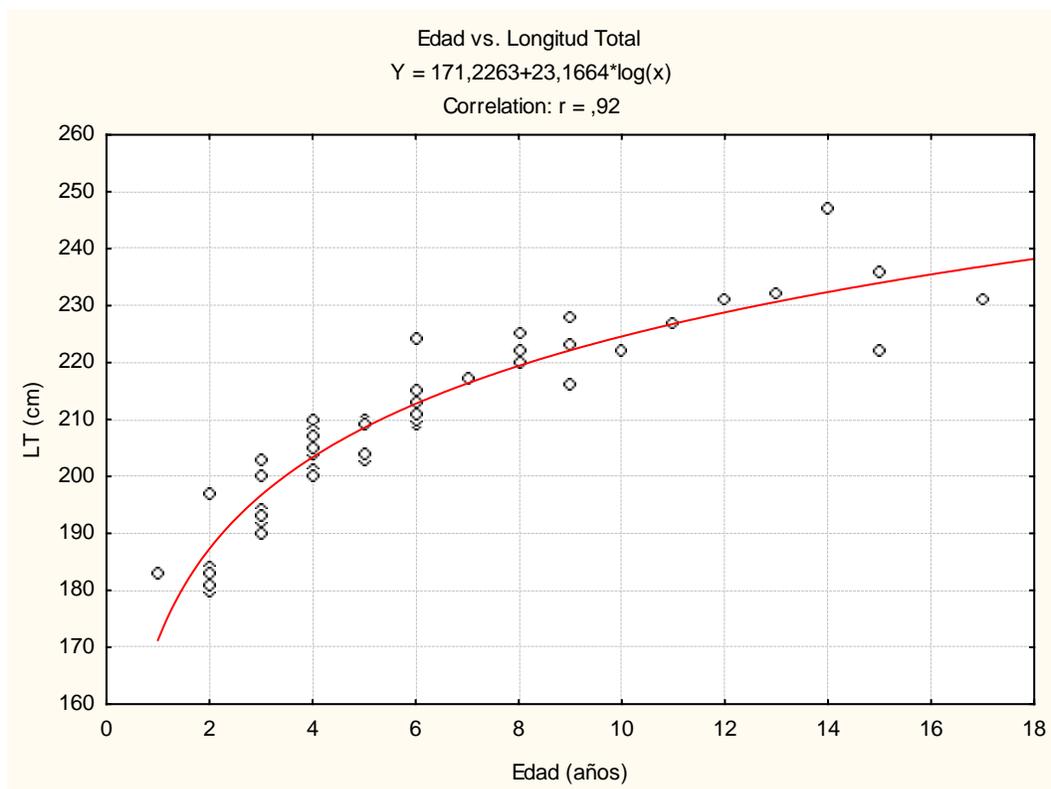


Figura 7: Curva de crecimiento del delfín tonina *Tursiops truncatus* para aguas cubanas. La edad se determinó contando las capas de crecimiento de dentina (1 año = 1 capa).

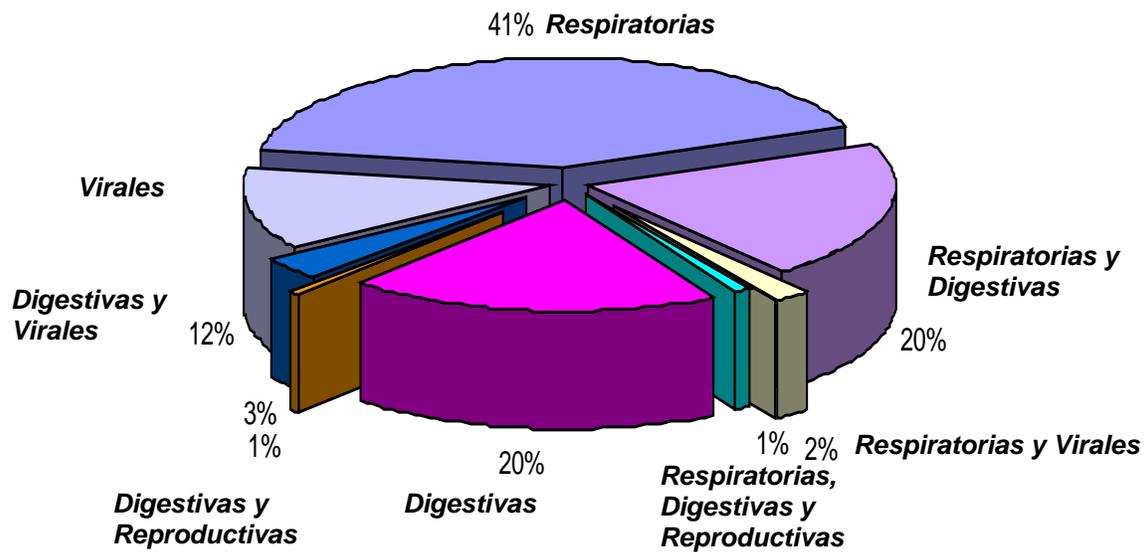


Figura 8: Frecuencia relativa de las enfermedades presentadas en vida libre por delfines *Tursiops truncatus* en el archipiélago Sabana-Camaguey en el período 2000-2009

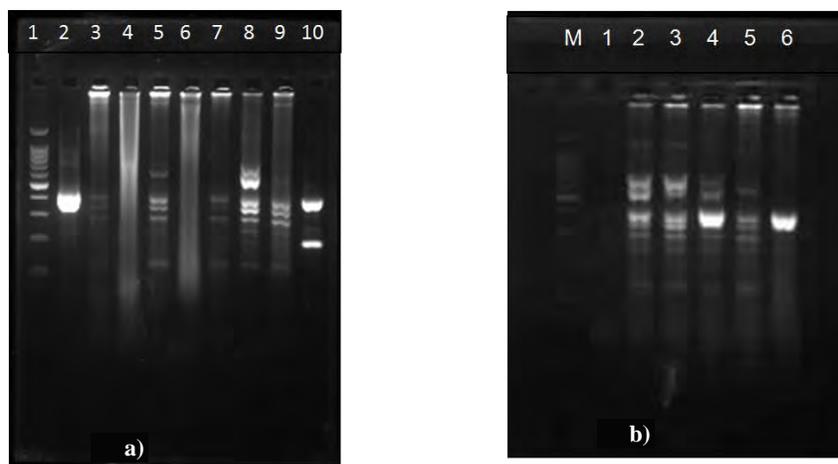


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% usando los primers: doL1F2MR y doL1B1MR. **a)** Línea 1: marcador de peso molecular 100pb Promega (5mL), línea 2: muestra 2, línea 3: muestra 3, Línea 4: muestra 4, línea 5: muestra 5, línea 6: muestra 6, línea 7: muestra 7, línea 8: muestra 8, línea 9: muestra 9, línea10: ADN papilomavirus bovino (control positivo). **b)** M: marcador de peso molecular 100pb Promega (1mL), línea 1: H2O (Control negativo), línea 2: muestra 10, línea 3: muestra 11, línea 4: muestra 12, línea 5: muestra 13, línea 6: muestra 14.

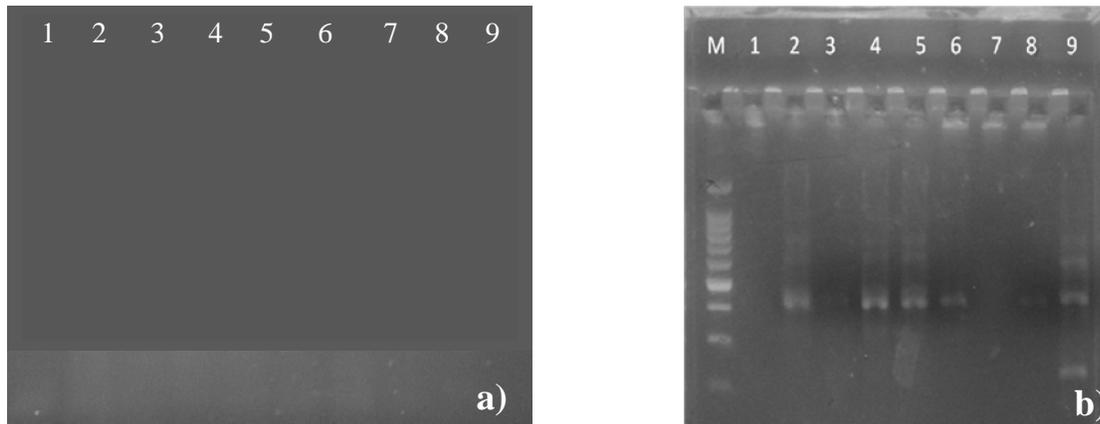


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% usando los primers de *VanDevanter et al.* (1996). **a)** Línea 1: control negativo, línea 2: muestra 1, línea 3: muestra 2, línea 4: muestra 3, línea 5: muestra 4, línea 6: muestra 5, línea 7: muestra 6, línea 8: control positivo (ADN-BoHV-1), línea 9: marcador de peso molecular. **b)** M: Patrón de peso molecular 100pb, línea 1: control negativo, línea 2: muestra 1, línea 3: muestra 2, línea 4: muestra 3, línea 5: muestra 4, línea 6: muestra 5, línea 7: muestra 6, línea 8: muestra 7, línea 9: control positivo (ADN-BoHV-1).

TABLAS:

Tabla 1: Número de muestras analizadas en sitios del archipiélago Sabana-Camaguey y en el golfo de Guacanayabo para el análisis de estructura genética de las poblaciones de *Tursiops truncatu*.

Localidad	Tamaño de muestra
<i>Archipiélago de Sabana-Camagüey</i>	95
- Isabela de Sagua	10
- Norte Cayo Santa María	34
- Oeste pedraplén	27
- Este pedraplén	16
- Punta san Juan	8
<i>Golfo de Guacanayabo</i>	12

Tabla 2: Esfuerzo de muestreo por expediciones y resultado de los avistamientos de delfines *T. truncatus* en la costa norte de Matanzas, Cuba, entre junio del 2002 y mayo de 2009.

Año	Salidas	Distancia recorrida (Km)	Tiempo de navegación (h:m)	No. de grupos avistados	No. de delfines observados
2002	Junio	204	15:44	4	37
	Agosto	255	22:33	5	79
	Diciembre	182	18:56	2	31
2003	Marzo	231	20:25	6	31
	Mayo	202	15:47	2	9
	Julio-Agosto	226	22:30	10	56
2004	Febrero	128	14:55	1	3
	Julio	97	9:06	2	22
	Septiembre	172	17:07	3	29
2005	Agosto	221	18:13	7	43
	Noviembre	184	14:48	7	39
2006	Julio	317	23:32	8	64
2007	Febrero-Marzo	223	12:52	4	8
2008	Febrero	151	10:54	3	41
	Abril	118	10:06	3	13

	Junio-Julio	234	24:06	16	88
	Agosto	205	17:18	13	71
	Octubre	167	13:17	3	26
2009	Marzo	267	18:42	6	30
	Mayo	338	22:37	12	107
2010	Marzo	296	29:28	9	77
	Abril-Mayo	350	28:15	8	73
Total		4768	401	133	977

Tabla 3: Distribución en el tiempo y frecuencia total de reavistamiento de individuos fotoidentificados de delfines (*T. truncatus*) en la costa norte de la provincia de matanzas, Cuba, entre el año 2002 y el 2009. Se excluye el año 2004, ya que en su única expedición no se realizaron fotoidentificaciones.

	2002			2003			2005		2006	2007	2008					2009		2010		Frecuencia absoluta
	J	A	D	M	M	J-A	A	N	J	F-M	F	A	J-J	A	O	M	M	M	A-M	
1													x	x	x	x	x	x	x	7
2								x					x	x	x		x	x		6
3			x					x	x				x	x	x			x	x	8
4			x			x							x	x						4
5								x						x	x	x	x		x	5
6							x						x				x	x		4
7													x				x	x	x	4
8													x		x		x		x	4
10								x	x		x		x	x				x	x	7
11								x	x				x	x		x		x	x	7
12						x		x	x				x	x	x				x	7
13		x				x		x						x	x	x	x			7
14													x				x	x	x	4
15													x				x	x	x	4
15													x				x	x	x	4
19	x			x					x		x					x		x		6
20				x					x		x	x	x	x						6
21			x											x	x	x				4
22			x										x					x	x	4
23		x									x						x	x		4
25		x	x					x	x				x	x	x			x	x	9
27	x								x		x						x			4

29			x	x				x	x				x	x	x			x	x	9
30				x						x			x	x			x	x	x	7
31									x				x				x			3
32									x				x				x	x		3
32									x						x		x	x		4
34	x	x	x										x	x		x	x			7
35									x						x		x	x		4
36						x							x	x		x	x	x		7
37								x						x			x		x	4
44	x								x											3
66													x				x	x		3
73													x				x	x	x	4
83													x				x	x	x	4
84									x				x					x	x	4
92						x							x				x	x	x	5
98									x									x		3
107														x	x			x	x	4
112									x	x										3

Tabla 4. Estimados de variabilidad para cada uno de los *loci* microsatélites analizados en los diferentes sitios de muestreo de *Tursiops truncatus*. A: número promedio de alelos por *locus*, Rs: riqueza alélica. *Ho*: heterocigosidad observada, *He*: heterocigosidad esperada, *Ht*: heterocigosidad total.

<i>Locus</i>	Isabela de Sagua	Zona Oeste	Cayo St. María	Zona Este	Punta San Juan	Golfo de Guacanayabo	Media	Ht
Ttr04	4	6	5	5	4	3	4.5	0.689
Ttr34	5	6	6	5	4	3	4.8	0.624
Ttr48	4	6	5	5	5	5	5	0.746
MK6	6	6	6	6	5	5	5.6	0.821
Mk8	4	8	8	7	5	6	6.3	0.852
A	4.6	6.4	6	5.6	4.6	4.4		
Rs	4.19	4.66	4.64	4.59	4.41	3.97		
<i>Ho</i>	0.57	0.54	0.53	0.63	0.62	0.52		
<i>He</i>	0.74	0.74	0.75	0.73	0.76	0.67		
±DS	±0.735	±0.098	±0.081	±0.156	±0.046	±0.168		

Tabla 5. Estimados de diferenciación genética (F_{ST}) por pares de localidades. Abreviaturas de las localidades como en la Tabla *.

Localidad	I. de Sagua	Oeste Pedraplén	Cayo St. María	Este Pedraplén	Punta San Juan
Oeste Pedraplén	0.010(NS)				
Cayo St. María	0.0162(NS)	0.0106(NS)			
Este Pedraplén	0.0169(NS)	0.0100(NS)	0.0109(NS)		
Punta San Juan	0.0094(NS)	0.0005(NS)	0.0255(NS)	0.0029(NS)	
Guacanayabo	0.0092(NS)	0.0192(NS)	0.0222(NS)	0.0140(NS)	0.0499(*)

Tabla 6. Estimados de diversidad genética obtenidos para *Tursiops truncatus* mediante la secuenciación parcial de la región de control ADNmt. N: número de muestra; h : número de haplotipos; Hd : diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica; D : estadístico D de Tajima ; n.s.: estadísticamente no diferente de cero.

Localidad	N	No. Sitios polimórficos	h	Hd	π	D
Isabela de Sagua	6	13	3	0.60±0.05	0.010±0.004	-1.031 n.s.
Norte Cayo Santa María	9	10	6	0.89±0.09	0.008±0.002	-1.031 n.s.
Oeste pedraplén	4	7	2	0.50±0.27	0.008±0.004	-0.817 n.s.
Este pedraplén	4	13	2	0.67±0.20	0.019±0.006	2.248 p<0.05
Punta San Juan	4	7	2	0.67±0.20	0.010±0.003	2.179 n.s.
Guacanayabo	9	2	2	0.39±0.16	0.002±0.001	0.0007 n.s.

Tabla 7: Rangos de valores hematológicos normales para el delfín tonina *Tursiops truncatus* de aguas cubana. (muestras= 424, 225 delfines)

Parámetro	N	Media	Err.Est.	Min 25%	Max 75%
Hemograma					
Hb (g/dl)	350	15,11	0,072	14,3	15,9
Ht (/100)	337	0,46	0,002	0,44	0,49
RBC (*1012/l)	199	3,72	0,033	3,4	4
WBC (*109/L)	351	7,81	0,134	6	9,3
Neut (%)	332	0,56	0,007	0,49	0,65
Banda (%)	313	0,01	0,002	0	0
Linf (%)	330	0,29	0,006	0,21	0,35
Eos (%)	328	0,13	0,005	0,06	0,17
Mono (%)	323	0,01	0,001	0	0,02
Bas (%)	308	0	0	0	0
Hemoquímica					
Fe (mg/dl)	54	177,57	9,925	140,7	200
Fibrin (mg/dl)	28	351,03	27,796	265,5	495
Glu (mg/dl)	362	114,2	1,628	95	129
Crea (mg/dl)	329	1,54	0,31	1	1,4
Urea (mg/dl)	216	99,93	3,134	60,45	129
UA (mg/dl)	63	0,5	1,534	0,25	1,05
P.T (g/dl)	306	7,4	0,058	6,9	8
Chol (mg/dl)	305	191,23	3,373	157	224
ALAT (UI/l)	365	36,06	0,913	25,1	42,5
ASAT (UI/l)	312	296,55	7,251	220,65	375,5
Bil (mg/dl)	302	63,23	2,977	0,5	103
ALP (UI/l)	306	849,79	34,188	443	1145
GGT (UI/l)	255	22,03	0,9	14,5	26,4
TG (mg/dl)	249	101,19	1,727	82,2	114
CK (µg/dl)	183	162,78	7,421	108	189
K (mE/l)	230	5,96	1,63036	3,8	4,6