

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS .**



**DIFERENCIACION GENETICA INTRAESPECIFICA DEL LOBO
MARINO (*Zalophus californianus*) ENTRE POBLACIONES
SEPARADAS POR UNA BARRERA GEOGRAFICA EN LA COSTA
DEL OCEANO PACIFICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

FLAVIO ORTA DAVILA

Ensenada, B.C.

Marzo de 1993.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la autorización de las siguientes organizaciones:

"Marine Mammals Protection" para la obtención del permiso No. 579 referente a las muestras de Islas San Miguel y San Nicolas.

"Secretaría de Pesca" para la colecta de muestras en el área de Punta Banda y Bahía de los Angeles, Baja California bajo el permiso No. 1899.

"Secretaría de desarrollo Social" (Instituto Nacional de Ecología) Dirección de aprovechamiento de recursos naturales, para llevar a cabo la exportación de muestras nacionales, a los Estados Unidos bajo el Permiso No. 1060.

AGRADECIMIENTOS.

Al final de este camino quiciere dar las gracias a todas esas personas que de una u otra forma participaron para que este proyecto pudiera dar fin a mi Maestría. Primeramente, a las personas que me dieron su apoyo en mis momentos más difíciles, al P. José Natividad Vázquez, Conal D True, Ma. del Socorro Orozco e Ixchel, por su infinito amor y paciencia, así como Ali y Guillermo, Kori, Pete, Gigo. A Hugo y Corina, Cyndy, Arizbee, Araceli y Marc (el mejor equipo de campo que pude haber tenido) y Ringo, por significar seguridad (en primeros auxilios) durante la salida a Bahía. Ana Elena, gracias por tu apoyo incondicional durante tu estancia en Ensenada, así como Toni, y Toño. A Rafael y Maria Elena y a todo el grupo parroquial.

A mis Padres por significar todo lo que soy y he logrado así como mi familia entera y Gloria, gracias por todos los bellos momentos.

Y de la manera más especial, quiero agradecer a quienes sin ellos, éste proyecto jamás se hubiera podido llevar a cabo. Hablo del Doctor Bob Wayne, Jesús Maldonado, Angie, Lisa Lau, Lisa Torres, Klauss, Derek, Gary, Eli y demás compañeros del Laboratorio en UCLA además del Doctor Bren Stewart y Anne Zorrilla, por sus acertadas asesorías y ayuda incondicional. A mis sinodales, Jorge De la Rosa Velez, Guillermo Villarreal, Rene

Pinet, Teresa Viana y Brent Stewart, por sus acertados consejos durante las revisiones de este trabajo. Al maestro Jorge De la Rosa, gracias por transmitirme los conocimientos necesarios y motivarme a plantear una investigación como ésta, además de su incondicional disponibilidad para escucharme y ayudarme dentro de lo posible.

A CONACyT agradezco todo el apoyo económico y manutención que me dió durante los 2 años de mi Posgrado y a la Secretaría de Pesca y SeDe Sol, su gran apoyo y confianza para otorgar los permisos necesarios que se ocuparon para que la vinculación interuniversitaria se pudiera llevar a cabo.

Dedico esta tesis de manera muy especial a mis padres, amigos y compañeros de generación y a Juan A carvajal Dávila y José Alejandro Romero Dávila, hermanos de mi infancia que no estarán ya más conmigo.

TITULO

DIFERENCIACION GENETICA INTRAESPECIFICA DEL LOBO
MARINO (Zalophus californianus) ENTRE POBLACIONES
DE DOS ZONAS SEPARADAS POR UNA BARRERA GEOGRAFICA,
EN LA COSTA DEL OCEANO PACIFICO.

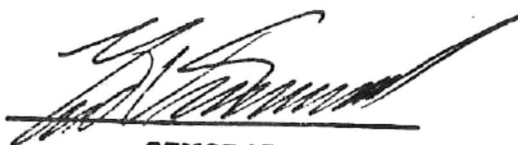
TESIS

que presenta:
FLAVIO ORTA DAVILA

Aprobada por:



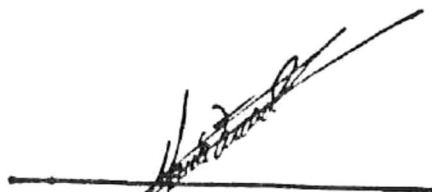
DR. JORGE DE LA ROSA VELEZ
PRESIDENTE DEL JURADO



SINODAL
DR. GUILLERMO VILLAREAL CHAVEZ



SINODAL
M.C. RENE PINET PLASCENCIA



SINODAL
DRA. TERESA VIANA CASTREJON



SINODAL
DR. BRENT STEWART

RESUMEN.

La diferenciación intraespecífica del lobo marino Californiano (Zalophus californianus) fue determinada para 4 localidades distintas (Islas San Miguel y San Nicolás en California, EUA y Punta Banda y Bahía de los Angeles, Baja California, México. Se replicó y purificó el ácido desoxiribonucleico mitocondrial (ADN mt) mediante la Reacción de Polimerasa en Cadena usando los fragmentos hipervariables del citocromo b y la Región Control. Las secuencias comparativas alineadas respecto al origen y dirección de las réplicas de ADN mostraron un solo genotipo respecto al citocromo b y 11 genotipos para la Región Control. El grado de divergencia secuencial fue calculado con el Análisis de Parsimonia mismo que generó los 4 árboles filogenéticos más parsimoniosos. Los máximos valores de divergencia secuencial (0.3 - 5.5%) coincidieron con los árboles obtenidos considerando a los lobos marinos del Golfo de California como un grupo separado respecto a los otros. El Análisis estadístico G1 (-1.74), los Índices de Consistencia (0.87), Homoplasia (0.13) y Retención (0.86) demostraron la validez de los datos filogenéticos. Se encontraron 16 sustituciones nucleotídicas consideradas como cambios informativos de los cuales 11 fueron transiciones y 5 fueron transversiones. Todos estos resultados apoyaron la idea de la influencia que han ejercido un reciente cuello de botella poblacional y la presencia de la Península de Baja California como una considerable barrera geográfica.

CONTENIDO

INTRODUCCION		1
METODOLOGIA		10
RESULTADOS		42
DISCUCIONES		56
CONCLUSIONES		74
LITERATURA CITADA		75
APENDICE		87

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- Mapa del ADNmt mostrando la ubicación	 7
de las dos regiones consideradas para esta investigación.	
FIGURA 2.- Ubicación geográfica de las 4 áreas	 12
consideradas para la colecta de tejido de lobos marinos.	
FIGURA 3.- Modos de muestreo empleados para	 14
obtener tejido de lobo marino,	
I. Mediante uso de redes y II. Mediante el uso de arpón	
FIGURA 4.- Dispositivo desechable de biopsia	 15
utilizado para las colectas de tejido de lobo marino indicando la particular adaptación de un arpón de madera empleado como segunda herramienta de muestreo.	
FIGURA 5.- Calidad del ADNmt utilizado para las	 35
reacciones de secuenciación que se llevaron a cabo durante la etapa final de laboratorio.	
FIGURA 6.- Modo de lectura empleado durante la	 37
etapa de análisis de bandas de secuenciación mostrando el sitio particular para el cambio de cebador.	
FIGURA 7.- Análisis filogenético de las	 48
secuencias obtenidas para los lobos marinos mostrando los 4 árboles más parsimoniosos y sus valores obtenidos para las variables correspondientes.	
FIGURA 8.- Consenso global de los 4 árboles más	 50
parsimoniosos mostrando el porcentaje de interrelación entre los grupos de lobos marinos (SN=San Nicolás, SM=San Miguel, PB=Punta Banda, G=Golfo de California).	
FIGURA 9.- Análisis gráfico de la distribución	 55
de frecuencias obtenido en base a un muestreo al azar, de 1000 árboles generados por el programa (PAUP Vers 3.0) mostrando el valor estadístico de G1.	

INDICE DE TABLAS

TABLA I.-	Información sobre los muestreos realizados indicandio la ubicacion geográfica de las áreas, tipo de procedencia de las muestras y modo de preservación de las mismas. de las dos regiones consideradas para esta investigación.	 11
TABLA II.-	Simbologia y su significado para agunas adreviaturas presentes en la metodologia.	 19
TABLA III.-	Cracterización de las regiones replicadas del ADNmt de lobo marino indicando el codigo correspondirnte para cada cebador (primer) asi como la secuencia del mismo.	 22
TABLA IV.-	Valores de distancias geneticas (abajo) y divergencia genetica (arriba) correspondientes a las comparaciones de organismos para las 4 areas geograficas (SN=San Nicolás, SM=San Miguel, PB=Punta Banda, G=Golfo de California).	 43
TABLA V .-	Valores de distancias geneticas (abajo) y diverjencia secuencial (arriba) correspondientes a las comparaciones intragrupales de los organismos.	 45
TABLA VI.-	Valores de distancia genetica (abajo) y divergencia secuencial (arriba) correspondientes a las comparaciones de organismos para la franja Pacifica (SN=San Nicolás, SM=San Miguel, PB=Punta Banda).	 46
TABLA VII.-	Grupos de organismos relacionados en base a su afinidad y frecuencia (%) con que ocurren los mismos.	 49

TABLA VIII.-	Información sobre las mutaciones que se presentaron a lo largo del estatus real de los datos mostrando el tipo de cambio y área geográfica en que se presentó (SN=San Nicolás, SM=San Miguel, PB=Punta Banda, G=Golfo de California)(Gu=Guanina, Ad=Adenina, Ti=Timina).	 52
TABLA IX.-	Composición porcentual de bases nucleotídicas en los fragmentos hipervariables de la Region Control y Citocromo b del lobo marino mostrando un promedio global.	 53
TABLA X.-	Comparación de los porcentajes obtenidos para las bases nucleotídicas del lobo marino respecto a los porcentajes de otros vertebrados de sangre caliente.	 54

INTRODUCCION.

Conocer la variabilidad y grado de diferenciación genética en organismos superiores resulta ser hasta la actualidad, un problema para definir la especiación. Dentro de los mamíferos marinos, los pinípedos muestran esta situación (Arnason, 1977). En particular, el lobo marino (Zalophus californianus) presenta una distribución que va desde las costas de Mazatlán, en México hasta las costas de Columbia Británica, en Canadá (Peterson y Bartholomew, 1967; Antonelis y Fiscus, 1978).

Se sabe que el lobo marino de California presenta aspectos migratorios dentro de su rango geográfico actual. Jones (1981) en sus trabajos con mamíferos marinos en el norte de California, detectó que los machos y en algunas ocasiones, los subadultos del mismo sexo migran al norte hasta Columbia Británica durante septiembre - octubre y en marzo, retornan al sur de California y Baja California, aunque este patrón de migración no incluye a los lobos marinos del Golfo de California (Aurióles, 1983).

Las fluctuaciones en el número de individuos de una población pueden clasificarse básicamente en 4 formas:

Dispersión, movimientos locales dentro de una distribución habitual, nomadismo y migración (Caughley, 1977; Maravilla, 1986; Orta, 1988). Respecto a la migración de los mamíferos marinos, se piensa que la cantidad de energía demandada y los cambios en la amplitud del día son factores determinantes en este comportamiento (Maravilla, 1986). En el caso de los pinípedos, parece estar además, en función de la necesidad de mantener las áreas reproductivas terrestres y buscar mejores lugares para la alimentación. Aurióles (1982) detectó un comportamiento constante en lobos marinos:

" Intercambio de individuos entre las colonias reproductivas y no reproductivas del Golfo de California antes y después de la reproducción, a principios y fines de invierno ".

El Golfo de California cuenta con un alto potencial de recursos pesqueros (Arvizu, 1987; Sokolov, 1973; Badan et al., 1986). Esto ha provocado la numerosa proliferación y formación de loberas de caracter reproductivo situadas a partir del cinturón insular hacia la provincia norte del golfo (Maravilla, 1986). Por estas condiciones, se pensó en la posibilidad de que los lobos marinos del Océano Pacífico empezaran a tener alguna diferenciación genética con las colonias de lobos marinos situadas en el Golfo de California, pues los movimientos del lobo marino, tanto de salida como de entrada al golfo, no son evidentes.

En general, se sabe que los vertebrados, y en particular, los mamíferos marinos, tienden a tener más bajos niveles de variabilidad genética que otros organismos como los invertebrados, incluso esto es más evidente cuando los organismos son superiores en tamaño y de caracter móvil (Selander y Kaufman, 1973; Ayala y Kigler, 1985).

Estudios hechos con elefantes marinos por McDermid et al., (1972) y Bonnell & Selander (1974) han explicado esta baja variabilidad genética como una posible respuesta de la especie ante una casi total disminución de la población (por factores múltiples) lo cual produce un cuello de botella. Se piensa que este concepto sea igualmente aplicable para el lobo marino de California ya que esta población de organismos sufrió fuertes descensos por depredación y explotación durante el siglo XIX (Steverson, 1904, Townsend, 1918, Townsend, 1919, Scheffer, 1928) quedando así solo unos cuantos que actualmente han poblado las aguas del Océano Pacífico llegando a ser 175,000 individuos (incluyendo todo el rango geográfico abarcado por la especie) de los cuales, el 16% se encuentran en el Golfo de California (Maravilla, 1986; Orta, 1988).

Por lo tanto, la estructura geográfica de cualquier especie es un producto de ambos, flujo génico histórico y contemporáneo y es a su vez afectada por impedimentos geográficos o ecológicos para el movimiento y capacidad inherente de dispersión (Bowen y Avise, 1990).

Para investigar la estructura genética de un stock, uno debe estudiar los caracteres genéticos que demuestren suficiente variación para permitir la diversificación de un stock respecto a otro (Graves et al., 1984; Graves y Dizon, 1989). Esto significa que antes de usar las técnicas de marcaje, radiotelemetría y seguimiento, los fundamentos genéticos aportan información más confiable sobre la especie cuando no hay evidencias morfológicas visibles y se desea establecer una diversificación o rasgos de emparentamiento entre organismos de una misma especie.

Aunque el poder discriminante de estas técnicas genéticas se ve a menudo limitado por el bajo polimorfismo existente antes mencionado, recientemente, los análisis químicos relacionados con el ácido desoxiribonucleico (ADN) proporcionan rasgos únicos sobre la estructura genética de una población.

El ADN mitocondrial (ADN mt) es una molécula circular usualmente de 14,000 a 26,000 pares de base y, en particular para los pinlipedos es aproximadamente de 16,826 pares de bases (Arnason y Johnsson, 1992)

(Figura 1). Esta molécula se encuentra presente en altas cantidades dentro de la célula. Es generalmente fácil de extraer y purificar (Brown, 1983) además de tener homoplasmicidad; esto es, todas las moléculas son idénticas en un organismo por lo tanto cualquier tejido puede ser usado como una reserva.

La tasa de substitución nucleotídica en el ADN mt en vertebrados superiores es aproximadamente 5 a 10 veces mayor a la del genoma nuclear y por esto se engrandece la capacidad de resolución para estudios a nivel poblacional (Billington y Herbert, 1991).

El ADN mt, maternalmente heredado y de característica no recombinante es por lo tanto más susceptible a mostrar diferencias entre poblaciones. Por ello se considera como una herramienta excepcional para discriminar stocks ya que retiene la historia de aislamiento preterito de tal forma que el genoma nuclear no puede. Esto permite pensar en la factibilidad de que una población pueda llegar a fijarse por diferentes tipos de ADN mt es decir, divergencia secuencial.

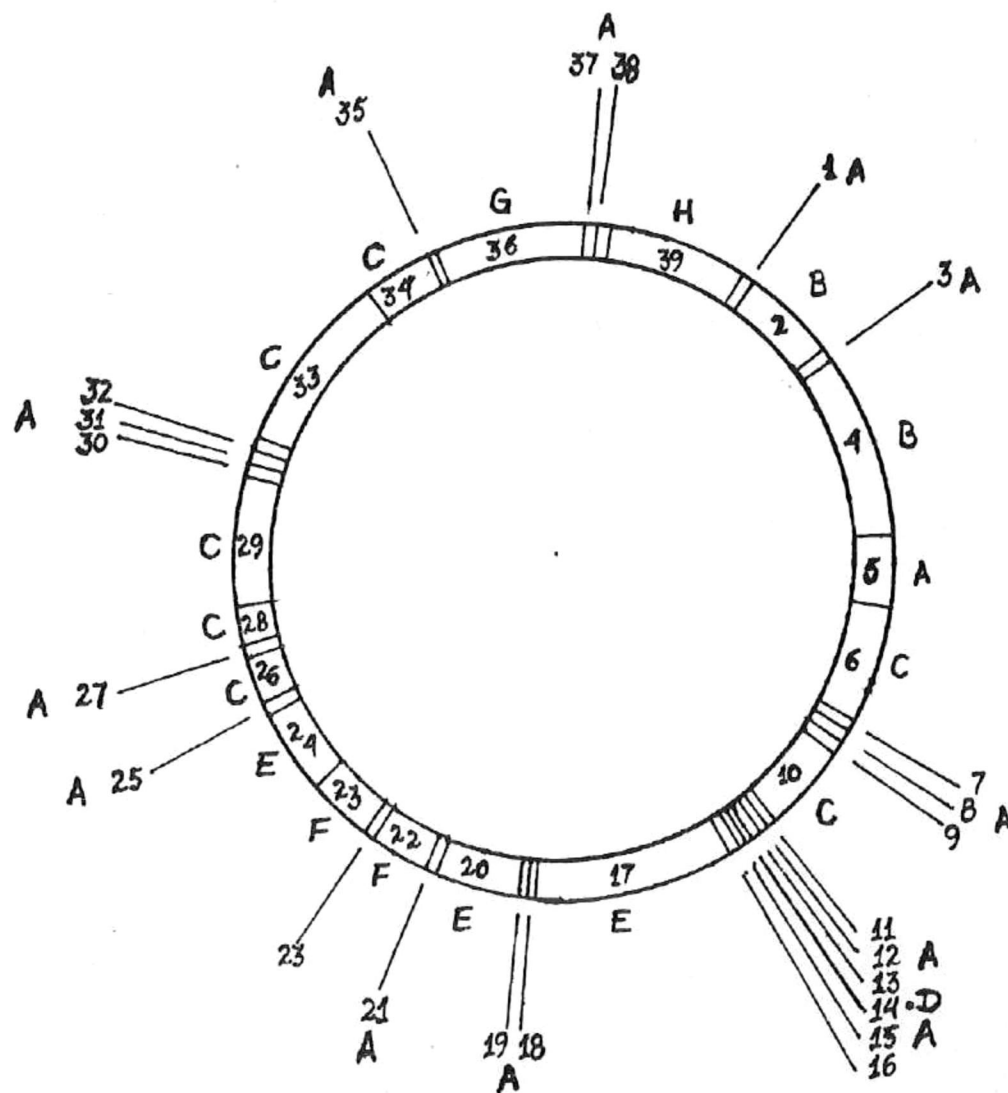


FIGURA 1. MAPA DEL ADN mt MOSTRANDO LA UBICACION DE LAS DOS REGIONES (G y H) CONSIDERADAS EN ESTA INVESTIGACION.

La manera de conocer esta divergencia es comparando patrones de fragmentación, de sitios de restricción, o bien, de secuencia de nucleótidos lo cual se lleva a cabo mediante una replicación enzimática de fragmentos o segmentos del genoma mitocondrial. A este análisis se le conoce como la Reacción de Polimerasa en Cadena (RPC) (Beckenbach, 1991) y sus ventajas principales como técnica son: 1)ser una técnica rápida, 2)utilizar una cantidad minúscula de muestra, 3)considerar apto al material biológico parcialmente degradado.

La RPC usa una enzima ADN polimerasa, llamada Taq, extraída de una bacteria termófila (Thermus aquaticus) utilizada para replicar fragmentos a partir de ADN parcialmente purificado.

El presente trabajo se planteó principalmente para conocer el grado de parentesco intrapoblacional en el lobo marino (Zalophus californianus), sin embargo cabe mencionar que las técnicas de laboratorio así como los resultados que de ellas se derivan resultaron ser innovadoras a nivel nacional ya que hasta la fecha no se ha generado una investigación que establezca

el uso de protocolos correspondientes a la secuenciación de los ácidos nucleicos. Las implicaciones que de este trabajo se desprendan podrían cambiar en un sentido conservacionista la manera de estudiar a esta especie ya que si existiesen diferencias significativas habría que distinguir la dinámica poblacional, ecología y otros aspectos para las subpoblaciones por separado (Dizon et al., 1992).

METODOLOGIA.

- ETAPA DE CAMPO.

Para llevar a cabo este estudio se tomó un total de 26 muestras de tejido, siendo 10 correspondientes a la Isla San Nicolas CA, 5 de Isla San Miguel CA, 3 de Punta Banda BC y 8 de Bahía de los Angeles (Golfo de California) sin embargo para los propósitos de este trabajo se utilizaron solo 4 muestras representantes para cada zona excepto Punta Banda (3 muestras) (Tabla 1 y Figura 2).

Los tejidos procedentes de Estados Unidos fueron proporcionadas por el Doctor Brent Stewart (Hubbs Sea World Research Institute, San Diego, CA) colectados durante septiembre - octubre de 1992 bajo el Permiso No. 579 otorgado por " Marine Mammals Protection ".

La colecta de muestras se realizó básicamente de dos formas diferentes:

- 1) Mediante el uso de redes individuales;

TABLA I. Información sobre los muestreos realizados indicando la ubicación geográfica de las áreas, tipo de procedencia de las muestras y modo de preservación de las mismas.

LOCALIDAD	UBICACION GEOGRAFICA	NUMERO DE MUESTRAS COLECTADAS (numero de muestras utilizadas) PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS	MODO DE PRESER- VACION.
Isla San Nicolas	119° 15' - 119° 28' 7" O 33 17 24 - 33 23 42 N	10 (4) / Crias lactantes	en campo: Refrigeración (- 4 oC) en laboratorio: Congelación (- 20 oC)
Isla San Miguel	120° 20' - 120° 30' 0 34° 06' - 34° 12' N	5 (4) / Crias lactantes	en campo: Refrigeración (- 4 oC) en laboratorio: Congelacion (- 20 oC)
Punta Banda	111° 03' 00" O 31° 40' 12" N	3 (3) / 1 hembra adulta 2 machos adultos	en campo: Refrigeración (- 4 oC) en laboratorio: Ultracongelación (- 72 oC)
Bahia de los Angeles (Golfo de California)	110° 07' 53" O 28° 46' 46" N	8 (4) / 3 hembras adultas 3 hembras subadult. 2 Crias lactantes	en campo: Refrigeración (- 4 oC) en laboratorio: Ultracongelacion (- 72 oC)

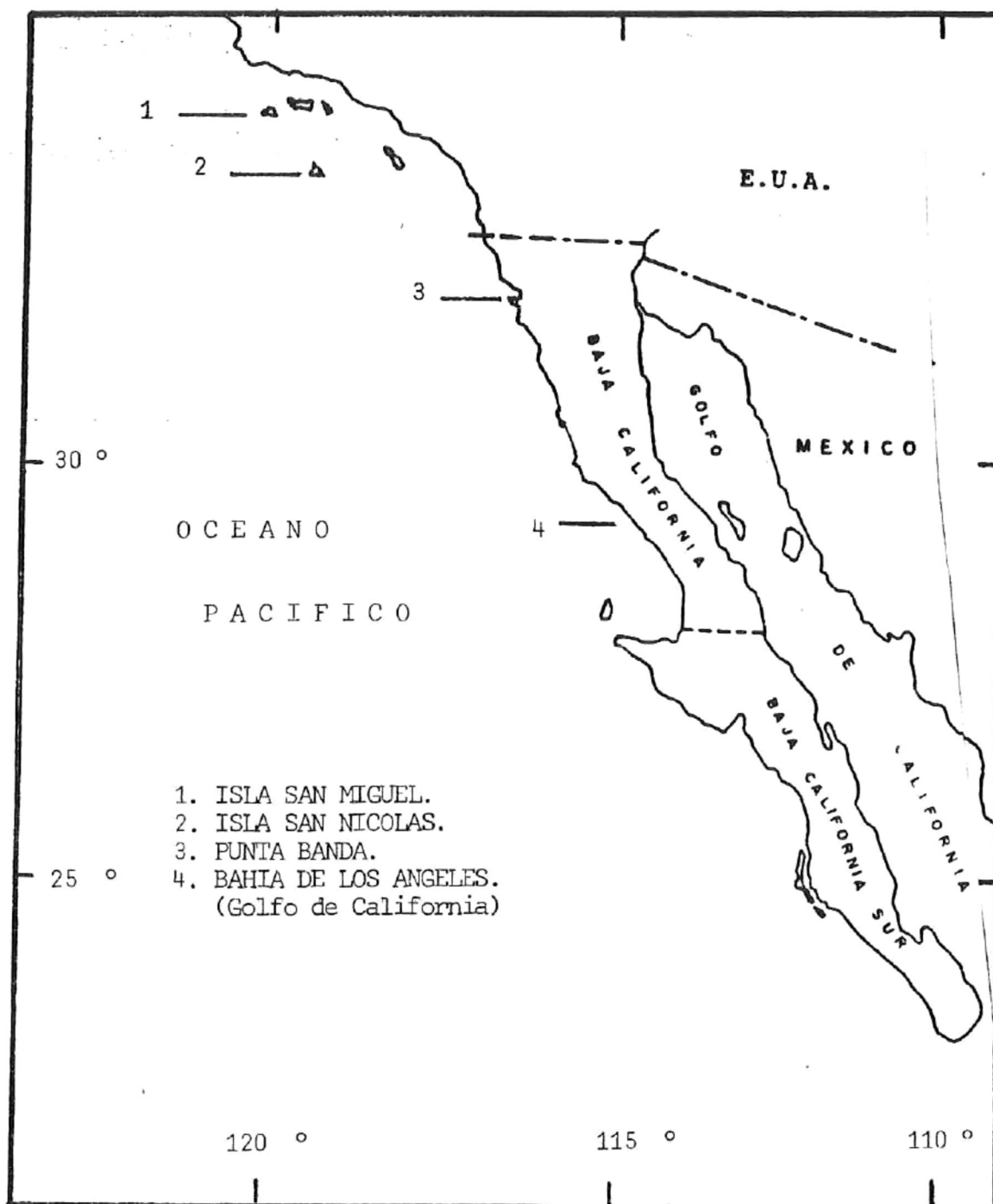
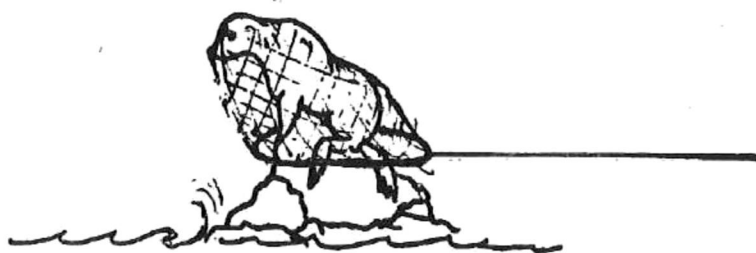


FIGURA 2. Ubicación geográfica de las 4 áreas consideradas para la colecta de tejido de lobos marinos.

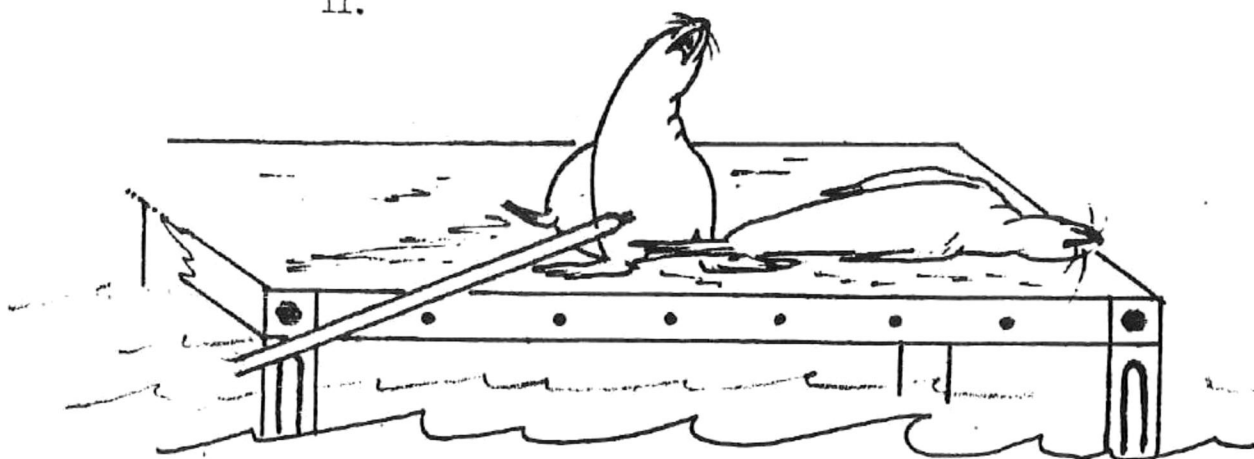
Haciendo el uso de embarcaciones menores se arribó al sitio esperado y mediante el uso de binoculares, se detectó la presencia de los animales. En seguida se procedió a hacer una circunnavegación para elegir el lugar adecuado y bajar a tierra. Una vez en tierra, se nadó una distancia portando las redes ligeras bajo el agua logrando así una aproximación silenciosa. Se seleccionaron animales que estuvieran separados de los grupos para evitar el disturbio de la población capturando rápidamente a cada individuo por separado e imposibilitándolo mediante el uso de la red individual con aro de aluminio y malla de monofilamento ($u = 15$ cm) y una tela que cubriera la cabeza, para evitar mordiscos (Figura 3).

Esta captura se hizo sin el uso de un sedante ya que el animal podría escapar al mar durante la maniobra y morir por ahogamiento. Las muestras de tejido se tomaron de la membrana interdigital que presentan las extremidades (ó aletas) mediante un dardo de biopsia (Figura 4).

I.



II.



FIGUA 3. Modos de muestreo empleados para obtener tejido de lobo marino, I. Mediante el uso de redes y II. Mediante el uso de arpón.

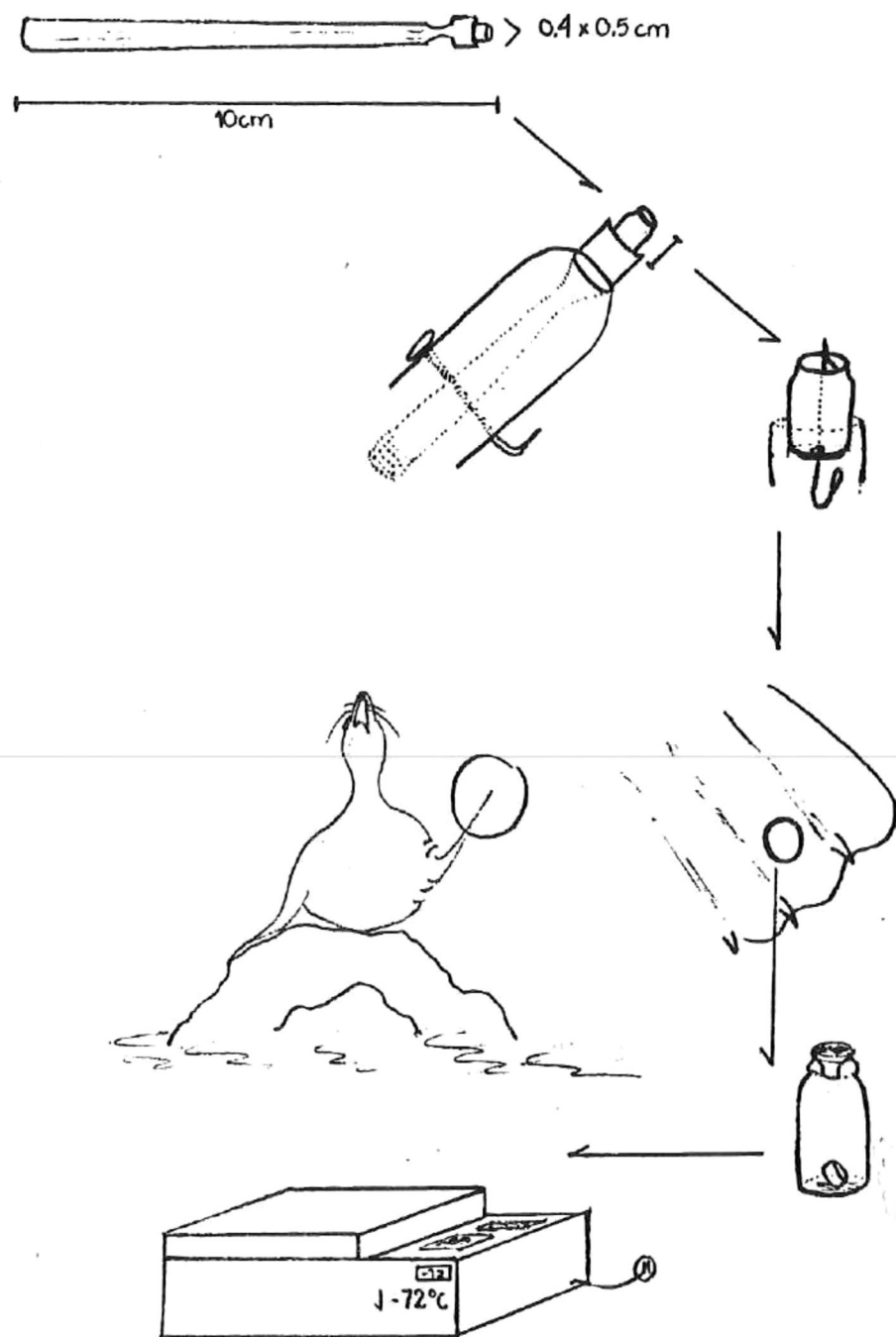


FIGURA 4. Dispositivo desechable de biopsia utilizado para las colectas de tejido de lobo marino indicando la particular adaptación de un arpón de madera empleado como segunda herramienta de muestreo.

2) Mediante un arpón de madera.

Considerando que el muestreador de biopsia era sumamente ligero y afilado para cortar al primer mínimo impacto, se tomó un palo de escoba (1.70 m) y se le hizo un agujero con un taladro casero usando una broca de 0.5 cm de diámetro. En seguida, se integró un anzuelo chico a la parte central del muestreador de biopsia de tal forma que la punta quedara al borde de la navaja circular y el anzuelo retuviera el tejido adentro del muestreador. Finalmente se introdujo el muestreador con anzuelo a través del horificio previamente hecho y se traspasó un clavo al nivel inferior interno para evitar que el muestreador quedara pegado al animal (Winn et al, 1973; Lambertsen, 1987; Matthews et al, 1988; Whitehead et al, 1990).

De igual manera a la técnica anterior, se logró un acercamiento tal que permitió el uso rápido y sin problema de esta herramienta causando un solo impacto rápido en el cuerpo del animal y cambiando el muestreador cada vez que se tratara de un animal distinto, esto, para evitar contaminación e infecciones (Figura 3).

Para ambas estrategias de colecta se usó un muestreador de biopsia esterilizado y desechable de 4 mm de diámetro interno y 5 mm de profundidad (Figura 4). Una vez que se obtuvo un fragmento pequeño de tejido por duplicado se transfirió este a un vial plástico etiquetado y de ahí a una hielera. La transportación de muestras se hizo bajo refrigeración o manteniendo una temperatura de al menos -2 - -5 °C. Al llegar este material al laboratorio se sometió a -72 °C en un ultracongelador hasta su posterior uso.

- ETAPA DE LABORATORIO.

* Todos los análisis de laboratorio así como el manejo de datos se llevaron a cabo en las instalaciones de la Universidad de California en Los Angeles, bajo la asesoría del Doctor Robert Wayne.

Para los análisis químicos sólo se utilizó una cuarta parte de cada muestra de tejido colectada, homogenizando cuidadosamente con navajas esterilizadas en una base de vidrio y poniendo el tejido sobre plástico acerado. De este modo, el vidrio no contaminaba la

muestra de tejido con el resto de otras. Además, las navajas utilizadas durante la maniobra, fueron desechadas cada vez. Todos los volúmenes manejados durante la etapa de laboratorio fueron agregados con pipetas neumáticas de precisión, ajustables, con puntas desechables (dependiendo del volumen: 1-20 μ l, 20-200 μ l y 1000 μ l) y en lo que respecta a las soluciones stock empleadas, todas fueron preparadas en base al Manual de laboratorio: Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989).

TRATAMIENTO DE LAS CELULAS.

Cada muestra de tejido homogenizado, se transfirió a un tubo Eppendorf (1.7 ml) que contenía 500 μ l de solución TRIS-EDTA pH 8.0 (10 x TNE: Tris-Cloro 0.01 M pH 8.0, 0.1 M NaCl y 0.001 M EDTA), 30 μ l de Proteinasa K y 40 μ l de duodecil sulfato de sodio al 10% (10% SDS). (Tabla II). Una vez realizado esto para todas las muestras, se resuspendió en cada una el tejido homogenizado usando un agitador de vórtice (Scientific Products Co). Esto permitió ampliar la superficie de acción para facilitar la lisis y liberar el ADN. Posteriormente se transfirieron todas las muestras a un incubador con baño de agua manteniendo una temperatura de 55 °C durante 24 horas.

TABLA II. Simbologia y su significado, para las abreviaturas presentes en el texto , a partir de la metodologia.

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
APS	Persulfato de amonio
DMSO	Dimetil sulfonato
dNTP	Base nucleotídica (G,A,T,C)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
FCI	Fenol-cloroformo-isoamilalcohol
RPC	Reacción de polimerasa en cadena
S35-dATP	Desoxiadenina alfa tio trifosfato
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SIGMACOTE	Solución de silicón
TAE	Amortiguador Tris-acetato-EDTA
TBE	Amortiguador Tris-borato-EDTA
TEMED	N ¹ - Tetrametiletilenamida
TNE	Amortiguador Tris-cloruro de - sodio- EDTA.

EXTRACCION CON FENOL - CLOROFORMO - ISOAMILALCOHOL.
(FCI).

Posterior a las 24 horas de incubación, a cada uno de los tubos Eppendorf se le adicionó una solución de fenol -cloroformo-isoamilalcohol (FCI: 25:24:1) en una cantidad igual a la contenida en cada tubo (aproximadamente 570 μ l). Esta mezcla permitió desnaturalizar las proteínas y facilitar la separación de la fase acuosa además, el isoamilalcohol se usó para reducir la cantidad de espuma generada durante la extracción. En seguida se transfirieron todos los tubos a un contenedor plástico con tapa y se agitaron suave y continuamente durante 5 minutos. Después, se centrifugaron todos los tubos durante 4 minutos a 13000 RPM en una máquina centrífuga Marathon con plato para microtubos.

Una vez separadas las dos fases, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo que contenía 570 μ l de solución FCI (25:24:1) y se procedió de igual manera, agitando y centrifugando para obtener una nueva fase acuosa la cual se transfirió a un tubo nuevo que contenía 570 μ l de solución CI (24:1), se agitó, se centrifugó y finalmente se separó la fase acuosa, en un tubo nuevo

Eppendorf estéril (1.7 ml) y vacío. Este extracto de ADN se mantuvo a 4 °C hasta los posteriores análisis. Todo el material de desecho fue cuidadosamente manejado para evitar la inhalación de vapores producidos por el fenol.

- REPLICACION DEL ADN mt USANDO LA REACCION DE POLIMERASA EN CADENA (RPC).

Se replicaron dos fragmentos hipervariables del ADN mt, uno ubicado en el citocromo b (425 pares de bases) y otro ubicado en la Región Control (400 pares de bases) mediante el uso de cebadores conservativos sugeridos por Kocher et al, (1989) (Tabla III).

Para llevar a cabo la Mezcla de reacción se utilizaron 33.7 µl de agua estéril, 5 µl de solución RPC amortiguadora 25 mM KCL, 5 µl de MgCl₂ 10 mM, 1 µl de mezcla dNTP (GATC) 10 mM, 1 µl de cada cebador ("primer" H y L) 25 pM y 0.3 µl de enzima Taq Polimerasa (por cada muestra de ADN para replicar).

Dependiendo del número de muestras que se deseaban replicar + un blanco + un extra, se hizo un cálculo

TABLA III. Caracterización de las regiones replicadas del ADNmt de lobo marino indicando el código correspondiente para cada cebador (o primer), así como la secuencia del mismo.

REGION REPLICADA	NOMBRE Y CODIGO DE LOS CEBADORES	SECUENCIA
CITOCROMO B	28: L 14724 34: H 15149	5'-CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG-3' 5'-GTAAACGACGGCCATACATGAATTGGAGGACA-3'
REGION CONTROL	27THRL L-15926 27DH1 H-00651	5'-TCAAAGCTTACACCAGTCTTGTAACC-3' 5'-TAACTGCAGAAGGCTAGGACCAACCT-3'

del volumen para la mezcla de reacción. Se llevó a cabo la replicación de 8 unidades muestrales por lo que el cálculo para la mezcla de reacción equivalió a cada volumen antes mencionado multiplicado por 10.

Una vez hecha la mezcla, se centrifugó por 5 segundos para homogenizar los componentes y en seguida, se transfirieron 47 μ l de esta a cada uno de los 9 microtubos para RPC esterilizados (50 μ l). En seguida, se agregaron 3 μ l de extracto de ADN a cada correspondiente tubo y una vez listos los 8 ejemplares, se agregaron 3 μ l de agua destilada al tubo del blanco. Finalmente se colocó una tapa hermética a cada tubo y se introdujo la gradilla conteniendo las 8 unidades muestrales y el blanco al Aparato Amplificador RPC Perkin Elmer-Cetus.

Las réplicas de ADNmt se hicieron mediante el programa número 15 (FILE 15) el cual desempeñó 35 ciclos consecutivos de desneutralización a 94 °C (1 minuto). Durante esta etapa, las 2 cadenas de ADN se separan. Acomplejamiento a 45 °C (2 minutos). En este momento es cuando los cebadores se unen a las cadenas correspondientes dependiendo si son L (para la cadena ligera) o son H (para la cadena pesada). Extensión a 72 °C (1

1/2 minuto); finalmente se desencadenó una producción de nuevas cadenas (L y H) con igual secuencia que las originales.

PURIFICACION DE ADN mt.

Los productos de la reacción RPC se separaron en un gel de agarosa al 2% utilizando el amortiguador 1 x TAE pH 8.0. Se usaron 2 gramos de agarosa de bajo punto de fusión (low melting point) disueltos en solución amortiguadora 1 x TAE pH 8.0 contenida en un matraz Erlenmeyer (250 ml) que a su vez se mantuvo 2 minutos calentando hasta que la solución se tornó de blanca a transparente. En seguida, se acomodó un peine de 12 divisiones y se transfirió la agarosa al plato molde dejándose reposar por una hora a 4 °C antes de su uso.

Una vez lista la agarosa, se procedió a acomodar el plato molde y se agregó la solución amortiguadora hasta observar un nivel que apenas cubriera el gel. Con extremo cuidado, se retiró el peine lentamente dejando que el amortiguador penetrara en los surcos. De este modo, el plástico de cada surco humedecido se deslizó

con mayor facilidad. Después de esto, se aplicaron las muestras agregando 4 μ l de tinción (a base de azul, de bromofenol 0.25%, xilenocianol 0.25% y ficol 15%) en cada microtubo conteniendo el ejemplar amplificado

Se utilizaron solo 40 μ l de muestra teñida y para seleccionar y cortar la banda apropiada se corrió una escalera de 123 pares de bases (GIBCO) como testigo. El corrimiento se hizo durante un lapso de 2 horas a 50 volts.

Una vez cumplido el tiempo de corrimiento, se apagó la fuente de poder y se transfirió la agarosa a una solución reveladora de bromuro de etidio concentrado (10 mg/ml) manteniendo en constante movimiento durante 10 - 15 minutos. Posteriormente, se tomó la agarosa y se puso en un expositor de rayos UV. Utilizando una máscara y lentes protectores, se observó la agarosa y se localizaron las bandas de 400 pares de bases, se tomó una fotografía usando una cámara POLAROID con montaje para cono grande y se procedió a cortar las bandas usando navajas desechables para cada ejemplar. Cada fragmento de agarosa se pasó a un tubo Eppendorf (1.7 ml) etiquetado y una vez terminados, todos los ejemplares se mantuvieron a 4 $^{\circ}$ C hasta la etapa siguiente.

LIMPIEZA DE FRAGMENTOS DE AGAROSA.

Los tubos con los fragmentos de agarosa refrigerados se centrifugaron durante 1 minuto para estimar el volumen obtenido de gel. En seguida, se agregó yoduro de sodio 3M a cada tubo Eppendorf, en un volumen igual a 3 veces el volumen estimado de gel, y se transfirieron los tubos a un baño de agua a 45 °C durante 10 minutos. En seguida se dejaron los tubos con NaI a temperatura ambiente mientras se resuspendía una solución silicea (o Glassmilk) usando un agitador de vórtice para adicionar 5 µl de esta solución a cada tubo Eppendorf y se agitó fuertemente en el Vórtice para mantener en suspensión al sílice.

Se transfirieron todos los tubos a un contenedor con hielo triturado durante 25 minutos, y cada 5 minutos se invirtieron mezclando suavemente. Posteriormente se procedió a centrifugar a 13000 RPM y se eliminó el sobrenadante de cada muestra.

La siguiente etapa consistió en repetir 3 veces un proceso de lavado: Agregando 200 µl de etanol al 70%, resuspendiendo el precipitado por 10 segundos en el Vórtice y centrifugando por 20 segundos a 13000 RPM y finalmente, se eliminó el sobrenadante.

Hechos los 3 lavados, se procedió a resuspender el precipitado en 20 µl de agua estéril y se centrifugó por 20 segundos. Cada sobrenadante obtenido de este último lavado se conservó en un nuevo tubo Eppendorf etiquetado y se hizo un nuevo lavado con otros 20 µl de agua estéril. Finalmente, se obtuvieron 40 µl de extracto con ADN mt replicado. Todos los tubos con extracto se centrifugaron al vacío usando alta temperatura durante una hora para eliminar volumen de agua (usando una Centrifuga SC 100 Speed Vac SAVANT) y al cabo del tiempo, se adicionaron 15 µl de agua esterilizada para eluir nuevamente el ADN mt purificado dejando los tubos en un baño con agua a 37 °C durante 10 - 15 minutos.

SECUENCIACION DE ADN mt.

Basada en la modificación al Método de Sanger con especificaciones técnicas de Sambrook et al, (1989).

- Se prepararon tres soluciones previamente:

(usando el kit United States Biochemicals USB).

SOLUCION I (Premix) a (cebador L) y b (cebador H).

1.25 μ l de cebador, 2 μ l 5 x Amortiguador (kit),

0.75 μ l de dimetilsulfonato (DMSO), 0.65 μ l de agua destilada.

SOLUCION II (Label mix)

1 μ l de DTT, 1 μ l de mezcla marcadora (label mix kit),
1 μ l de agua destilada, 0.35 μ l de DMSO.

SOLUCION III; (Chaser mix) 64 μ l de agua destilada,
20 μ l de dNTPs (1.25 mM), 10 μ l de DMSO, 6 μ l de 5
x Amortiguador (kit).

Posterior a las soluciones se agregaron 2.5 μ l de ddNTP (G, A, T, C) en cada campana divisoria correspondiente al plato microtitulador. Se etiquetaron nuevos tubos Eppendorf (0.65 ml) para cada muestra analizada, considerando 2 tubos por ejemplar (uno para cada cebador). Se agregaron 5 μ l de template (ADN purificado) y 4.65 μ l de solución I a cada tubo de 0.65 ml y se mezcló bien.

Una vez que se tuvieron listas todas las muestras para ambos cebadores, se procedió a calentar las mezclas a 94 °C durante 5 minutos (usando un aparato termociclador para RPC). Posteriormente se enfriaron las mezclas en hielo seco / etanol.

* A partir de este momento se trabajó en la zona radiactiva del laboratorio.

En seguida se agregaron (por cada muestra) 0.5 µl de radiactividad S35-dATP (Deoxiadenina alfa-tiotrifosfato S35) y 0.15 µl de enzima secuenasa (versión 2.0) a la SOLUCION II (ó label mix). Se homogenizó la SOLUCION II y se agregaron 4 µl de ésta a cada una de las muestras contenidas en hielo seco/etanol. Se esperó durante 3-4 minutos a que la reacción ocurriera. Mientras tanto, se calentó el plato microtitulador (con las bases G,A,T,C) en un baño de agua por un minuto a 37 °C y en seguida, se agregaron 3 µl de muestra a cada campana correspondiente al cebador usado. Una vez terminado esto, se calentó nuevamente el plato microtitulador durante 5 minutos a 37 °C. Por último, se agregó la SOLUCION III y se volvió a calentar durante 5 minutos a 37 °C para después

detener la reacción adicionando 4 µl de SOLUCION ALTO con formamida y azul de bromofenol (kit). En seguida, se transfirió el plato (conteniendo la reacción de secuenciación) a un congelador a -20 °C.

PREPARACION DEL GEL DE POLIACRILAMIDA (6%).

Se utilizaron platos de vidrio para geles de 0.4 mm de grosor y 35.9 x 43.6 cm de dimensión, un peine plástico con capacidad para 64 espacios de aplicación y 2 barras plásticas separadoras de 0.4 mm de grosor y 2 cm x 43.6 cm de dimensión.

Primeramente se limpiaron los vidrios con etanol y papel absorbente. En seguida, se aplicó una película delgada de solución SIGMACOTE (silicón líquido) sólo para las caras internas de ambos vidrios y se procedió a acomodar los separadores plásticos y poner cinta aislante plástica en los bordes uniendo así los 2 vidrios.

Se preparó la poliacrilamida usando 15 ml de solución ACCUGEL 40 TM, 50 gramos de urea, 10 ml de solución 10 x TBE pH 8.0 y 45 ml de agua destilada

en un vaso de precipitado de 150 ml. Una vez listo todo lo necesario, se procedió a agregar 320 µl de persulfato de amonio (APS 10%) y 32 µl de solución TEMED (N'-tetrametiletilenamida) y se homogenizó la mezcla. Usando una jeringa de 60 c.c se vertió un volumen aproximado a 50 c.c (ml) de solución de poliacrilamida levantando los vidrios hasta un ángulo aproximado a 45-50 °. Se mantuvo el flujo constante para evitar la formación de burbujas. Una vez vaciado todo el volumen de la jeringa, se bajaron lentamente los vidrios hasta una posición casi horizontal (2 ° de ángulo). Inmediatamente se puso el peine para muestras y se colocaron pinzas de presión sólo en esta parte, para mantener el peine unido a ambos vidrios.

ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA.

Se seleccionó la poliacrilamida sobre otros tipos de geles para la electroforesis final, debido a las ventajas que ésta tiene (Sambrook et al., 1989) tales como:

- 1) Su alto poder de resolución: la poliacrilamida puede separar moléculas de ADN cuyas longitudes difieren muy poco (por ejemplo: 1 par de base en un fragmento de 500 pares de bases).

- 2) La poliacrilamida puede acomodar cantidades mayores de ADN. Se puede aplicar en un solo surco arriba de los 10 μ g (sin una pérdida significativa de resolución).
- 3) El ADN recobrado a partir de una poliacrilamida es extremadamente puro: puede ser usado para propósitos de suma precisión (por ejemplo: microinyecciones en embriones de rata) .

Después de 20 - 30 minutos se retiró la cinta aislante de los bordes del vidrio y se transfirió el gel a una cámara para electroforesis vertical (SAVANT) y se ajustaron los vidrios lentamente. Se agregó una solución amortiguadora de 0.5 x TBE pH 8.0 en la cuba superior y 1.0 x TBE pH 8.0 en la cuba inferior. Se humedeció la zona superior de los vidrios y el peine y con mucho cuidado, se sacó el peine para realizar un precorrimento del gel a 35 volts por 5 minutos.

Mientras tanto, se procedió a calentar la reacción de secuenciación previamente almacenada a -20 °C en el plato microtitulador usando una plancha térmica a 80-90 °C por 2 minutos e inmediatamente se pasó el plato a un contenedor con hielo triturado para mantener la reacción a baja temperatura.

En seguida, se procedió a apagar la fuente de poder para poner el peine nuevamente introduciéndolo entre ambos vidrios con las puntas hacia adentro hasta un nivel que apenas tocara el gel. Posteriormente se delimitaron las zonas de aplicación para cada muestra y para cada cebador y se aplicaron 2.5 μ l de cada base primeramente para un cebador. Una vez aplicados todos los ejemplares, se corrió el gel durante 2-3 minutos a 35 watts y en seguida, se aplicaron las muestras correspondientes al otro cebador y se corrió el gel por 1 hora. Cumplido este tiempo, se agregaron 150 ml de acetato de amonio 3M pH 5.0 y se corrió el gel por 3 horas más a 35 watts, 38 miliAmperes y 1720 volts.

Al terminar de correr el gel, se retiró el amortiguador de la cuba superior para poder retirar los platos. Se trasladó el gel a la zona radiactiva y ahí, se separaron los platos de vidrio cuidadosamente de tal forma que el gel quedara íntegramente depositado en cualquiera de los 2. Utilizando papel Whatman absorbente se separó el gel definitivamente y se procedió a secarlo al vacío protegiendo el gel con un plástico resistente al calor (usando un secador tipo SGD 4000 SAVANT) por aproximadamente 1 hora.

Al cabo del tiempo, se midió la intensidad radiactiva con un contador manual de baterías. Finalmente se retiró el plástico protector del cartón Whattman con el gel seco. En el cuarto oscuro, se transfirió el gel seco a un expositor para radiografías (KODAK) poniendo una autoradiografía de 14 x 17 pulgadas (KODAK XAR) en contacto con el cartón cuidando que estuviese bien cerrado el cartucho. Todos los cartuchos con radiografía permanecieron por 2 días en oscuridad, y en seguida se hacía una observación preliminar revelando la radiografía. Cuando la reacción de secuencia servía y se observaban bandas, se ponía una nueva radiografía y se dejaba esperando por una semana más para posteriormente ser revelada y analizada (Figura 5).

ANÁLISIS DE DATOS.

A partir de las radiografías reveladas se procedió a la lectura de bandas acomodando fijamente una radiografía sobre la pantalla del iluminador. Una vez identificados los ejemplares y sus bandas correspondientes se hizo primeramente la lectura de la secuencia respecto al cebador de la cadena ligera siguiendo una dirección

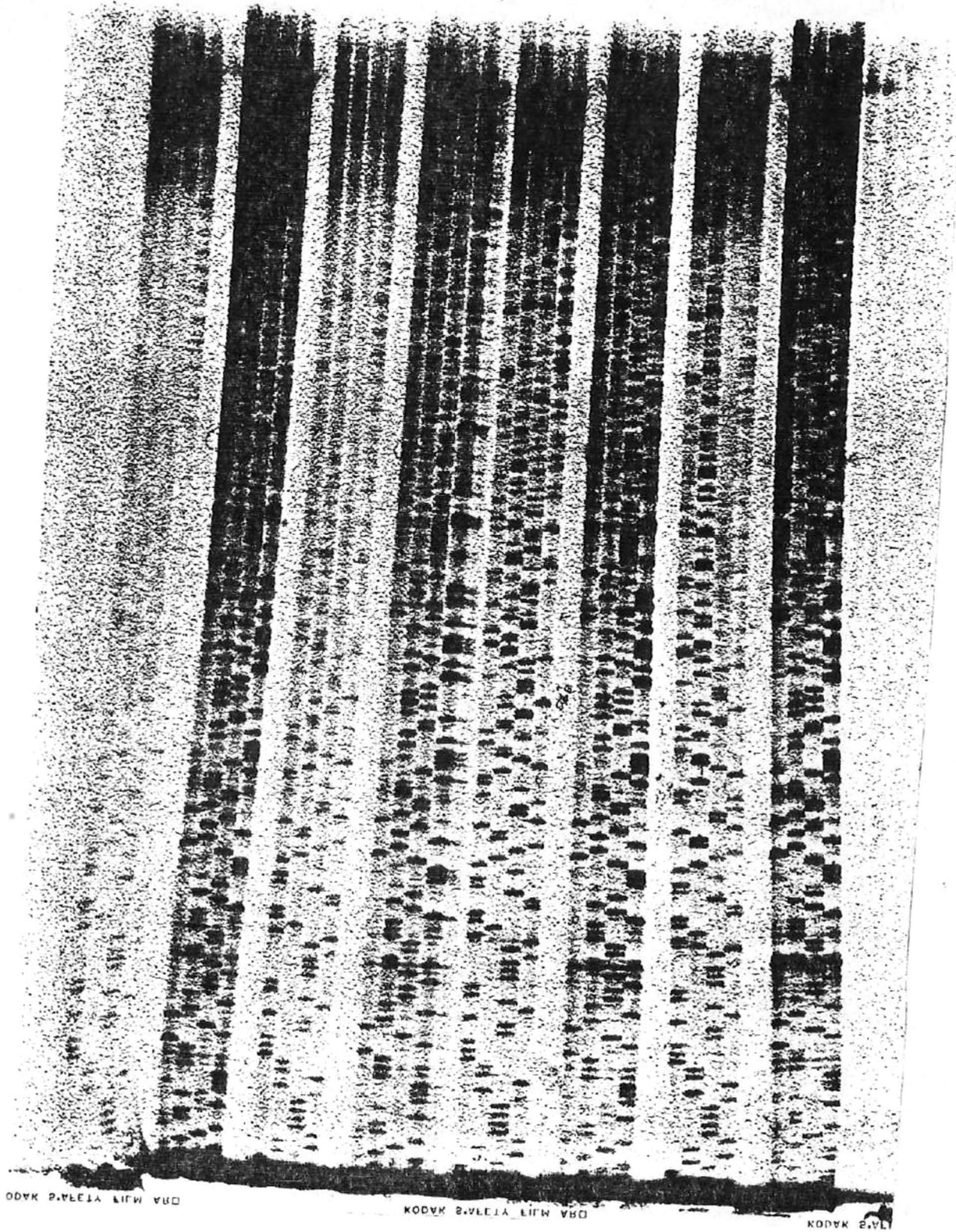
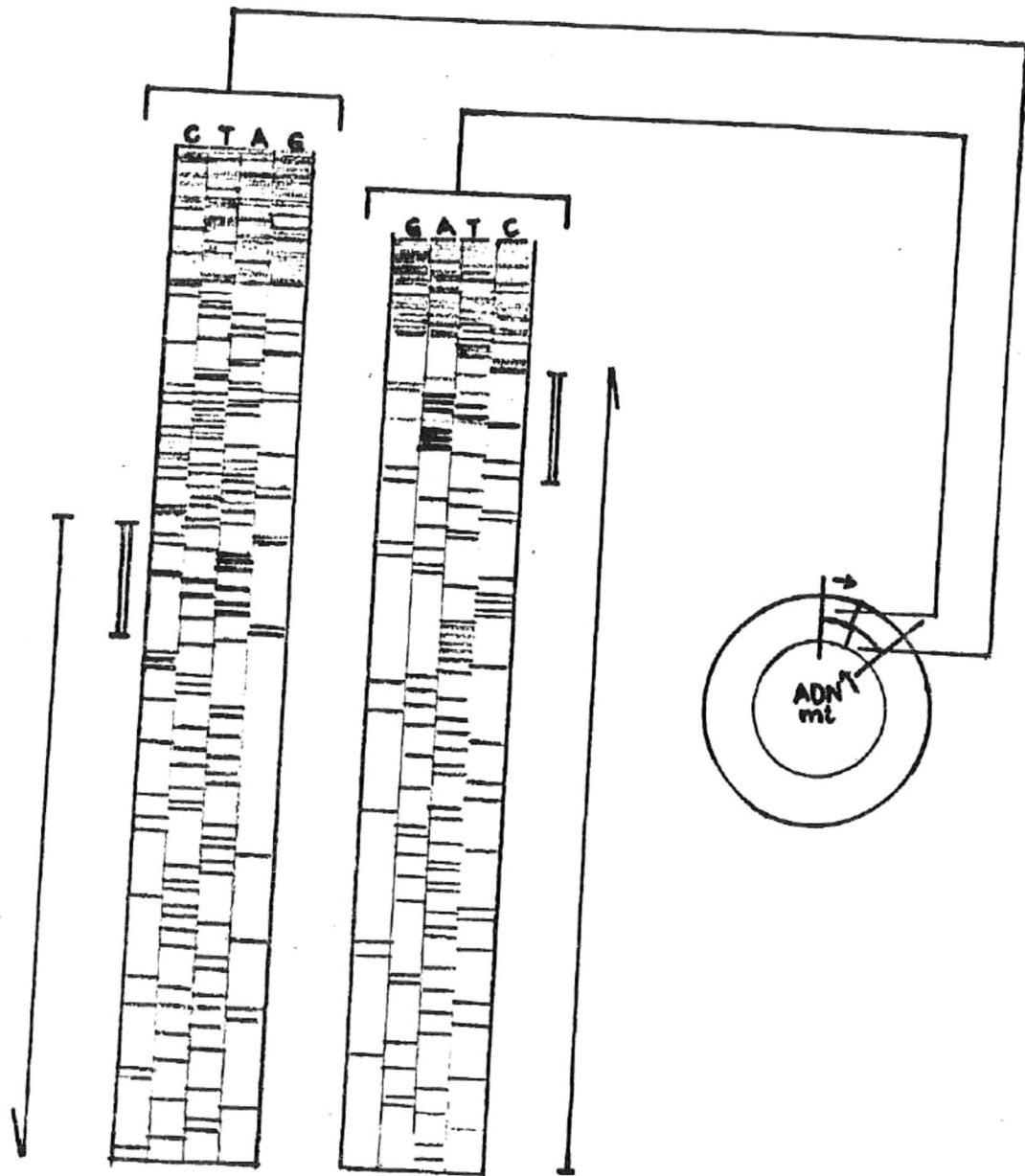


FIGURA 5. Calidad del ADNmt utilizado para las reacciones de secuenciación que se llevaron a cabo durante la etapa final de laboratorio.

de arriba hacia abajo. Justo en el sitio donde se dificultó la lectura por acumulación de bandas, se procedió a buscar un motivo genético característico de la cadena ligera, en la cadena pesada. Una vez localizado ese motivo, se continuó la lectura pero de abajo hacia arriba (Figura 6).

Utilizando todas las bases leídas se generó una matriz de datos en base a las lecturas de ambos cebadores y una vez que se tuvieron todos los ejemplares leídos se procedió a alinearlos considerando en los datos de cada secuencia un mismo punto de comienzo y un mismo punto de final (Apéndice I). La matriz de datos secuenciales fue leída en el programa PAUP Versión 3.0 (Swofford, 1989) de tal modo que fue posible generar un estatus real de los datos que enumeraron los cambios secuenciales y estableció cuales de ellos fueron considerados como informativos así como la obtención de distancias absolutas, divergencia secuencial (%) y los árboles filogenéticos más parsimoniosos para los cuales se obtuvieron valores de longitud, índice de consistencia, Homoplasia, Retención y estadístico g1.



FIGUA 6. Modo de lectura empleado durante la etapa de análisis de bandas de secuenciación mostrando el sitio particular para el cambio de cebador.

Dentro de los fundamentos matemáticos que consideró el programa los más relevantes (Swofford, 1991) para este trabajo se muestran a continuación:

$$B(T) = \sum_{i=3}^T (2i-5)$$

Esta ecuación se empleó para obtener el número total de árboles diferentes estrictamente bifurcados (BT) para un número (T) de individuos analizados. Para cada posible árbol de un número $i-1$ de individuos hay $2(i-1)-3 = 2i-5$ ramas a las cuales el individuo i puede estar conectado. Como se observa obviamente, el número de árboles tiende a incrementar grandemente mientras aumenta el número de individuos analizados. Para este estudio (T=15) el número de árboles (ó combinaciones) obtenido fue de 8×10^{12} .

$$L = \sum_{j=1}^C w_j \cdot l_j$$

El análisis de Parsimonia opera considerando que los caracteres son independientes uno de otro así que la longitud (L) de un árbol completo se analiza como la suma de longitudes de los caracteres individuales (l_j) en donde C es el número total de caracteres. Este programa considera $w_j = 1$ para todos los caracteres mientras no se asigne un vector de ponderación.

$$IC(X) = m/s$$

El Índice de consistencia para un solo carácter (c) es igual al cociente entre la mínima cantidad de cambio que un carácter puede mostrar en un árbol concebible (m) y la máxima cantidad de cambio que un carácter requeriría en un árbol concebible. Este índice muestra que tan consistente es un árbol para explicar los datos que se tienen. Mientras el valor sea mayor a cero y cercano a uno, la consistencia de los datos es buena.

$$IH(\%) = 1 - IC(\%).$$

El Índice de homoplasmicidad (IH%) se refiere a la cantidad de fenómenos considerados como similitudes en los caracteres debidas a convergencia, paralelismo y reversión y no debidas a la herencia de un ancestro común (ó ancestria). Debido a esto, el Índice de homoplasia puede ser un problema substancial cuando llega a ser muy grande puesto que la consistencia de los datos será menor dificultando así la interpretación de los mismos.

$$IR(\%) = (\Sigma g - \Sigma s) / (\Sigma g - \Sigma m)$$

El Índice de retención (IR%) es un valor que indica que tan confiable y real puede ser el árbol que se ha obtenido así, un valor de cero indica que el árbol no es confiable y un valor cercano a 1, lo contrario.

$$(1) \quad d(i,j) = \sum_{k \in S} w_k \cdot \text{dif} (x_{ik}, x_{jk})$$

$$(2) \quad d_m(i,j) = \frac{d(i,j)}{\sum_{k \in S} w_k}$$

Una matriz comparativa de parejas de individuos puede ser computada mostrando como resultados las distancias absolutas (1) y los porcentajes de distancia genética (ó divergencia secuencial) considerada como distancia media (2) .

RESULTADOS.

Se obtuvieron 15 secuencias genéticas para el ADN mt del lobo marino (Zalophus californianus) mediante la amplificación de las áreas hipervariables correspondientes al CITOCROMO B (400 pb) y LA REGION CONTROL (ó D-loop; 400 pb) y la lectura de 370 bases para el citocromo b y 314 bases para la región control de las cuales se observaron variaciones solamente en la región control. Debido a que el citocromo b tuvo un solo genotipo, los datos se analizaron unicamente para las secuencias correspondientes a la región control.

Un total de 11 genotipos fueron encontrados dentro de los 15 ejemplares analizados para las 4 áreas correspondientes. De las secuencias analizadas para cada área, al menos una mantiene una expresión genética igual a otra, sin considerar que también se comparten expresiones genéticas iguales entre las distintas áreas como es el caso de San Nicolas, San Miguel y Punta Banda (ejemplar 3) y Bahía de los Angeles (ejemplares 2 y 4) (Tabla IV).

TABLA IV . Valores de distancias genéticas (abajo) y divergencia genética (arriba) correspondientes a las comparaciones de organismos para las 4 áreas geográficas (SN = San Nicolas, SM = San Miguel, PB = Punta Banda, G = Golfo de California o Bahía de los Angeles).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 SN1	-	1.9	2.3	4.8	1.3	1.3	1.9	4.2	0.6	0.6	0.6	5.2	1.3	1.3	4.2
2 SM1	6	---	1.0	4.2	0.6	1.3	0.6	4.2	1.3	1.3	1.3	4.5	1.3	1.3	4.2
3 PB1	7	3	---	5.2	1.0	1.6	1.0	4.5	1.6	1.6	1.6	5.5	1.6	1.6	4.5
4 G1	15	13	16	---	3.9	4.2	4.5	1.9	4.2	4.2	4.2	1.9	3.9	4.2	1.9
5 SN2	4	2	3	12	---	0.6	0.3	3.2	0.6	0.6	0.6	4.2	0.6	0.6	3.2
6 SM2	4	4	5	13	2	---	1.3	3.6	0.6	0.6	0.6	4.5	0.6	0.0	3.6
7 PB2	6	2	3	14	1	4	---	3.9	1.3	1.3	1.3	4.9	1.0	1.3	3.9
8 G2	13	13	14	6	10	11	12	---	3.5	3.5	3.5	1.6	3.2	3.6	0.0
9 SN3	2	4	5	13	2	2	4	11	---	0.0	0.0	4.5	0.6	0.6	3.5
10 SM3	2	4	5	13	2	2	4	11	0	---	0.0	4.5	0.6	0.6	3.5
11 PB3	2	4	5	13	2	2	4	11	0	0	---	4.5	0.6	0.6	3.5
12 G3	16	14	17	6	13	14	15	5	14	14	14	---	4.2	4.5	1.6
13 SM4	4	4	5	12	2	2	3	10	2	2	2	13	---	0.6	3.2
14 SM4	4	4	5	13	2	0	4	11	2	2	2	14	2	---	3.6
15 G4	13	13	14	6	10	11	12	0	11	11	11	5	10	11	---

Considerando sólo a los individuos que mantuvieron al menos una distancia genética, el porcentaje de divergencia secuencial es de 0.3-5.5% entre las 4 áreas, siendo el mínimo entre San Nicolas y Punta Banda, y el máximo entre Punta Banda y Bahía de los Angeles (Golfo de California) (Tabla IV). La divergencia secuencial entre los individuos de San Nicolás fue de 0.6-1.3%, para San Miguel 0.6-1.3, para Punta Banda 1.0-1.6 y para el Golfo (o BDLA) 1.6-1.9% (Tabla V). Sin embargo considerando a San Nicolas, San Miguel y Punta Banda como representantes de la Costa Pacífica la divergencia secuencial es de 0.3-2.3% (Tabla VI).

Los valores de distancia absoluta genética se muestran notoriamente superiores entre los ejemplares del Golfo (BDLA) respecto a los de la Costa Pacífica (SN, SM y PB) siendo el máximo valor de 17 unidades de distancia. Sin embargo, entre los ejemplares de la Costa Pacífica las distancias absolutas nunca superan el valor de 7 unidades (Tabla IV).

El Análisis filogenético de Máxima Parsimonia generó un total de 4 árboles que resaltan el establecimiento de un grupo afín separando a los ejemplares

TABLA V. Valores de distancias genéticas (abajo) y divergencia secuencial (arriba) correspondientes a las comparaciones intragrupalas de los organismos.

	1	2	3	4
1 SM1	---	1.3	0.6	1.3
2 SM2	4	---	0.6	0.6
3 SM3	2	2	---	0.6
4 SM4	4	2	2	---

	1	2	3	4
1 SM1	---	1.3	1.3	1.3
2 SM2	4	---	0.6	0.0
3 SM3	4	2	---	0.6
4 SM4	4	0	2	---

	1	2	3	4
1 G1	---	1.9	1.9	1.9
2 G2	6	---	1.6	0.0
3 G3	6	5	---	1.6
4 G4	6	0	5	---

	1	2	3
1 PB1	---	1.0	1.6
2 PB2	3	---	1.3
3 PB3	5	4	---

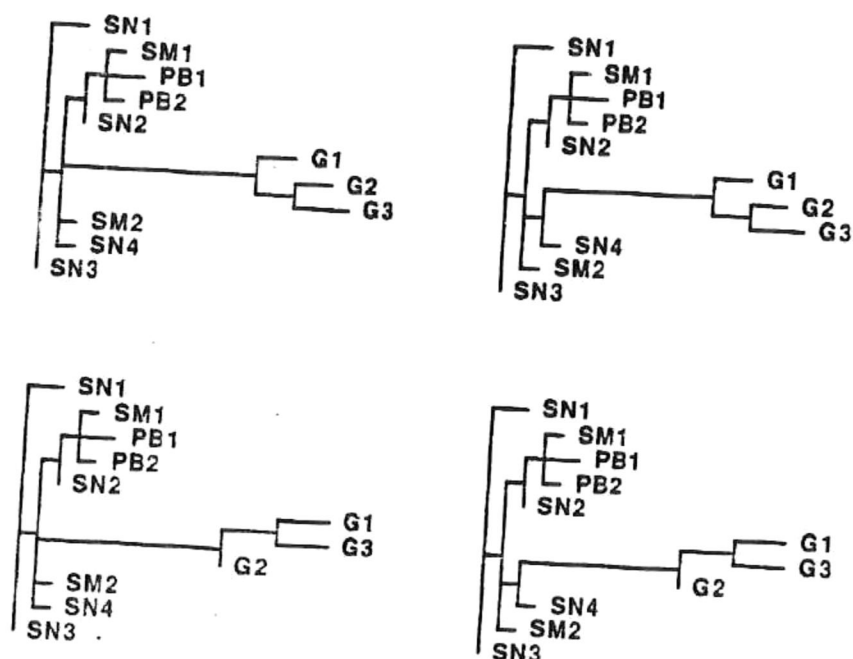
TABLA VI . Valores de distancia genética (abajo) y divergencia secuencial (arriba) correspondientes a las comparaciones de organismos para la Franja Pacífica (SN = San Nicolas, SM = San Miguel y PB = Punta Banda).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 SM1	---	1.9	2.3	1.3	1.3	1.9	0.6	0.6	0.6	1.3	1.3
2 SM1	6	---	1.0	0.6	1.3	0.6	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
3 PB1	7	3	---	1.0	1.6	1.0	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
4 SN2	4	2	3	---	0.6	0.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
5 SM2	4	4	5	2	---	1.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
6 PB2	6	2	3	1	4	---	1.3	1.3	1.3	1.0	1.3
7 SN3	2	4	5	2	2	4	---	0.0	0.0	0.6	0.6
8 SM3	2	4	5	2	2	4	0	---	0.0	0.6	0.6
9 PB3	2	4	5	2	2	4	0	0	---	0.6	0.6
10 SN4	4	4	5	2	2	3	2	2	2	---	0.6
11 SM4	4	4	5	2	0	4	2	2	2	2	---

del Golfo (BDLA) de los ejemplares de la Costa Pacífica (SN, SM y PB) (Figura 7). En ninguno de los 4 casos se ve involucrado un representante del Golfo dentro del Grupo del Pacífico. Todos los árboles mostraron iguales valores de longitud (30), Índice de consistencia (IC%) (0.867), Índice de Homoplasia (IH%) (0.133) e Índice de retención (IR%) (0.846) (Tabla VII).

Un consenso de los diagramas (Figura 8) resalta finalmente a los individuos del Golfo como un grupo aparte, el cual apareció el 100% de las veces, separado respecto a los otros individuos. Sin embargo, representantes de las 4 diferentes zonas se encuentran agrupados el 66% de las veces, donde la afinidad entre los individuos de la Costa Pacífica prevalece entre las 3 zonas al menos un 65% de las veces y se confirma para San Miguel y Punta Banda en 3 ocasiones, el 66, 65 y 58% de las veces (Tabla VII).

Un análisis de búsqueda sobre el status real de los datos mostró que la matriz secuencial obtenida para la Región Control tiene un total de 16 cambios secuenciales informativos de los cuales 11 se consideraron como transiciones (cambios entre purinas ó pirimidinas)



VARIABLE	VALOR
Indice de consistencia	0.867
Indice de homoplasia	0.133
Indice de retención	0.846
Longitud del árbol	30

FIGURA 7. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas para los lobos marinos mostrando los 4 árboles más parsimoniales y sus valores obtenidos para las variables correspondientes.

TABLA VII. Grupos de organismos relacionados en base a su afinidad y frecuencia (%)
con que ocurren los mismos.

1 SN1	2 SM1	3 PB1	4 G1	5 SN2	6 SM2	7 PB2	8 G2	9 SN3	10 G3	11 SN4	Frecuencia (%)
			*				*		*		100.0
	*	*	*	*	*	*	*		*	*	66.0
	*	*		*		*					65.14
	*	*				*					57.82
							*		*		51.93
			*						*		31.39
			*				*		*	*	26.91
			*				*		*		17.34
			*				*				11.68
				*		*					9.67
	*	*	*	*		*	*		*		4.54
			*	*			*		*	*	4.53
		*		*		*					4.25
		*				*					3.82
	*	*	*			*	*		*		3.54
		*	*	*			*		*		3.34
			*			*				*	2.77
						*				*	2.17
		*	*			*	*		*	*	1.60
		*	*			*	*		*		0.64
		*				*	*		*		0.64
		*				*	*		*	*	0.64

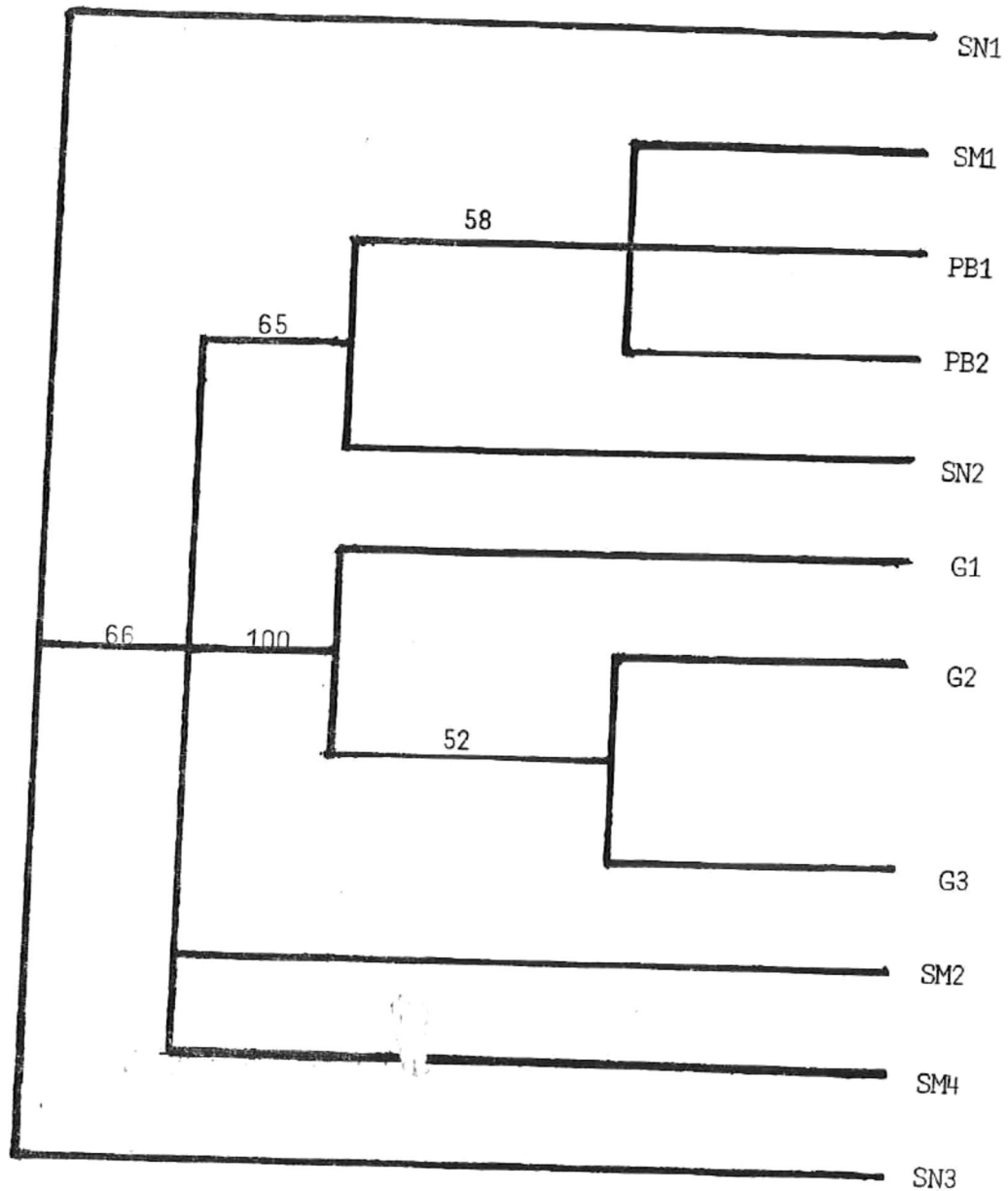


FIGURA. 8. Consenso global de los 4 árboles más parsimoniosos mostrando el porcentaje de interrelación entre los grupos de lobos marinos (SN=San Nicolás, SM=San Miguel, PB=Punta Banda, G=Golfo de California).

y 5 como transversiones (cambio de purina a pirimidina y viceversa) y la mayoría de ellos se encuentran en los individuos pertenecientes al golfo (BDLA). (Tabla VIII). También se determinó, en base al Apéndice I, la abundancia relativa de bases nucleotídicas para el lobo marino (guanina 12.67%, adenina 30.88%, timina 31.12% y citosina 25.27%) (Tabla IX) y se relacionó con valores obtenidos para otros organismos de sangre caliente (Tabla X).

Finalmente, evaluando aleatoriamente 1000 del total de árboles posibles que el programa genera se obtuvo una gráfica de distribución de frecuencias (Figura 9) en la cual se pudo observar que la longitud del árbol obtenido como el más parsimonioso tuvo una frecuencia única y se obtuvo el valor estadístico para g_1 (-1.4786).

TABLA VIII. Información sobre las mutaciones que se presentaron a lo largo del estatus real de los datos mostrando el tipo de cambio y área geográfica en que se presentó (SN = San Nicolas, SM = San Miguel, PB = Punta Banda, G = Golfo de California) (Gu = guanina, Ad = Adenina, Ti = Timina,

ORDEN DE APARICION (del cambio)	TIPO DE CAMBIO		AREA EN QUE SE PRESENTO EL CAMBIO
	Transicion	Transversion	
1	Ci ---> Ti		G
2	Ci ---> Ti		G
3	Ci ---> Ti		SN
4	Ci ---> Ti		PB
5	Ad ---> Gu		G
6	Ad ---> Gu		G
7	Ad ---> Gu		G
8		Ad ---> Ci	G
9		Gu ---> Ti	G
10		Ci ---> Gu	G
11	Ci ---> Ti		G
12		Ci--->Gu--->Ti	G y PB
13	Ad ---> Gu		G
14	Ci ---> Ti		G
15	Ci ---> Ti		G
16		Ci ---> Gu	SN y SM

TABLA IX . Composición porcentual de bases nucleotídicas en los fragmentos hipervariables de la Region Control y Citocromo b del lobo marino mostrando un promedio global.

LOCALIDAD Y NUMERO DEL ORGANISMO.	PORCENTAJE DE BASES (REGION CONTROL)			
	GUANINA	ADENINA	TIMINA	CITOSINA
SAN NICOLAS 1	12.62	31.07	31.39	24.92
SAN NICOLAS 2	12.62	31.07	31.07	25.24
SAN NICOLAS 3	12.62	31.07	31.39	24.92
SAN NICOLAS 4	12.33	31.168	31.49	25.00
SAN MIGUEL 1	12.62	31.07	30.74	25.56
SAN MIGUEL 2	12.62	31.07	31.39	24.91
SAN MIGUEL 3	12.62	31.07	31.39	25.24
SAN MIGUEL 4	12.62	31.07	31.39	24.91
PTA. BANDA 1	12.94	31.07	31.07	24.60
PTA. BANDA 2	12.62	31.07	31.74	25.56
PTA. BANDA 3	12.06	31.07	31.39	24.92
BDLA(GOLFO) 1	12.94	30.42	30.74	25.89
BDLA(GOLFO) 2	12.94	30.42	30.74	25.89
BDLA(GOLFO) 3	12.94	30.09	31.07	25.89
BDLA(GOLFO) 4	12.94	30.42	30.74	25.89
PROMEDIO GLOBAL	12.67	30.88	31.116	25.27
(CITOCROMO B)				
UNICO GENOTIPO	12.01	31.28	25.14	28.77

TABLA X . Comparación de los porcentajes obtenidos para las bases nucleotídicas del lobo marino respecto a los porcentajes de otros vertebrados de sangre caliente (de acuerdo a Arnason y Johnsson, 1992).

ORGANISMO	PORCENTAJE DE BASES			
	GUANINA	ADENINA	TIMINA	CITOSINA
Foca de puerto	14.30	33.00	25.30	27.4
Ballena de aleta	13.30	32.70	26.70	27.3
Vaca	13.50	33.40	27.20	25.9
Ser humano	13.10	30.90	24.70	31.3
Raton domestico	12.30	34.60	28.70	24.4
Rata silvestre	12.50	34.10	27.20	26.2
Lobo marino	12.67	30.88	31.116	25.27

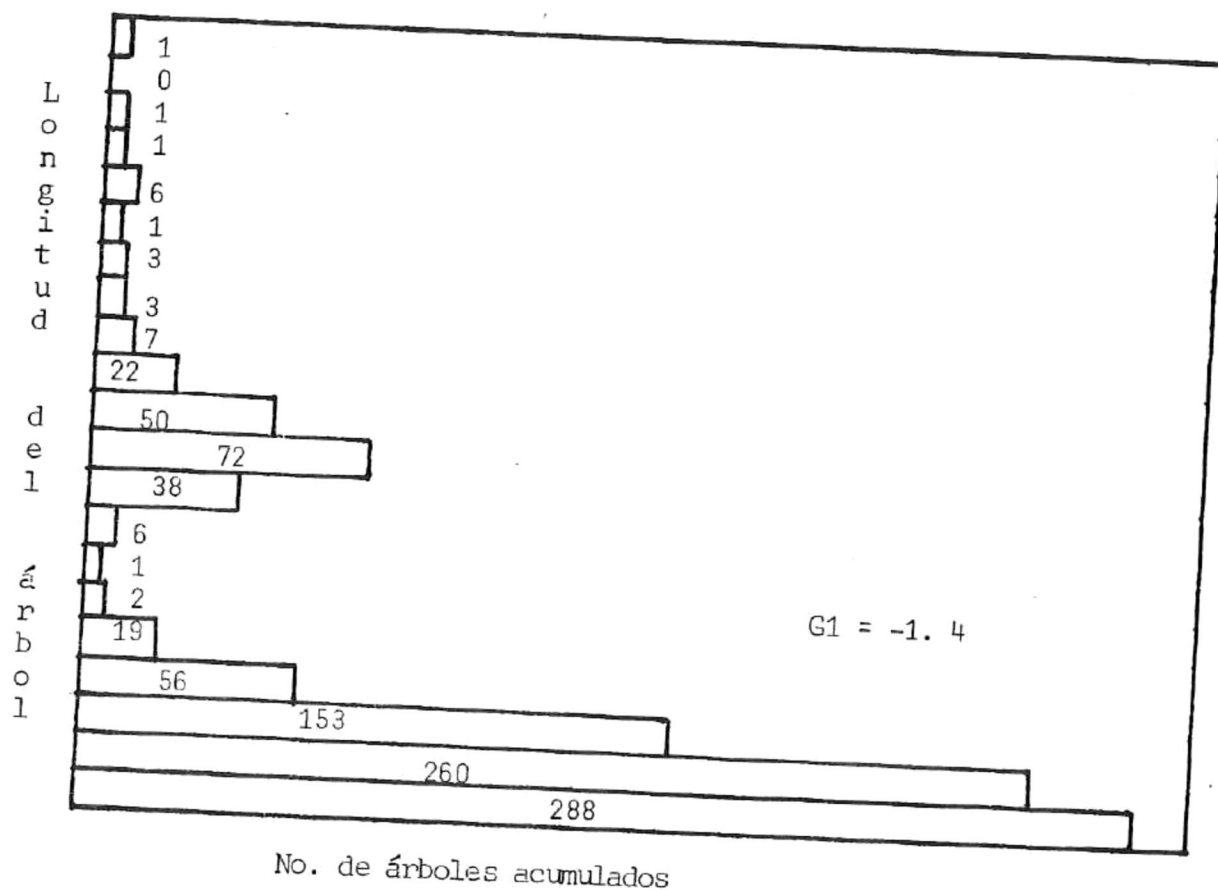


FIGURA 9. Análisis gráfico de distribución de frecuencias obtenido en base a un muestreo al azar, de 1000 árboles, del total de árboles generados por el programa (PAUP Vers 3.0) mostrando el valor estadístico de $G1$.

DISCUSIONES.

Para el presente estudio se aisló la molécula de ADN mt puesto que de acuerdo a varios autores (Billington y Herbert, 1991; Beckenbach, 1991) debió ser la más apta para mostrar la diferenciación genética que se deseaba encontrar. Dentro de las características que ayudaron a su selección estas fueron las más relevantes:

- 1) Homoplasmicidad; esto quiere decir que todas las moléculas son idénticas en un organismo y por lo tanto cualquier tejido podría haber sido empleado.
- 2) Tasa de substitución nucleotídica de 5 a 10 veces mayor que la del ADN nuclear y por lo tanto mayor capacidad de mostrar algún cambio a corto plazo en escala de tiempo (Brown et al., 1979; Wada et al., 1991).
- 3) Transmisión matrilineal; esto es debido a que el ADN mt es maternalmente heredado y por lo tanto no hay recombinación. En relación con esto, el ADN mt presenta secuencias de bases que se dan solo una vez por genoma (Avice et al., 1988; Friesen et al., 1992).
- 4) Facilidad para aislarse y analizarse (Beckenbach, 1991; Garner y Ryder, 1992; Sambrook et al., 1989; Rosel, 1991).

5) Tamaño de la molécula pues comparativamente el genoma nuclear es 25000 veces mayor al mitocondrial (Brown, 1983; en Nei y Kohen, 1983).

Dentro de las investigaciones más recientes que competen al estudio del ADN mt se encuentran trabajos sobre comparación inter e intra poblacional (Irwin et al., 1991; Birt-Friesen y Montevecchi, 1992; Wilson et al., 1985; Avise et al., 1987; Avise, 1992) los cuales consideraron siempre al citocromo b (cit b) como una zona de la molécula con regiones hipervariables importantes sin embargo, en este estudio de acuerdo a los resultados (Apéndice I) el fragmento hipervariable del cit b analizado mostró solo un genotipo para los lobos marinos de todas las áreas geográficas, es decir que no hubo ninguna diferencia genética. Este resultado puede interpretarse de varias formas pero ciertamente tiene su origen en una serie de sucesos pretéritos que pudieron influir en la población tales como la disminución de casi todas las colonias de lobos marinos distribuidos a lo largo de la Franja Pacífica incluyendo el Golfo de California. Este suceso tuvo lugar a principios del siglo XIX (Scammon, 1874; Townsend, 1885; Scheffer, 1928) tiempo en que se utilizaban

los pinlpedos, para extraer de ellos pieles, aceites, grasas, colmillos y carne. Esta última, para su uso en trampas de langosta y otras especies de organismos marinos (Elliott, 1887; Steverson, 1904; Townsend, 1918; Townsend, 1919).

El evidente cuello de botella que experimentó la población posiblemente no limitó su restablecimiento ya que actualmente, de acuerdo a los nuevos censos de lobos marinos hay un total de 175,000 individuos tanto en aguas norteamericanas como mexicanas (Le Boeuf, 1983; Aurióles, 1983) pero de cierta forma explica porque el cit b no mostró diferencias entre los organismos analizados. Por otra parte, el efecto del cuello de botella actúa sobre el ADN mt de una manera drástica por ser ésta, una molécula uniparentalmente heredada lo que indica que tiene un número efectivo de genes igual a $1/4$ de los del genoma nuclear (Rosel, 1992). Así, el tiempo requerido para la fijación de genes del ADN mt es más corto que el requerido por el genoma nuclear. Por lo tanto, la pérdida de variabilidad en el esta molécula, durante los cuellos de botella, es relativamente más pronunciada (Harrison, 1991). Este fenómeno, en combinación con las glaciaciones correspon-

dientes al Pleistoceno pudo haber influido directamente sobre la manifestación de un solo genotipo en esta región analizada del ADN mt.

Esto indudablemente no significó el fin del trabajo puesto que aún quedaba la opción de otras zonas hipervariables por revisar. Fue por esto que se recurrió a amplificar el fragmento más hipervariable de la Región control (ó Hasa de desplazamiento "Dloop") ya que de alguna forma aquí se demostraría si los individuos de la especie tenían o no alguna diferencia genética entre sí. Se sabe que la Región Control experimenta mutaciones más rápidamente que las regiones del genoma que codifican proteínas las cuales a su vez mutan más rápidamente que la región que codifica el RNA ribosomal (Moritz et al., 1989). Por esta razón, se recomienda que las especies con reciente divergencia genética se estudien base a esta región.

Beckenbach (1991) en sus trabajos sobre diferenciación poblacional estableció que la Región Control es un buen sitio para trabajar a nivel intra poblacional debido a sus zonas altamente hipervariables detectadas en ambos extremos de dicha región.

Como se pudo apreciar en la tabla III, era de esperarse que aparecieran numerosos genotipos en la Región Control. Sin embargo, no es ésta una región del ADN mt que codifique proteínas o tenga una función bien conocida. Esto hace pensar que no se sabe exactamente a donde conlleven las mutaciones que fueron encontradas, aunque ciertamente están ahí y posiblemente corresponden a los primeros cambios genéticos que puedan llegar en un futuro a expresar diferencias significativas. Estas, al menos entre los individuos que habitan la provincia norte del Golfo de California y los que habitan la Costa Pacífica. A pesar de que aparentemente no se observan diferencias morfológicas entre las colonias de lobos marinos la tabla mostró que los valores de distancia genética y divergencia secuencial (%) son mayores entre los individuos que habitan el Golfo de California (BDLA) y los individuos de Punta Banda. Esto hace evidente, de acuerdo con otros autores (Graves *et al.*, 1984; Avise *et al.*, 1988; Wayne *et al.*, 1991; Bowen *et al.*, 1992; Dizon *et al.*, 1992), que las barreras geográficas tienen una influencia en el aislamiento y la manifestación de la alopatria en la población aunque no por esto se descarten otros factores que pudieran influir como por ejemplo:

La Reserva absoluta disponible (RAD)(Rankin, 1985) de alimento que existe en el sitio donde se establece una colonia de lobos marinos. La provincia norte del Golfo de California mantiene numerosas loberas de carácter reproductivo (Maravilla, 1986), debido a que durante todo el año, la zona mantiene una RAD óptima (Badan et al, 1985; Arvizu, 1987), proporcionando así una subsistencia garantizada para esta especie. De igual forma, la Costa Pacífica de California y Baja California mantiene zonas de alta producción en peces epipelágicos y fauna bentónica (McCall et al, 1976), por lo que resultaría poco redituable energeticamente hablando, considerar una migración tan extensiva que contemple la entrada y salida constante de individuos al Golfo de California. Al no haber necesidad de buscar el alimento los animales pueden experimentar migraciones parciales pero a corta distancia (Rankin, 1985).

Si se relacionaran los factores de disponibilidad de alimento, distancia recorrida en una migración, exposición a los depredadores y presencia de asentamientos urbanos se puede entender mejor porque los individuos no participan tan evidentemente del patrón migratorio anual establecido por algunos autores (Anderson y Keith, 1980; Velarde et al., 1985).

Estas últimas dos ideas pueden ayudar a comprender mejor los valores bajos de distancia genética y divergencia secuencial entre las colonias correspondientes a la Franja Pacífica, ya que existe la posibilidad de que las colonias de lobos marinos de esta región pudieran mezclarse unas con otras considerando que la distancia directa por mar que separa a las Islas San Miguel y San Nicolás es de 125 km, y la que separa a Punta Banda de San Miguel es de 190 km. Además, es interesante hacer notar que los valores máximos de divergencia secuencial intragrupal (1.6%) no están muy lejanos al valor obtenido intergrupar (2.3%). Esto, no es ni la mitad del porcentaje máximo de divergencia secuencial (5.5%) encontrado comparando la Costa Pacífica con el Golfo de California. Tomando en cuenta esta baja divergencia secuencial, las islas antes mencionadas no se considerarían como una barrera geográfica importante puesto que los lobos marinos presentan suficiente capacidad motriz como para desplazarse cortas distancias de una manera continua. Además, no hay un rasgo en la información que sea característico de cada una de estas 3 colonias (SM, SN y PB).

Un aspecto de importancia resulta ser la herencia materna del ADN mt en relación con las migraciones estacionales que experimenta el lobo marino. Como se sabe, los lobos marinos desarrollan velocidades de nado hasta de 45 km/hr (Feldkamp, 1985) lo cual pudiera considerarse como una buena capacidad de dispersión, sin embargo, son los machos tanto adultos como subadultos, los que experimentan estas migraciones (Peterson y Bartholomew, 1967; Auriolles y Alvarado, 1985; Maravilla, 1986). Es raro observar a las hembras en migración a menos que las condiciones en el sitio llegaran a ser adversas y aún así, estos desplazamientos serían por cortas distancias. Las hembras, por lo general, desde su etapa subadulto (5-6 años), participan de la reproducción y por lo tanto se encuentran preñadas, pariendo o lactando bebés. Incluso, se ha observado en la conducta de las madres que sus crías permanecen hasta cerca del año a su lado, además de ser fieles a las áreas reproductivas (Peterson y Bartholomew, 1967). Este último aspecto es interesante pues considera que las hembras participan de la reproducción en el mismo sitio. Por lo tanto, contribuyen más al aislamiento, alopatria y establecimiento de líneas unifamiliares que los machos, suponiendo que estos

participaran de la reproducción en otras loberas, islas o zonas, lo cual establecería un flujo génico si la transmisión del ADN mt fuera biparental.

Se ha observado en muchas especies de vertebrados (como es el caso de las aves) que aunque éstas migren miles de kilómetros no se establece un flujo génico o mezcla entre las colonias (Birt-Friesen y Montevecchi, 1992). Quizá no sea este el caso exacto de los lobos marinos puesto que en estos animales la monogamia no existe, pero sirve para comprobar que la fidelidad al sitio reproductivo es un factor más que contribuye al establecimiento de nuevas expresiones genéticas.

Considerando el Análisis Filogenético de Máxima Parsimonia se pudo constatar que los árboles más parsimoniosos (Figura 7) se encontraron relacionados entre sí. Ciertamente, unos son reflejo de otros por lo que se consideraron solo 2 expresiones distintas, y aún así, no muy diferentes. Detalles de este tipo suceden cuando la cantidad de datos analizados ya no es suficiente para que el algoritmo del programa separe mejor los grupos inconclusos (comunicación personal, Jesus Maldonado, Life Sciences Building, UCLA). Por esta razón se generó un consenso global que relacionó los 4 árboles

obtenidos en uno solo (Figura 8). Este consenso destacó siempre a los individuos del Golfo de California como una entidad separada.

De acuerdo a varios autores (Archie, 1989; Farris, 1989a, Farris, 1989b, Swofford, 1991) los valores de Indices que proporciona el análisis de datos antes mencionado, son una manera de constatar si el ó los árboles más parsimoniosos obtenido (s) son confiables ó no. En este estudio, los valores de los Indices (de consistencia, $IC=0.867$; de Homoplasia $IH=0.133$ y de Retención, $IR=0.846$) mostraron que las opciones más parsimoniosas si tienen validez. En otras palabras, estos árboles son un 87% consistentes, solo un 13% debidos a convergencia y no a ancestría y más aún, el valor de retención estuvo cercano a la unidad y lejano de cero ó equivalentemente 85% lo cual resultó ser un respaldo más para la consistencia de dichos árboles.

El análisis estadístico de la prueba G1 resultó ser muy relevante para la consideración final de los árboles filogenéticos. De acuerdo con Hillis y Huelsenbeck (1992) las secuencias comparativas del ADN deben

mostrar una señal filogenética ó pueden ser azarosos respecto a una historia filogenética de tal manera que tanto el número de caracteres como el número de individuos (ó taxas) analizado influye en la obtención del árbol más parsimonioso. Si se obtiene a partir de una muestra aleatoria de alternativas, una distribución de frecuencias (basada en la longitud de cada árbol ó alternativa) con tendencia hacia la izquierda (Sokal y Rohlf, 1985) esa será una buena señal filogenética; por el contrario, si los resultados son inciertos, la tendencia de la distribución será simétrica. De este modo, la figura 9 muestra de manera clara que el árbol más parsimonioso seleccionado por el programa es real y único, no azaroso.

La prueba de búsqueda sobre el estatus real de los datos destacó que aproximadamente 21 de las 314 bases pudieron proveer la información filogenética que se obtuvo. Sin embargo, cabe mencionar que la relación entre el número de transiciones (Tsc) y transversiones (Tsv) es de 2.2 , es decir, $2.2(Tsc) : 1(Tsv)$. Esta relación muestra una cifra bastante alta de transversiones respecto a otros autores (Aquadro y Greenberg, 1983; Brown, 1985; Irwin et al, 1991) los cuales destacan

valores de 10:1 a 20:1 al menos para mamíferos. Como es bien sabido, es más significativo un cambio por transversión que un cambio por transición ya que esto implica un cambio de una base (purina) por otra de características diferentes (pirimidina). Por esta causa, se pensó que la relación obtenida $2.2(Tsc) : 1(Tsv)$ fuera de suma importancia, evolutivamente hablando. Sin embargo, no hay que olvidar que esta relación corresponde a la Región Control, zona del ADN mt en la cual no todas las mutaciones existentes llegan a fijarse en el genoma como cambios significativos. Incluso, lo único que se conoce de esta región es que contiene una estructura prominente formada de la síntesis de una pieza corta de ADN, la cual es complementaria de la cadena ligera del duplex y desplaza a la cadena pesada. También, la Región Control puede servir como cebador para la síntesis de la cadena pesada hija (desplazada). Por último, como se mencionó anteriormente, esta región no participa en la codificación de las proteínas (Brown, 1983; en Nei y Kohen, 1983). En esto, cabe mencionar que una transversión presente en el citocromo b implica consecuencias evolutivas y dependiendo donde se manifieste ésta, se codificarán aminoácidos y proteínas diferentes. Quizá por ello,

es más común encontrar este tipo de cambios en la Región control que en el Citocromo b. Aunque se desconozca de que tipo fueran las implicaciones que manifieste una mutación informativa es necesario resaltar que el Golfo de California presentó, respecto a la Franja Pacífica, la mayor parte de las mutaciones (tanto transiciones como transversiones) (Tabla VIII).

Algunos investigadores han relacionado el cociente Tsc/Tsv con el tiempo de divergencia secuencial (Brown, 1983; en Nei y Koehn, 1983) asignando mayor tiempo de divergencia secuencial mientras menor sea el cociente. Sin embargo, respecto a los siguientes datos:

TIEMPO APROXIMADO (Diverg. secuenc)	Tsc/Tsv
< 0.3 m.a	24.0
5.0 m.a	11.5
8.0 m.a	3.3
10.0 m.a	2.6
25.0 m.a	1.4
80.0 m.a	0.3

se podrían considerar los dos valores más oscuros como los correspondientes a la relación Tsc/Tsv obtenida pero este tiempo geológico no corresponde al tiempo de divergencia secuencial entre el pacífico y el lado del golfo. El ancestro común que dió lugar a los linajes actuales de pinlpedos data del Periodo Oligoceno (aproximadamente 25 - 30 m.a) pero a partir de este ancestro, la radiación evolutiva hacia la especiación es diferente. Se sabe que los lobos marinos tienen su ancestro común en el Periodo Mioceno Tardío (5 - 8 m.a; Thalassoleon sp) y de ahí surge el género Zalophus sp hace 2 - 3 m.a (Barnes et al., 1985). Además, de acuerdo a los estudios sobre depósitos sedimentarios asociados con su abertura, el Golfo de California tiene aproximadamente 5 m.a (Postmioceno) de edad (Allison, 1965; Barnes et al., 1985). Estos últimos argumentos hacen pensar que el tipo de divergencia secuencial que corresponde a la relación Tsc/Tsv ($= 2.2$ equivalente a 10 m.a aproximadamente) equivale al ancestro común del género Zalophus sp (Thalassoleon sp). Si se considerara el tiempo del que se tiene registro fósil de Zalophus sp a la actualidad, posiblemente los lobos marinos pudieron tener un tiempo de residencia en el Golfo de California si no igual, al menos cercano a los

2 m.a. Si esto pudiera comprobarse sería un apoyo más para explicar las diferencias genéticas expresadas en los individuos del golfo respecto a los de la Franja Pacífica. De tal manera que si los lobos marinos colonizaron ambos lados en magnitudes similares y ambas poblaciones fueron diezmadas durante el siglo pasado, se puede pensar que además de la aparición de un cuello de botella en la población, las probabilidades de mezcla de individuos entre ambos lados de la barrera geográfica (en este caso, la Península de Baja California) disminuyó de tal forma que permitió el desarrollo de nuevas expresiones genéticas (ó mutaciones) como respuesta a un aislamiento pretérito.

Incluso, cabe mencionar que la relación T_{sc}/T_{sv} - divergencia secuencial (en tiempo geológico) antes citada es muy general y no contempla casos particulares de especies cuyas características pretéritas sean singulares. En éste caso, el supuesto error ó desfase en la interpretación pudo estar relacionado con la reducción en el tamaño de la población (Wright, 1931). Si se considerara el cuello de botella que la población de lobos marinos experimentó, aunado a un posible aislamiento, el número de mutaciones que van a estarse fijando

va a ser mayor que el que estuviera mediado por selección. Este factor en cierto modo, tiende a reducir la frecuencia de las mutaciones predominando sobre los factores azarosos. Esto último causa como resultado una dilución de mutaciones. Además, de acuerdo a las escalas de tiempo geológico a las que se hizo referencia, es comprensible un desfase en tiempo de acuerdo a lo que realmente debería equivaler en divergencia secuencial. Con el cuello de botella, hay mutaciones que se pueden acumular y no necesariamente esto equivale a un mayor tiempo geológico ya que el ritmo acumulativo de mutaciones en especies cuya talla poblacional ha sido reducida, es mayor respecto a las otras poblaciones, y el tiempo que tardan estas mutaciones en ser eliminadas, es también mayor.

Tomando en cuenta todas las áreas geográficas estudiadas, un parámetro que también resulta ser interesante considerar, desde el punto de vista global, es la composición porcentual de bases nucleotídicas (Tabla IX). Como se sabe, la composición de guanina - citosina (G + C) indica la habilidad relativa de las cadenas, para separarse en gradientes de cloruro de cesio alcalino además, la guanina es especialmente

capaz de formar pares de bases estables y por lo tanto, un alto contenido de esta base, además de estar en la estructura intramolecular secundaria, tiende a formar agregados (Brown, 1983 en Nei y Koehn, 1983). La guanina es más abundante en vertebrados que en invertebrados incluso, es más abundante en vertebrados de sangre caliente (como aves y mamíferos marinos) (Brown, 1981).

Arnason y Johnsson (1992) encontraron en la secuencia completa de ADN mt para la foca de puerto (Phoca vitulina) un 14.3% de guanina, 33% de adenina, 25.3% de timina y 27.4% de citosina, relacionándolo con otros porcentajes reportados, para la ballena de aleta, la vaca, el ser humano, el ratón doméstico y la rata (Tabla X). Todos estos animales coincidieron en presentar porcentajes similares en todas sus bases nucleotídicas de las cuales la guanina siempre fue la menos abundante.

La zona hipervariable de la región control que se mapeó en el ADN mt del lobo marino mostró un 12.67% de guanina lo que concuerda cercanamente con los valores reportados para los organismos de sangre caliente antes citados, por esto mismo, se dedujo que la abundancia

relativa de guanina en lobos marinos fué considerable aunque aunque sería interesante estimar nuevamente esta cantidad de guanina una vez que se tuviera el total de bases que suman la secuencia completa del ADN mt del lobo marino.

Finalmente, volviendo a un contexto global, la categorización jerárquica de cualquier "stock" permite a los administradores de recursos el asignar qué poblaciones necesitan protección por ser unidades evolutivas significativas (Dizon et al., 1992). De acuerdo a esta clasificación del "stock" se consideró, en base a este trabajo, que la población de lobo marino californiano reunió las características para ser ubicada dentro de la Categoría I. La cual establece que se trata de poblaciones con la mayor probabilidad de ser unidades evolutivamente significativas conteniendo un patrón discontinuo de divergencia genética donde agrupaciones de genomas localmente adaptados e íntimamente relacionados están geográficamente aislados y separados de otros, por distancias genéticas significativas (Dizon et al., 1992). Esto fué, tomando en cuenta el análisis completo de la Filogenia entre las 4 áreas de estudio, el cual resume que los individuos del Golfo de California se comportaron como una entidad poblacional aislada por la dimensión de la Península de Baja California (como barrera geográfica).

CONCLUSIONES.

- El lobo marino (Zalophus californianus) posee una diferenciación genética reflejada por un intervalo de 0.3-5.5% en divergencia secuencial entre las colonias de la Franja Pacífica y el Golfo de California. Esto es apoyado por el Análisis Filogenético de Máxima Parsimonia.
- El análisis de las secuencias genéticas muestra que el citocromo b, no tiene diferencia alguna entre los individuos.
- La Región Control generó un total de 16 cambios secuenciales informativos los cuales dieron lugar a 11 expresiones genotípicas diferentes.

LITERATURA CITADA.

- ALLISON, E. (1964). Geology areas bordering the Gulf of California. En: Geology of the Gulf of California. SCRIPPS Institution. Univ. Calif (ed). 401 pags.
- AQUADRO, C.F y B.D.GREENBURG. (1983). Human mitochondrial variation and evolution: analysis of nucleotide sequence from 7 individuals. Genetics 103: 283-312.
- ANDERSON, D.W y J.O.KEITH. (1980). The human influence on reproductive and nesting success: Conservation implications. Biol.Cons. 18: 65-80.
- ANTONELIS, G.A Jr and H.C.FISCUS. (1978). The pinnipeds of the California current. Calif Coop. Fish Invest., 21: 68-78.
- ARCHIE, J.W. (1989). Homoplasy excess ratios: new index for measuring levels of homoplasy in phylogenetic systematics and critique of the consistency index. Syst.Zool. 38: 253-269.
- ARNASON, U. (1977). The relationship between the four principal species of pinnipedian karyotypes. Hereditas.Jour. 87: 227-242.
- ARNASON, U y E.JOHNSSON. (1992). The complete mitochondrial DNA sequence of the Harbor Seal (Phoca vitulina) J.Mol.Evol. 34: 493-505.

- ARVIZU, J. (1987). Fishery activities in the Gulf of California, Mexico. CalCOFI Rep. 23: 32-36.
- AURIOLES, G.D. (1982). Contribución a la conducta migratoria del lobo marino de California (Zalophus californianus)
TESIS PROFESIONAL Universidad Autónoma de Baja California Sur. 75 pags.
- AURIOLES, G.D. (1983). Winter migration of subadult male California sea lion (Zalophus californianus) in the southern southern part of Baja California. J. Mamm. 64(3): 513-518.
- AURIOLES, G.D y E.ALVARADO. (1985). Composición por edades del grupo de machos subadultos en la parte sur de Baja California. X Reunión Internacional sobre Mamíferos Marinos, La Paz, B.C.S. 67 pags.
- AVISE, J.C. (1992). Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology.
OIKOS. 63: 62-72.
- AVISE, J.C; J.ARNOLD, R.M.BALL, E.BERMINGHAM, T.LAMB, J.E.NIEGEL, C.REEB y N.C.SAUNDERS. 1987. Intraspecific phylogeography: the bridge between population genetics and systematics. Ann.Rev.Syst.Ecol. 18: 489-522.

- AVISE, J.C; R.M.BALL y J.ARNOLD. (1988). Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: A comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. Mol.Biol.Evol. 5: 331-334.
- AYALA, F.J. y J.A.KIGLER. (1985). Principios de Genética moderna. 5a.Edición Editorial Interamericana. 836 pags.
- BADAN,D.A., C.J.KOBLINSKY y T.BAUMGARTNER. (1985). Spring and summer in the Gulf of California of surface thermal patterns. Oceanol. Acta. 8(1): 13-22.
- BARNES, L.G; D.P.DOMMING y C.E.RAY. (1985). Status of studies on fossil marine mammals. Mar.Mamm.Sci. 1(1):15-53.
- BARTON, N.H. (1984). Genetic revolutions founder effects and speciation. Ann.Rev.Ecol.Syst. 15: 113-164.
- BECKENBACH, T.A. (1991). Rapid mtDNA sequence analysis of fish populations using the polymerase chain reaction (PCR). Can J.Fish.Aquat.Sci. 48(1):95-98.
- BILLINGTON, N y P.D.N.HEBERT. (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes, and its implications for introductions. Can J.Fish.Aquat.Sci. 48(1): 80-94.
- BIRKY, C.W.Jr; T.MURAYAMA y P.FUERST. (1983). An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondrial and chloroplasts, some results. Genetics. 103: 513-527.

- BIRT-FRIESEN, V.L. y W.A.MONTEVECCHI. (1992). Genetic structure of the thick-billed murre (Uria lomvia) populations examined using direct sequence analysis of amplified DNA. Evolution. 46: 267-272.
- BONNELL, M.L and R.K.SELANDER, (1974). Elephant seals: Genetic variation and dear extinction. SCIENCE. 814: 908-909.
- BOTHWELL, A; G.YANCOPULUS y F.ALT. (1990). Methods for cloning, and analysis of eukariotic genes. Jones and Bartlett Publishers. 1a.edición 323 pags.
- BOWEN, B.W y J.C.AVISE. (1990). Genetic structure of Atlantic and Gulf of Mexico populations of sea bass, menhaden, and sturgeon: influence of zoogeographic factors and life history patterns. Mar.Biol. 207: 371-381.
- BOWEN, B.W; A.MEYLAN, J.ROSS, C.LIMPUS, G.BALAZS, J.AVISE. (1992). Global population structure and natural history of the green turtle (Chelonia mydas) in terms of matriarchal phylogeny. Evolution. 46(4): 865-881.
- BROWN, W; G.MATTHEW y A.WILSON. (1979). Rapid evolution of the animal mitochondrial DNA. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 76: 1967-1971.
- BROWN, W.M. (1981). Mechanisms of evolution in animal mitochondrial Ann.N.Y.Acad.Sci. 361: 119-134.

- BROWN, W.M. (1983). Evolution of the animal mitochondrial DNA. En: Nei, N y R.K.Koehn (ed). Evolution of genes and proteins. Sinauer Assoc. Inc, Saunderland, Mass. pp, 62-88.
- BROWN, W.M. (1985). The mitochondrial genome of the animals. En: McIntyre, R.J. (ed). Molecular evolutionary genetics Plenum, New York USA.
- CAUGHLEY, G. (1977). Analysis of vertebrate populations. John Wiley and sons Ltd, New York. 450 pags.
- DIZON, A; CH.LOCKYER, W.PERRIN, D.DEMASTER y J.SISSON. (1992). Rethinking the stock concept: A phylogeographic approach. Conserv.Biol. 6(1): 24-36.
- ELLIOTT, I.W. (1887). The sea lion hunt. en Fisheries and Fishery Industry of the United States. 18(2): 467-474.
- FARRIS, J.S. (1989a). The retention index and homoplasy index excess. Syst.Zool. 38: 406-407.
- FARRIS, J.S. (1989b). The retention index and rescaled consistency index. Caldistics. 5: 417-419.
- FELDKAMP, S.D. (1985). Swimming and diving behaviour in the California Sea Lion (Zalophus californianus). Tesis Doctoral en Biología Marina. Universidad de California en San Diego. 174 pags.

- FRIENDS OF THE SAL LIONS MAMMAL CENTER OPERATIONS MANUAL
(1985). A fieldwork and laboratory guide for
volunteers. 850 pags. (no publicado)
- GARNER, K y O.RYDER. (1992). Some applications of PCR to studies
in wildlife genetics. Symp.Zool.Sco.Lond. 64: 167-181.
- GRAVES, J.E; S.D.FERRIS y A.E.DIZON. (1984). Close genetic
similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna
(Katsuwonus pelamis) demonstrated with restriction
endonuclease analysis of mitochondrial DNA. Mar.Biol.
79: 315-319.
- GRAVES, J.E y A.E.DIZON. (1989). Mitochondrial DNA sequence
similarity of Atlantic and Pacific albacore tuna
(Thunnus alalunga). Can J.Fish.Aquat.Sci.
46: 870-873.
- GRAY, M.W y G.STAHL. (1989). Origin and evolution of the
mitochondrial DNA. Ann.Rev.Cell.Biol. 5: 25-50.
- HANZAWA, N; H.YONEKAWA y K.I.NUMACHI. (1987). Variability
in the mitochondrial DNA in Japanese dace (Trilobodon
hakonensis). Jpn.J.Genet. 62: 27-38.
- HARRISON, R.G. (1991). Molecular changes and speciation.
Ann.Rev.Ecol.Syst. 22: 281-308.
- HAUSWIRTH, W.W y P.J.LAIPIS. (1982). Mitochondrial DNA
polymorphism in maternal lineage of Holstein cows.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79: 4686-4690.

- HILLIS, D.M y C.MORITZ. (1990). Molecular Systematics. (ed) Sinauer Assoc. Inc.Publ. Saunderland, Mass USA 588 pags.
- HILLIS, D.M y J.P.HUELSENBECK. (1992). Signal, Noise and Reliability in molecular phylogenetic analysis. Jour.Hered. 83: 89-195.
- HOELZEL, A.R; J.M.HANDCOCK y G.A.DOVER. (1991). Evolution of the cetacean mitochondrial Dloop region. Molec.Biol.Ecol. 8: 475-493.
- HUBBS, C.L. (1952). Antitropical distribution of fishes and other organisms. Proceedings of the 7th.Pacific Science Congress. Pacif.Sci.Assoc. Auckland New Zeland. 3: 324-329.
- IRWIN, D.M; T.D.KOCHER y A.C.WILSON. (1991). Evolution of the cytochrome b. Gene of mammals. J.Mol.Evol. 32: 114-128.
- JONES, R.E. (1981). Food habits of smaler mammals from Northern California. Proc.Calif.Acad.Sci. USA 42(6): 409-433.
- KOCHER, T.D; W.K.THOMAS. A.MEYER, S.V.EDWARDS, S.PAABO y F.X.VILLABLANCA. (1989). Dynamics of the mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 86: 6196-6200.

- LAMBERTSEN, R. (1987). A biopsy system for large whales and its use for cytogenetics. J.Mamm. 68(2): 443-445.
- LE BOEUF, B.J; D.AURIOLES, R.CONDIT, C.FOX, R.GISINER, R.ROMERO y F.SINSEL. (1983). Size and distribution of the California Sea Lion Population in Mexico. Proc.Calif. Acad.Sci. 43(7): 77-85.
- LEHMAN, N; A.EISENHAWER, K.HANSEN, L.D.MECH, R.PETERSON, P.GOGAN. (1991). Introgression of coyote mitochondrial DNA into systematic north american grey wolf populations. Evolution. 45(1): 104-109.
- LINDSAY, G. (1970). Some natural values of Baja California. Pacific Discovery. 23: 1-10.
- MARAVILLA, O. (1986). Fluctuaciones estacionales del lobo marino (Zalophus californianus californianus; Lesson, 1828 Allen, 1880) en 5 colonias reproductoras en México. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 65 pags.
- MATTHEWS, E. S.KELLER y D.WEINER. (1988). A method to collect and process skin biopsies for cell culture from free-ranging grey whales (Eschrichtius robustus). Mar.Mamm.Sci. 4(1): 1-12.
- MECURE, A; K.RALLS, K.KOEPFLI y R.WAYNE. (1992). Genetic subdivisions among small canids: mitochondrial DNA differentiation of swift, kit and Artic foxes. Dept of Biol. UCLA, CA. MS:4:19:92 (inédito).

- MERCADO, P y S.LEANOS. (1976). Recursos pesqueros del Golfo de California. Nat.Resour.J. 16: 515-534.
- MC CALL, A; G.STAUFFER y J.P.TROADEC. (1976). Southern California commercial marine fisheries. Mar.Fish.Review. 28(1): 1-31.
- MC DERMID, E.M., R.ANANTHAKRISHNAN and N.S AGAR. (1972). Electrophoretic investigation of plasma and red cell proteins and enzymes of Macquarine Island elephant seals. Anim.Blood.Groups.Biochem.Genet. 3: 85-94.
- MORITZ, C.T; E.DOWLING y W.M.BROWN. (1987). Evolution of the mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Ann.Rev.Ecol.Syst. 18: 269-292.
- NEI, M y D.GRAUR. (1984). Extent of protein polymorphism and the neutral mutation theory. Evol.Biol. 17:73-118.
- NEI, M y R.KOEHN. (1983). Evolution of genes and proteins. Sinauer Assoc. Inc.Publ (ed), Saunderland, Mass USA. pp, 63-88; 165-190. 331 pags.
- ORTA, D.F. (1988). Hábitos alimenticios y censos globales del lobo marino de california (Zalophus californianus) en el Islote El Racito, Bahía de las Animas, B.C. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Baja California. 58 pags.

- SHIMURA, E y K.NUMACHI. (1987). Genetic variability and differentiation in the toothed whales. Rep.Int. Whal.Comm. 38: 141-163.
- SIMONSEN, V; F.W.ALLENDORF; W.F.EANES and F.O.KAPEL. (1982) 'Electrophoretic variation in large mammals'. Hereditas. 97: 87 - 90.
- SOKAL, R.R y F.J.ROHLF. (1985). Biometry. W.H.Freiman & Co.(ed)
- SOKOLOV, V. (1973). Investigaciones biológicas pesqueras de los peces pelágicos del Golfo de California. CalCOFI Rep. 22: 92-96.
- STEVERSON, C.I. (1904). Utilization of the skins of aquatic animals. Rep.USA.Fish.Comm. 1902, pp, 281-352.
- SWOFFORD, D.L. (1989). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (version 3.0). Illinois Natural History Society. Champaign Ill.
- SWOFFORD, D.L. (1991). When are phylogeny estimates from morphological and molecular data incongruent?. En: Miyamoto, J.C. (ed). Phylogenetic analysis of DNA sequences. Oxford Univ.Press. N.Y.
- TOWNSEND, C. (1918). Sea lions and Fishery Industry. N.Y.Zool. Soc.Bull. 12: 1679-1682.
- TOWNSEND, C. (1919). The utilization of the sea lion. N.Y.Zool. Soc.Bull. (March, 1919): 2.

- VELARDE, E; D.ANDERSON, y S.BEEBE. (1985). Conservación de las islas en un mar en el desierto. Proyecto y plane para la administración y conservación del Mar de Cortez. Editado por A.Snyder U.C.Davis SD(200) 1/85 15 pags.
- WADA, S; T.KOBAYASHI y K.NUMACHI. (1991). Genetic variability and differentiation of mitochondrial DNA of minke whale. Rep.Int.Whal.Comm. Special Issue 13: 203-215.
- WAYNE, R; S.GEORGE, D.GILBERT, P.COLLINS, S.KOVACH, D.GIRMAN y N.LEHMAN. (1991). A morphologic and genetic study of the Island fox (Urocyon littoralis). Evolution. 45(8): 1849-1868.
- WILSON, A.C; R.L.CANN, S.M.CARR, M.GEORGE, U.B.GYLLENSTEN, K.M.HELM, R.BYCHOWSKI, R.G.HIGUCHI, S.R.PALUMBI, E.M.PRAGER, R.D.SAGE y M.STONEKING. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol.J.Linn.Soc. 26.
- WHITEHEAD, H; J.GORDON, E.MANIATIS y K.RITCHARD. (1990). Obtaining skin samples from living sperm whales. Mar.Mamm.Sci. 6(4): 316-326.
- WINN, H.E; W.L.BISCHOFF y A.G.TARUSKI. (1973). Cytological sexing of Cetacea. Mar.Biol. 23:343-346.
- WRIGHT, S. (1931). Evolution in mendelian populations. Genetic 16: 97-159.

- PETERSON, R.S y G.A.BARTHOLOMEW. (1967). The natural history and behaviour of the California Sea Lion. Special Publication No.1; American Society of Mammalogists. 79 pags.
- RANKIN, M. (1985). Migration: mechanisms and adaptative significance. Marine Sciences Institute of Texas Cantrib.Mar.Sci. 27: 367-604.
- REPPENING, CH. (1976). Adaptative evolution of sea lions and walruses. Syst.Zool. 25: 375-390.
- ROSEL, P. (1992). Population structure and systematic relationships of some small cetaceans inferred from mitochondrial DNA esquence variation. Tesis Doctoral en Biologia Marina, UCSD. 191 pags.
- SAMBROOK, J; E.FRITSCH y T.MANIATIS. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2a.ed, Cold Spring Harbor Lab.Press. 3 volumenenes.
- SARICH, V.M. (1969). Pinniped phylogeny. Syst.Zool. 18:416-422.
- SCHEFFER, T.H. (1928). Precarius status of the seals and sea lions in our northwest coast. USA. J.Mamm. 9: 10-16.
- SCHLOTTERER, C; B.AMOS, y D.TAUTZ. (1991). Conservation of polymorphic simple sequece loci in cetacean species. Nature. 354: 63-65.
- SELANDER, R.K and D.W.KAUFMAN. (1973). Genetic variability and estrategies of adaptation in animals. Proc.Natl Acad.Sci USA. 70: 1875-1877.

APENDICE I. Matriz de datos secuenciales basada en las lecturas de bases nucleotídicas correspondientes a cada organismo.

DATOS PARA LA REGION CONTROL

SN1	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
SM1	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
PB1	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
G1	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
SN2	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
SM2	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
PB2	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
G2	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
SN3	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTCTAATTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
SM3	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTCTAATTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
PB3	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTCTAATTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
G3	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
SN4	GATNAATCAATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
SM4	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC
G4	GATNAATCTATCCCAAGCTGACATTNTNNTTAACTATTCCCTGACATGATTAACTCC

SN1	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
SM1	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
PB1	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
G1	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
SN2	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
SM2	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
PB2	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
G2	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
SN3	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
SM3	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
PB3	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
G3	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
SN4	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
SM4	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG
G4	CCACATTCATATATACCACTACCCCTACTGTGCCACCATAGTATCTTTTTTCCCCTATG

SN1	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
SM1	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
PB1	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
G1	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
SN2	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
SM2	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
PB2	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
G2	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
SN3	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
SM3	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
PB3	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
G3	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
SN4	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
SM4	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT
G4	TACATCGTGCAGTTGATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCACTGTACATATCATGATTGAT

SN1	TTTACATGATGACATAACTTGAATAATTTGACTGAATACTATAACTTCTTGATACAA
SM1	TTTACATGATGACATAACTTGAATAATTTGACTGAATACTATAACTTCTTGATACAA
PB1	TTTACATGATGACATAACTTGAATAATTTGACTGAATACTATAACTTCTTGATACAA

G1	TTTACATGATGACATACCTGGAAATAACTTGACTCAATACTATGACTTCCTGATACAAA
SN2	TTTACATGATGACATAACTTGAATAAATTTGACTNAAATACTATAACTTCTTGATACAAA
SM2	TTTACATGATGACATAACTTGAATAAATTTGACTGAATACTATAACTTCTTGATACAAA
PB2	TTTACATGATGACATAACTTGAATAAATTTGACTTAATACTATAACTTCTTGATACAAA
G2	TTTACATGATGACATAACTGGAAATAACTTGACTCAATACTATGACTTCCTTGATACAAA
SN3	TTTACATGATGACATAACTTCAATAAATTTGACTGAATACTATAACTTCTTGATACAAA
SM3	TTTACATGATGACATAACTTCAATAAATTTGACTGAATACTATAACTTCTTGATACAAA
PB3	TTTACATGATGACATAACTTCAATAAATTTGACTGAATACTATAACTTCTTGATACAAA
G3	TTTACATGATGACATACCTGGAAATAACTTGACTCAATACTATGACTTCTTGATACAAA
SN4	TTTACATGATGACATAACTTGAATAAATTTGACTNAAATACTATAACTTCTTGATACAAA
SM4	TTTACATGATGACATAACTTGAATAAATTTGACTGAATACTATAACTTCTTGATACAAA
G4	TTTACATGATGACATAACTGGAAATAACTTGACTCAATACTATGACTTCTTGATACAAA

SN1	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
SM1	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
PB1	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
G1	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
SN2	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
SM2	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
PB2	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
G2	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
SN3	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
SM3	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
PB3	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
G3	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
SN4	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
SM4	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT
G4	TGTAATTCACCTTAGTCCACGAAGCTTGATCACCAGGCCTCGAGAARCCAGCAACCCCTTGT

SN1	GAAAAGTGTACCTC
SM1	GAAAAGTGTACCTC
PB1	GAAAAGTGTACCTC
G1	GAAAAGTGTACCTC
SN2	GAAAAGTGTACCTC
SM2	GAAAAGTGTACCTC
PB2	GAAAAGTGTACCTC
G2	GAAAAGTGTACCTC
SN3	GAAAAGTGTACCTC
SM3	GAAAAGTGTACCTC
PB3	GAAAAGTGTACCTC
G3	GAAAAGTGTACCTC
SN4	GAAAAGTGTACCTC
SM4	GAAAAGTGTACCTC
G4	GAAAAGTGTACCTC;

DATOS PARA EL CITOCROMO B.

NNGAAAAGTANCATCCANCTAACCCACTNNCCAAAATTATCAACAGNTNCACTTATCGAC
 CTGCCACACCATCTAANATNTCAGCATNATAAACTTTNNATCCTCCTCGCAGCATGCT
 TAGCCTACAARTCTARNAGGCTTTTCTAGCTATACCTATACTCAGACACCACCACAGCCT
 TTTATCAGTCACCCACATTTGCCGAGACGTCACTACGGCTGAATCATCCGATACATGC
 ACGCAAATGGAGCCTCCATATTCTTTATCTGAATCTACATGCACGTAGGACGAGGACTGT
 ACTACGGATCCTATACACTAACAGAACATGAACATTGGCATCATCCTCCTATTACAA
 TCATACTAC.